

ЮГОЗАПАДЕН УНИВЕРСИТЕТ „НЕОФИТ РИЛСКИ“
Природо-математически факултет
Катедра „Химия“

Александра Иванова Тенчева

”Синтез на производни на мемантина с очаквано протективно
действие срещу болест на Алцхаймер“

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователната и научна степен

„Доктор“ по професионално направление:

4.2. Химически науки (Органична химия)

Научен ръководител: проф. д-р Иванка Станкова

Благоевград, 2025 г.

Дисертационният труд е написан на 107 стр. формат А4. Съдържа 25 таблици, 8 схеми и 37 фигури. Номерацията им в автореферата съответства на тази в дисертацията. Цитирани са 120 литературни източника.

Дисертационният труд е изработен в катедра „Химия”, Природо-математически факултет, ЮЗУ „Неофит Рилски”, гр. Благоевград.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 19.06.2025г. в катедра „Химия” към Природо-математически факултет на ЮЗУ „Неофит Рилски”, гр.Благоевград, ул. „Тодор Александров” № 56, ет.3, зала 2301.

Използвани съкращения

Ar – амилоиден β -пептид
СЗО – Световна здравна организация
AD – Болест на Алцхаймер
PD – Болест на Паркинсон
NMDAR – N-метил-D-аспартатен рецептор
AChA – ацетилхолинестераза
hAChE – човешка ацетилхолинестераза
BuChE – Бутирилхолинестераза
hBuChE – човешка бутирилхолинестераза
MTDL – многоцелеви насочени лиганди
ТСХ – Тънкослойна хроматография
TFA – Трифлуорооцетна киселина
TBTU – (1-Н-Бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетрабутилуриев
тетрафлуороборат
LA – липоева киселина
SGH – глутатион
ЕЕГ – Електроенцефалография
РДВХ – Разстройства с дефицит на вниманието и хиперактивност
GABA – Гама-аминомаслена киселина
ApoE4 – Аполипопротеин E4
HPLC – Високоэффективна течна хроматография
ESI-MS – Електроспрей йонизационен масспектрометър
DMSO – диметилсулфоксид
ЯМР – Ядрено-магнитен резонанс
PAS – Периферно анионно свързващо място
CAS – Каталитично анионно място
Cys – цистеин
AMPA – α -амино- β -(3-хидрокси-5-метилизоксазол-4-ил)-пропанова
киселина
Et₃N – триетиламин
Et₂O – диетилов етер
AK – аминокиселина
Boc – трет- Булоксикарбонил
Thz – тиазол
ТСХ – Тънкослойна хроматография
PD – Болест на Паркинсон
OS – оксидативен стрес
KATP – калиеви канали
ROS – реактивни кислородни молекули, радикали или йон-радикали
MCI – леко когнитивно увреждане
NFT – неврофибрилари възли

DMBA – 7,12-диметилбензо[а]антрацен
TH – тирозин хидроксилаза
ANOVA – дисперсионен анализ
MIC – минимална, инхибиторна/бактерицидна концентрация
BBB – кръчно-мозъчна бариера
APPswe клетки – миши модел на AD
EOC20 – микроглиални клетки
TNF-а – тумор некрозис фактор алфа
Sco – скополамин
IL-6 – интерлевкин-6
ICR мишки – бели мишки

Съдържание

1. Въведение.....	7
2. Цел и задачи.....	8
3. Резултати и обсъждане.....	9
3.1 Подходи при създаване на лекарствени средства.....	9
3.1.1. Синтез на мемантин с аминокиселини и пептиди.....	9
3.1.2. Синтез с ноотропици.....	10
3.1.3. Синтез на мемантин с тиазолови аналози.....	12
3.2. Резултати от проведените изследвания.....	14
3.2.1. Рентгеноструктурен анализ.....	14
3.2.2. Изследване на кристалната структура.....	16
3.2.3. Термично поведение на молекулите.....	17
3.3. Определяне на химична стабилност и антиоксидантна активност на мемантиновите хибриди.....	18
3.3.1. Хидролитична стабилност.....	18
3.3.2. <i>In vitro</i> антиоксидантна активност.....	22
3.3.2.1 Радикало-улавящо действие на мемантинови хибриди спрямо 1,1-дифенил-2-пикрилхидразилов радикал (DPPH-тест).....	23
3.3.2.2. Генерираща система на супероксидни анион радикал ($O_2^{\cdot-}$).....	23
3.3.2.3. Радикал-улавяща активност спрямо хидроксидов радикал ($\bullet OH$).....	24
3.3.2.4. Изследване на хелиращи ефекти.....	25
3.3.3. Физико-химични параметри, свързани с кинетиката и динамиката на новосинтезираните съединения.....	26
3.3.3.1 Разтворимост.....	26
3.3.3.2. Разпределение на веществата в различни среди.....	30
3.3.3.3. Мембранна пропускливост.....	32
3.4. <i>In vitro</i> изследване на невропротективното действие на новосинтезираните съединения.....	32
3.4.1. Невропротективни ефекти на мемантинови производни в APP _{swe} клетки, дължащи се на Cu^{2+} - индуцираната A β токсичност (A).....	32
3.4.2. Невропротективни ефекти на мемантинови хибриди срещу NMDA-индуцирана токсичност (B)	34
3.4.3. Невропротективни ефекти на мемантинови хибриди срещу H_2O_2 -индуцирана токсичност (C).....	34

3.4.4. Невропротективни ефекти на мемантинови производни спрямо хипоксия- индуцирана токсичност (D).....	35
3.4.5. Противовъзпалителни ефекти на мемантиновите производни срещу LPS-индуцирано възпаление в микроглиални клетки (E и F)	35
3.5. <i>In vivo</i> токсикологично характеризиране на новосинтезираните съединения.....	35
3.5.1 Остра токсичност.....	35
3.6. Невробиологични изследвания на новосинтезираните съединения.....	37
3.6.1 Неврофармакологичната активност на мемантиновите хибриди (Tug-Mem, Cav-Mem).....	37
3.6.2. Изследвания върху поведенческите реакции на третираните животни (мишки).....	37
3.7. Биохимични и хистологични изследвания на Tug-Mem върху деменция при мишки.....	40
3.7.1. Ефект на Tug-Mem върху процесите на обучение и памет при дементни мишки.....	40
3.7.2. Ефект на Tug-Mem върху изследователското поведение на дементни мишки.....	42
3.7.3. Ефекти на Tug-Mem върху нивото на оксидативния стрес в мозък на дементни мишки.....	43
3.8. Противовирусна активност срещу грипни вируси <i>in vitro</i>	44
3.9. Антимикробна активност.....	45
3.9.1. Активност срещу Грам-положителни бактерии и Грам-отрицателни бактерии.....	45
3.9.2. Активност срещу дрожди.....	47
3.9.3. Количествен анализ на антимикробната активност: Определяне на минимална инхибиторна/бактерицидна концентрация (MIC).....	47
3.9.4. Time-Kill тест за оценка на бактериостатично/бактерицидното действие.....	48
4. Изводи.....	50
5. Приноси.....	52
Приложения.....	53

1.ВЪВЕДЕНИЕ

Болестта Паркинсон (PD) и Болестта на Алцхаймер (AD) са невродегенеративни състояния със силно социално въздействие. Въпреки значителните успехи, постигнати в медицината последните години, не може да се счита, че на сегашния етап е намерено ефективно лечение на тези заболявания.

Заболяванията на нервната система представляват значителна медицинска и финансова тежест, а за лечението на AD и PD се изразходват много средства, докато получените медицински ползи са малки [1]. Невродегенеративните заболявания продължават да са нелечими и инвалидизиращи състояния [2], водещи до смърт на нервните клетки и деменция, дезорганизация и загуба на равновесието при движение (атаксия) [3].

Етапите преди деменция играят ключова роля в превантивните интервенции. Разработването на ранни и достъпни диагностични методи могат да предотвратят или забавят прогресията на когнитивния дефицит и появата на деменция при AD [4].

На финалния етап възможностите за въздействие върху пациентите с деменция са незначителни. Болестта на Алцхаймер е четвъртата най-голяма причина за смърт при хора над 65 години [5, 6].

Понастоящем терапията на AD е насочена към подобряване на когнитивните и поведенческите симптоми в етапите преди деменция [5], но ограниченият брой лекарства, които се предлагат на пазара, не може значително да подобри качеството на живот на пациентите, страдащи от тази болест.

Едно от лекарствените средства, което се използва в днешно време в клиничната практика е мемантинът. В настоящия дисертационен труд са описани синтезите на производни на мемантина, резултати от биологичното им действие и ефектът им при лечение на болестта на Алцхаймер.

Извършените изследвания позволяват да се направят важни изводи за влиянието на структурата на тези съединения върху биологичната им активност.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННАТА РАБОТА

Цел на настоящия дисертационният труд е дизайн и синтез на производни на мемантина с аминокиселини, пептиди и ноотропици, както и изследване на биологичните им активности – срещу Болестта на Алцхаймер, срещу Болестта на Паркинсон, както и антимикробиална, актиоксидантна и противовирусна на някои от тях.

За постигане на тази цел си поставихме следните **задачи**:

1. Синтезиране на производни на мемантин с природни и неприродни аминокиселини и пептиди: глицин, валин, аланин, β -аланин, 4-флуоро-фенилаланин, фенилаланин, тирозин, глицил-глицин, тиазол и тиазоллил-тиазол.
2. Синтезиране на производни на мемантин с ноотропици – кавинтон, пирацетам, модафинил и пикамилон.
3. Изследване на химичната стабилност на някой производни на мемантина.
4. Изследване на биологичните активности на новосинтезираните производни срещу Болестта на Алцхаймер и срещу Болестта на Паркинсон.
5. Изследване антимикробиална, актиоксидантна и противовирусна активност на някои от аналозите на мемантина.

3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

3.1. Подходи при създаване на лекарствени средства

Структурните промени в молекулата на лекарствените вещества водят до промяна на тяхната ефективност. Литературният обзор показва, че подобряване на лекарственото действие на мемантина може да бъде постигнато чрез модифицирането с различни природни вещества: аминокиселини, фенолни киселини; синтетични продукти: ноотропици и тиазол-съдържащи съединения.

Високата липофилност на адамантана му позволява да преминава кръвно-мозъчната бариера и по този начин да засяга централната нервна система. Това е една от причините амантадина и редица аминокиселини, да са подходящи за борбата срещу невродегенеративните заболявания [67-68].

Мемантинът (фиг. 1. 4) има по-добра терапевтична поносимост в сравнение с други блокери на NMDAR. Лекарственият препарат мемантин има много добра бионаличност $\approx 100\%$ [69-71].

3.1.1. Синтез на мемантин с аминокиселини (глицин, валин, аланин, бета алинин, фенилаланин, 4-флуоро фенилаланин и тирозин) и пептида (глицил-глицин)

Използването на природни аминокиселини и техни производни обуславя „разпознаваемост“ от молекулната система на организма и е предпоставка за биологична активност [72].

Откриването на глицин като коагонист на NMDAR доведе до интензивни изследвания на глицин/NMDA антагонисти като потенциални лекарства за ЦНС [73,74].

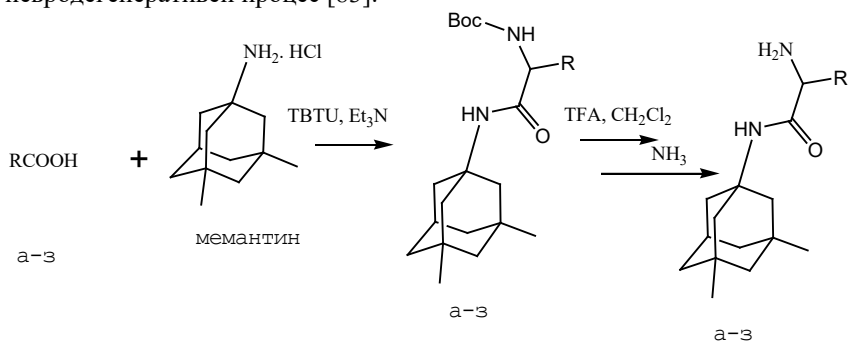
Ефикасността от L-валиновите естерни предлекарства за борбата с вирусните инфекции вече е доказана [75].

Фенилаланинът и тирозинът участват в биосинтеза на допамин, който от своя страна е метаболитният предшественик на норадреналина и адреналина [76]. Концентрацията на фенилаланин влияе върху мозъчната функция, при дефицит на фенилаланин синтезът на допамин намалява: доказано е, че предизвиква забавяне на ЕЕГ и удължава времето за изпълнение на невропсихологичните тестове [77]. Установено е, че аминокиселини фенилаланин и тирозин имат важна роля за нормалното функциониране на ЦНС [78].

Глутаминът, глутаминовата киселина и γ -амино маслената киселина (GABA) са основни аминокиселини за мозъчния метаболизъм и функция [79].

Свързването в една молекула на различни аминокиселини и техни производни с мемантина е предпоставка за очаквана висока биологична и в частност неврологична активност. В полза на това предложение говорят и големия брой литературни данни за биологична активност на подобни на тях съединения [80,81,82].

При пациенти с болестта на Алцхаймер, количеството на тирозин хидроксилаза е намалено в областите, характеризиращи се със загуба на допаминергични неврони. Следователно намаляването на клетъчното съдържание на този ензим може да бъде свързано с наличието на невродегенеративен процес [83].



а: R=N-Вос-глицил; **б:** R=N-Вос-валил; **в:** R= N-Вос- аланил; **г:**R=N Вос-β-аланил; **д:** R=N-Вос (4-F)-фенилаланил; **е:** R=N Вос-фенилаланил; **ж:** R=N Вос-тирозинил; **з:**R-N Вос-глицил-глицин;

Схема 2. Синтез на аминокиселинни производни на мемантин.

3.1.2. Синтези с ноотропици

Кавинтонът и ноотропилът са представители на група лекарствени средства за подкрепа на мозъчната функция [84]. Установено е, че ноотропиците водят до подобряване на метаболизма, укрепване на съдовете, активиране и регулиране на мозъчното кръвообращение и подхранване на мозъка. Така те ускоряват възстановяването му след инсулт и травми, подобрява се паметта, запаметяването, концентрацията [85].

В медицинската химия се обръща все повече внимание върху дизайна и синтеза на хибридни молекули, които включват в единна структура два фармакологични остатъка, съчетаващи определени биологични активности [86]. Ноотропилът помага за възстановяване на клетъчните мембрани и нервни пътища в мозъка. Той подобрява храненето, функционирането, и кръвообращението в мозъка [87].

Модафинилът е от групата на психостимулантите. Те са лекарствени средства, които се използват за лечение на разстройства с дефицит на вниманието и хиперактивността (РДВХ). Те са функционални антагонисти на лекарствата с инхибиращ ефект върху ЦНС [88, 89, 90].

Пикамилона повишава мозъчно-съдовата активност, използва се за лечение на мигрена, тревожност и алкохолна зависимост [91].

Доказано е, че пикамилона нормализира съдържанието на допамин в мозъка. Допамина от своя страна действа като ключов невротрансмитер в мозъка. Подпомага формирането на паметта, вниманието, фокуса и познанието [92-93].

Ноотропиците (модафинила, пирацетама, пикамилона и др.) подпомагат процеса на учене и памет, внимание и мотивация. Те улесняват възстановителните процеси и подобряват метаболизма на нервните клетки, предпазвайки ги от хипоксия. С течение на времето тези вещества се превръщат в допаминергични и серотонинергични лекарства. Въпреки това трябва да обърнем внимание на холинергично активните ноотропи поради решаващата роля на ацетилхолина в ученето и паметта [94].

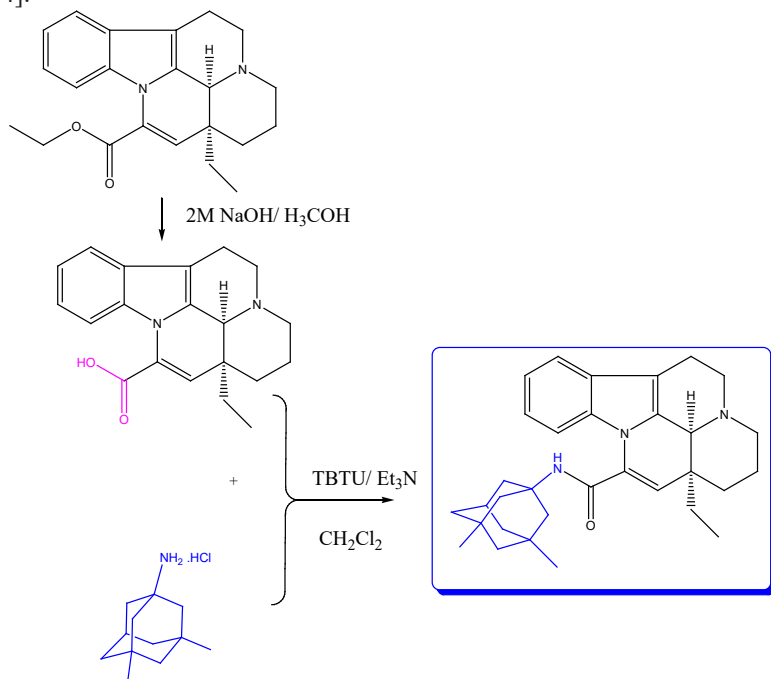


Схема 3. Синтез на мемантин-кавинтон.

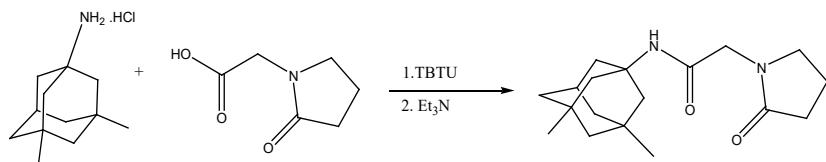


Схема 4. Синтез на хибрид между мемантин- пирацетам.

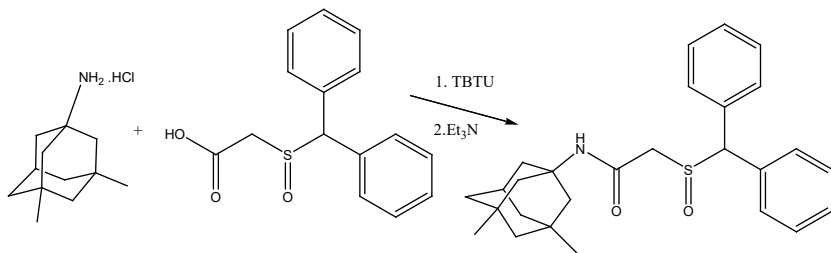


Схема 5. Синтез мемантин- модафинил.

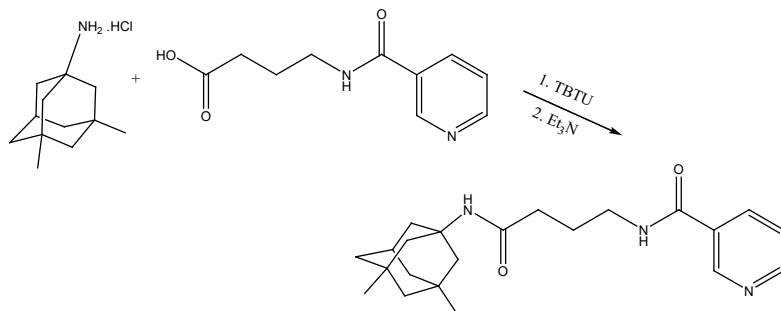


Схема 6. Синтез мемантин-пикамилон.

3.1.3. Синтез на мемантин с тиазолови аналози

3.1.3.1. Fmoc-2-аминометил тиазолил-5-2'-тиазоло-4'-(N-адамантил)-карбоксамид

Съществува връзка между болестта на Алцхаймер и инфекциите, които причиняват дългосрочно активиране на имунната система, процес известен като хронично възпаление. Инфекциите, за които се смята, че са свързани с болестта на Алцхаймер, включват херпес, невромония и бактериална инфекция [95]. Има успехи в тази област, но все още не е удовлетворена нуждата от нови ефективни терапевтични подходи за

лечение на AD. От друга страна хроничните вирусни, бактериални и гъбични инфекции могат да бъдат причинители на възпалителния път при заболяването [96]. При болестта на Алцхаймер се уврежда кръвно-мозъчната бариера, особено в областта, засегната от заболяване. Данните показват, че възпалението бета-амилоидният протеин и генът ApoE4 са свързани с болестта на Алцхаймер и могат да допринесат за разрушаването на кръвно-мозъчната бариера. След като тя е отслабена от бактериите, вирусите или други вредни вещества могат по-лесно да проникнат в мозъка. Това може да обясни защо някои вируси и бактерии като херпес и спирохети са по-чести в мозъка на хората с Алцхаймер [97-98].

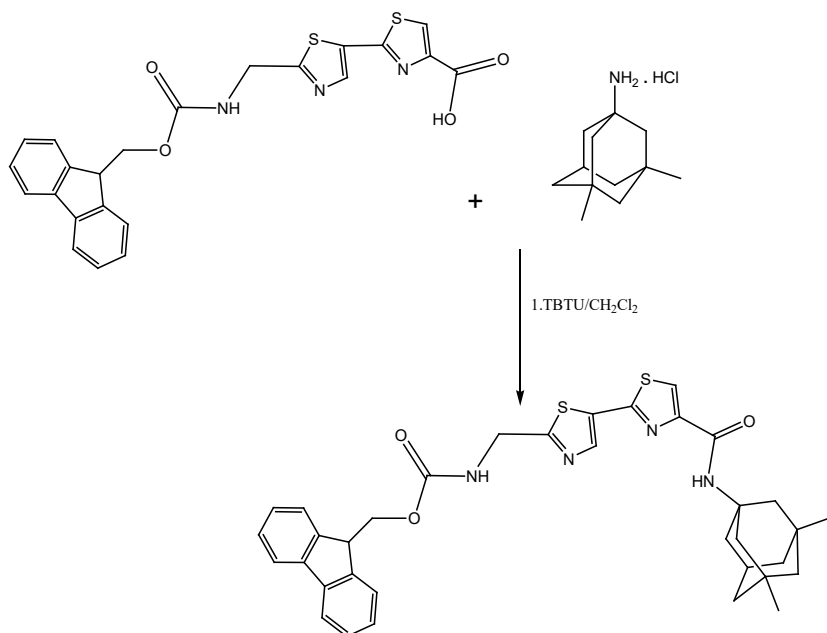


Схема 7. Fmoc-2-аминометил тиазолил-5-2'-тиазоло-4'-(N-адамантил)-карбоксамид.

3.1.3.2. Синтез на Вос-2-аминометил-4(*N* 4'-(*N*-адамантил)-карбоксамид

Тиазоловият пръстен може да бъде открит в широк спектър от естествени или синтетични молекули с различна степен на биологична активност. Някои аналози на тиазола преди са били използвани като ефективни лекарства за централната нервна система (ЦНС). Прамипексол, който съдържа 2-амино-тиазолов остатък, свързан с циклохексанов пръстен, структурно подобен на катехолния пръстен на допамина, е с допамин-D2 агонистична активност, се използва при лечението на PD [99].

Редица хетероциклични съединения са показали забележителна радикал-улавяща активност което е форма на антиоксидантна активност [100].

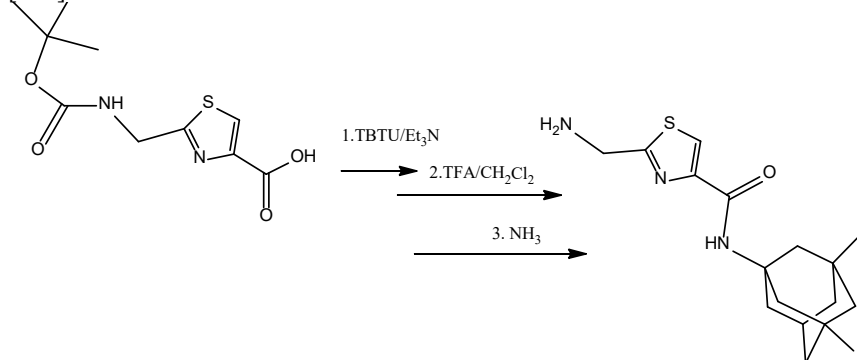
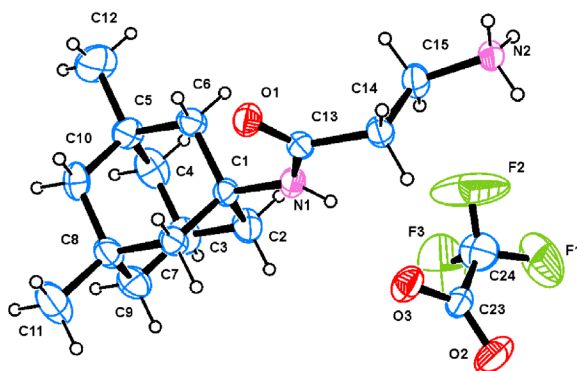


Схема 8. Синтез на 2-аминометил-4(*N* 4'-(*N*-адамантил)-карбоксамид.

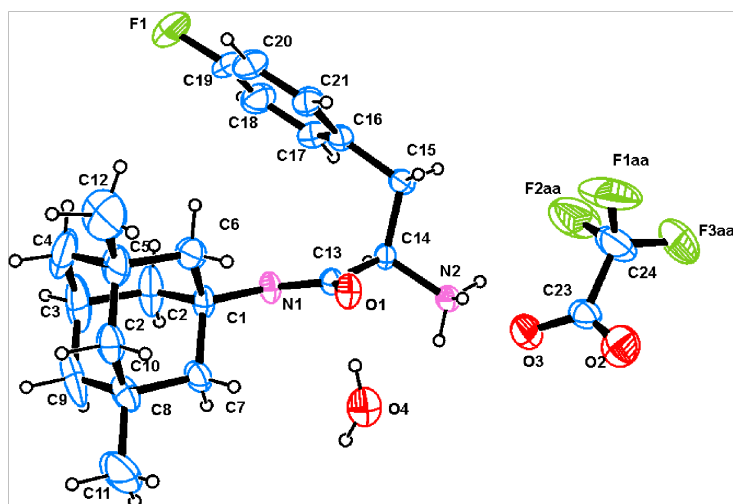
3.2. Резултати от проведените изследвания

3.2.1. Рентгеноструктурен анализ

Рентгеноструктурният анализ на монокристали от съединенията показва, че съединението β-Ala-Mem кристализира по centrosymetrichen начин, а съединението (4-F)Phe-Mem по noncentrosymetrichen начин. Асиметричните единици на двете изследвани съединения са показани на Фиг. 25 и Фиг. 26. Дължините на връзките и ъглите на двете молекули са сравними (Таблицы 8 и 9). Ароматната пръстенна система, присъстваща в молекулата (4-F)Phe-Mem е по същество плоска с rmsd от 0.002 Å. Наслояването на двете молекули показва, че геометрията на мемантина е добре запазена.



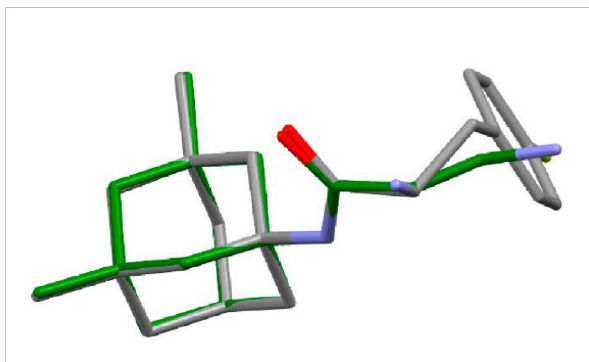
Фиг. 25. Изглед на асиметричната единица β -Ала-Мет заедно със схемата за номериране на атоми.



Фиг. 26. Изглед на асиметричната единица (4-F)Phe-Мет и приложената номерация.

3.2.2 Изследване на кристалната структура на новосинтезираните съединения

Регистрираните разлики в молекулната кристална структура на β -Ala-Mem и (4-F)Phe-Mem са незначителни. При наслагване на мемантиновия остатък в двете молекули се вижда, че в аминокиселинните фрагменти са ориентирани по различен начин. (Фиг. 27)



Фиг.27. Наслагване молекулите на β -Ala-Mem и (4-F)Phe-Mem на базата на идентичната мемантинова част.

Имайки предвид сходството в дължини на връзки и валентни ъгли, трябва да се очаква двете съединения да имат подобни свързващи взаимодействия –водородни връзки. Основните различия между двете структури се дължат на разлики в страничните вериги. Всъщност и в двете структури междумолекулните водородни връзки N-H...O (Таблица 10) стабилизират тримерната структура на молекулите. В кристалната структура на (4-F)Phe-Mem и β -Ala-Mem присъства и трифлуороацетатен йон, която говори за йонна структура между протонираната свободна аминогрупа на двете съединения и трифлуороацетатния йон. В (4-F)Phe-Mem присъства една молекула разтворител – вода.

Таблица 10. Геометрия на водородните връзки (Å и градуси) (A) за β -Ala-Mem и (B) за (4-F)Phe-Mem

A) β -Ala-Mem

D-	H	A	d(D-H)/Å	d(H...A)/Å	d(D...A)/Å	D-H...A/°
N2-	H2A	O1 ¹	0.89	1.87	2.725(5)	161.1
N2-	H2B	O15 ²	0.89	1.92	2.725(5)	149.3
N2-	H2C	O4 ³	0.89	1.93	2.788(5)	162.3
N3-	H3	O4	0.86	2.12	2.908(5)	151.5
C6-	H6A	O1	0.97	2.61	3.169(6)	117
C8-	H8B	F2	0.97	2.56	3.467(9)	155.9
C14-	H14B	O1	0.97	2.45	3.047(6)	119.5

B) (4-F)Phe-Mem

D-	H	A	d(D-H)/Å	d(H...A)/Å	d(D...A)/Å	D-H...A/°
N2-	H2A	O11 ¹	0.89	2.15	2.916(9)	144.3
N2-	H2B	O8 ²	0.89	1.91	2.766(8)	161.2
N2-	H2C	O8	0.89	2.04	2.868(10)	153.9
N3-	H3	O41	0.86	2.1	2.942(8)	164.5
C7-	H7	O4 ¹	0.98	2.57	3.441(9)	147.3
C23-	H23B	O1	0.97	2.5	3.071(10)	117.8

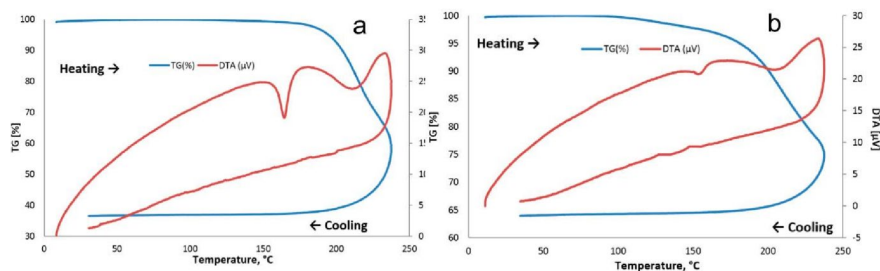
3.2.3. Термично поведение на молекулите

Термичното поведение на съединенията (4-F)Phe-Mem и β -Ala-Mem е изследвано в температурен интервал между стайната температура и 250°C с помощта на DTA – TG – DTG анализ (Фиг.28).

За β -Ala-Mem (Фиг. 28A) измерването на DTA показва бавен ендотермичен ефект при 150–170 ° C без загуба на маса по TG кривата. Такъв ендотермичен ефект може да бъде свързан с точка на топене на съединението. Втори ендотермичен ефект се открива при по-високи температури от 200-250 ° C.

Вторият ефект е придружен от загуба на маса и може да бъде свързан с разлагане на β -Ala-Mem. По същия начин за (4-F)Phe-Mem (Фиг. 28B), измерването на DTA показва два ендотермични ефекта: първият е в диапазона 150-170 ° C, а вторият 200-250 ° C. Първият ендотермичен ефект е придружен от ~ 3% загуба на тегло, което съответства на загуба на водна молекула и е в съгласие с кристалната структура – вижда се, че

в кристалната структура на Фиг. 25 присъства една молекула вода. Вторият DTA ефект е свързан с изразена загуба на тегло и по всяка вероятност има разлагане на (4-F)Phe-Mem. Двата процеса - топене и разлагане - не могат да бъдат ясно разделени, защото се застъпват.



Фиг. 28. DTA-TG криви: β -Ala-Mem; (4-F)Phe-Mem.

3.3. Определяне на химичната стабилност и антиоксидантна активност на мемантиновите хибриди

3.3.1. Хидролитична стабилност

Предлекарствата са съединения, които улесняват преноса на лекарството през клетъчните мембрани и липидни бариери, и поддържане на оптималната му концентрация в клетките по-продължително време. Изследваната серия от съединения включва мемантин, модифициран със следните аминокиселини: аланин, β -аланин, глицин, фенилаланин и валин.

Изследвана е хидролитичната стабилност на новите аналози на мемантин с аминокиселини, при различно рН, съответстващо на човешките биологични течност.

Хидролитичната стабилност се определя при две различни стойности на рН - 2,0 и 7,4, при 37 °С, аналогично на тези в човешкия стомах и кръвната плазма. В това изследване е приложен специално разработен UV-VIS спектрофотометричен метод [101] за количествено определяне на концентрациите на непроменените съединения.

Установено е, че при описаните експериментални условия всички амиди подлежат на хидролиза. Хидролизата следва кинетика от първи порядък и скоростните константи (k) са получени като наклони от полулогаритмичните графики на непроменената концентрация на амида спрямо времето. Химическата стабилност е оценена с помощта на времето на полуреакцията $t_{1/2} = \ln 2/k$ (Таблица 11 и 12).

В настоящото изследване стойностите на R^2 за линейни и логаритмични кинетични криви не се различават значително, както може да се очаква предвид тесния обхват от концентрации. Сравнявайки данните от предварителните експерименти и окончателните изследвания, са открити разлики между наклоните на линейните кинетични криви. Тъй като скоростната константата във всички кинетични модели трябва да е независима от промените в концентрацията, се приема кинетика от първи или псевдо-първи порядък. Стойностите на скоростните константи са получени като наклон на линията на линейна регресия в координатите $\ln(C/C_0)$ спрямо t .

Val-MEM е най-стабилното съединение в неутрална среда и при 37°C – $t_{1/2} = 50,2$ часа ($t_{1/2}$ време на полуразпад). Съединението Phe-MEM също има много добра хидролитична стабилност – $t_{1/2} = 29,6$ часа. Редът на намаляваща хидролитична стабилност на съединенията е: Val-MEM >> Phe-MEM >> Ala-MEM $\approx$ β -Ala-MEM > Gly-MEM.

Ala-MEM и Gly-MEM са най-стабилните при $\text{pH}=2$ с почти идентични стойности за $t_{1/2} = 17,8$ часа и $t_{1/2} = 16,3$ часа съответно. Стабилността на тестваните съединения в кисели условия е относително по-малка, отколкото в неутрални. Редът на стабилност е следния: Ala-MEM $\approx$ Gly-MEM > Val-MEM $\approx$ Phe-MEM $\approx$ β -Ala-MEM (Таблица 11 и 12).

Всички съединения имат относително добра хидролитична стабилност – около и над 10 часа както в неутрална, така и в кисела среда. Това е напълно достатъчно, за да преминат в кръвообращението и да се използват като потенциални предлекарства.

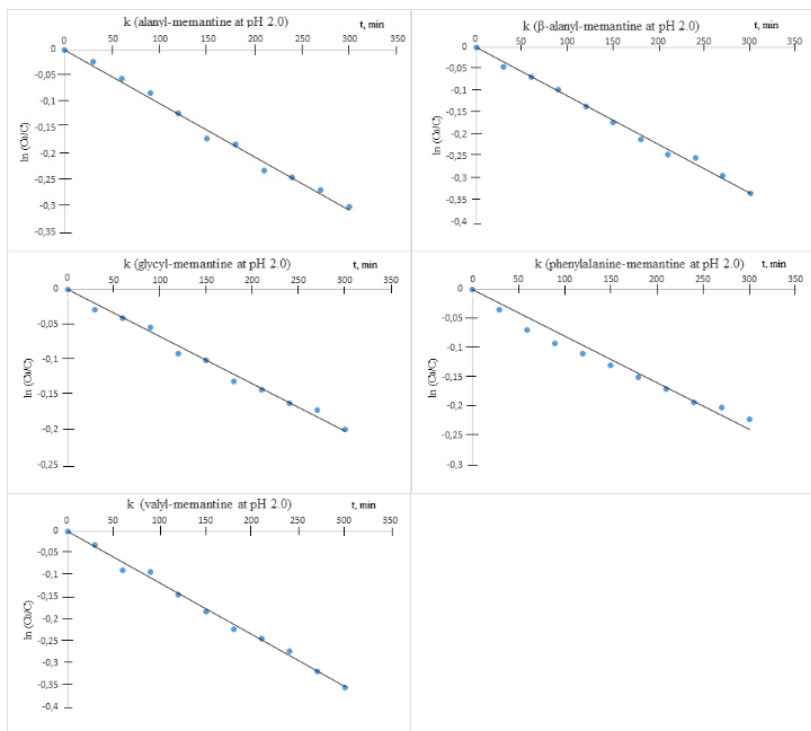
Таблица.11. Данни за стабилността на мемантинови
производни с аминокиселини при кисело рН

Съединение/среда	k	T _{1/2} h	R ²
Ala-Mem / pH 2.0; 37°C /	-0.00103±0.00006	17.8±0.5	0.9919
β-Ala-Mem / pH 2.0; 37°C/	-0.00109±0.00004	9.9±0.2	0.9951
Gly-Mem / pH 2.0; 37°C/	-0.00065±0.00004	16.3±0.7	0.9908
Phe-Mem / pH 2.0; 37°C/	-0.00071±0.00006	10.6±0.2	0.9836
Val-Mem / pH 2.0; 37°C/	-0.00117±0.00006	11.2±0.3	0.9943

Таблица.12. Данни за стабилността на мемантинови
производни с аминокиселини при неутрално рН

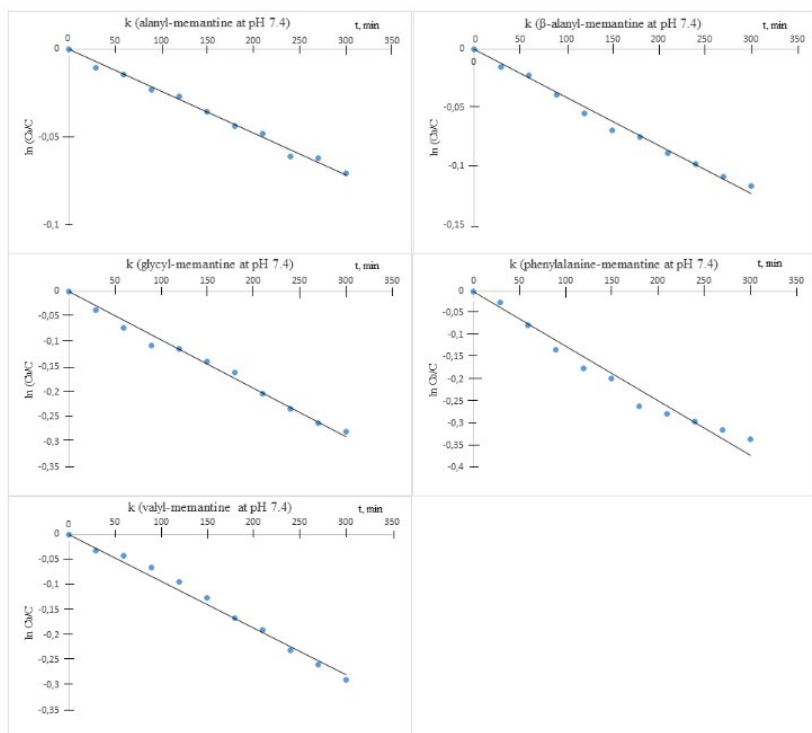
Съединение/среда	k	T _{1/2} h	R ²
Ala-Mem / pH 7.4; 37°C/	-0.00023±0.00002	12.7±0.4	0.9928
β-Ala-Mem / pH 7.4; 37°C/	-0.00039±0.00002	11.8±0.4	0.9922
Gly-Mem / pH 7.4; 37°C/	-0.00091±0.00006	9.9±0.6	0.9908
Phe-Mem / pH 7.4; 37°C/	-0.00117±0.00014	29.6±0.8	0.9693
Val-Mem / pH 7.4; 37°C/	-0.00098±0.00006	50.2±2.2	0.9914

Химическата стабилност се оценява чрез времето на полуразпад $t_{1/2} = \ln 2/k$ (Таблица 11 и 12). Хидролитичната стабилност на измерванията разкрива, че съединенията са относително стабилни в кисела рН (Фигура 29).



Фиг. 29. Промяна на концентрацията на изследваните мемантинови производни с времето при рН 2.0.

При тези условия всички наблюдавани полуживоти са повече от 10 часа. Всички тествани съединения също са стабилни при рН 7,4 (Фигура 30).



Фиг. 30 Промяна на концентрацията на изследваните мемантинови производни с времето при рН 7.4.

3.3.2. *In vitro* антиоксидантна активност

3.3.2.1. Радикало-улавящо действие на мемантинови хибриди спрямо 1,1-дифенил-2-пикрилхидразилов радикал (DPPH-тест)

DPPH• тестът се използва като първоначално изследване за установяване на антиоксидантен потенциал на съединенията, тъй като се характеризира с висока възпроизводимост, ниска цена и е лесен за изпълнение. За целта бе приложена модифицирана методика на Nenadis N.

DPPH-тестът на седемте производни е представен в Таблица 13.

Таблица 13. Радикал-улавящо действие (спрямо DPPH•)

No.	Съединения	5 μM	10μM	25μM	50μM	100 μM
		% Antioxidant activity				
1.	Gly-MEM	1,2±0,29	2,4±0,18	2,6±0,09	2,7±0,25	3,6±0,40
2.	Ala-MEM	1,3±0,27	2,4±0,08	2,7±0,08	3,0±0,17	3,4±0,27
3.	β-Ala-MEM	1,1±,012	1,1±0,36	1,1±0,18	1,2±0,05	2,3±0,20
4.	Val-MEM	1,2±0,12	2,3±0,05	3,3±0,68	3,5±0,35	3,6±0,18
5.	Phe-MEM	1,3±0,36	2,3±0,35	3,5±0,33	3,7±0,18	3,7±0,15
6.	(4-F)Phe-MEM	1,4±0,07	2,5±0,04	3,7±0,09	3,8±0,05	4,0±0,20
7.	Gly-Gly-MEM	1,3±0,13	2,4±0,20	3,7±0,06	4,0±0,09	4,0±0,18
	Ascorbic acid	63,6±0,10	74,3±0,31	75,8±0,78	91,4±0,45	95,7±051

Радикал-улавящият потенциал на тестваните вещества е сравнен с този на аскорбиновата киселина. Данните показват, че всички вещества имат незначителен ефект, върху намаляване концентрацията на DPPH•.

3.3.2.2. Генерираща система на супероксидни анион радикал ($O_2^{\cdot-}$)

Въпреки че супероксид-анион радикалът ($O_2^{\cdot-}$) е по-малко токсичен от хидроксилния, той също е сред вредните реактивни кислородни видове, тъй като е прекурсор за генериране на други по-реактивни кислородни и азотни видове.

Данните за активност срещу супероксид-анион радикали на тестваните хибриди на мемантина са представени в Таблица 14. Мемантинът не е в състояние да намали концентрацията на $O_2^{\cdot-}$ [103]. Тестваните амиди показват също ниска активност спрямо $O_2^{\cdot-}$. Само Phe-Mem, (4-F)Phe-Mem, и Gly-Gly-Mem имат забележима активност спрямо супероксид-анион радикала.

Таблица 14. Активност на мемантиновите хибриди спрямо супероксид-анион радикал

No.	Съединения	25μM	50μM	100 μM
		% Antioxidant activity		
1.	Gly-MEM	0	1,5±0,16	1,75±0,15
2.	Ala-MEM	0	1,5±0,27	1,5±0,16
3.	β-Ala-MEM	0	1,0±0,01	1,5±0,05
4.	Val-MEM	0	2,0±0,035	2,25±0,035
5.	Phe-MEM	0	4,0±0,05	9,0±0,10
6.	(4-F)Phe-MEM	0	7,5±0,30	10,0±0,55
7.	Gly-Gly-MEM	0	8,5±0,50	12,0±0,75
	Ascorbic acid	5.0±0.01	37,0±0,10	65,0±0,15

3.3.2.3. Радикал-улавяща активност спрямо хидроксидов радикал ($\bullet\text{OH}$)

Друг метод, приложен за оценка на антиоксидантната активност на новополучените хибриди е изследване на активността им спрямо хидроксидовите радикали ($\bullet\text{OH}$). Последните са най-активните окисляващи радикали, които взаимодействат с биологичните молекули и причиняват различни нежелани увреждания на биомолекулите, което дава началото на ред важни заболявания сред които и невродегенеративните процеси [104].

Синтезираните мемантинови хибриди са изследвани в система, съдържаща $\bullet\text{OH}$, получени от H_2O_2 с помощта на Fe(II)-EDTA комплекс. Получените резултати са представени в Таблица. 15. Установено е, че производното на мемантина, съдържащо Phe, намалява деструктивният ефекта на хидроксидовите радикали върху дезоксирибозата.

Таблица 15. Активност на мемантинови производни за
отстраняване на хидроксидови радикали

No.	Съединения	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M
		% Antioxidant activity				
1.	Gly-MEM	0,12 $\pm$ 0,00 9	0,15 $\pm$ 0,006	0,8 $\pm$ 0,010	0,88 $\pm$ 0,009	0,78 $\pm$ 0,069
2.	Ala-MEM	0,03 $\pm$ 0,00 0	0,68 $\pm$ 0,009	0,07 $\pm$ 0,00	0,44 $\pm$ 0,035	0,85 $\pm$ 0,09
3.	β -Ala-MEM	0,09 $\pm$ 0,00 1	0,41 $\pm$ 0,004	0,44 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,04	0,49 $\pm$ 0,14
4.	Val-MEM	0,11 $\pm$ 0,00 5	0,17 $\pm$ 0,005	0,33 $\pm$ 0,09	0,39 $\pm$ 0,07	0,36 $\pm$ 0,12
5.	Phe-MEM	4,66 $\pm$ 0,35	5,32 $\pm$ 0,68	6,00 $\pm$ 0,20	10,25 $\pm$ 0,95	16,75 $\pm$ 1,18
6.	(4-F)Phe-MEM	3,54 $\pm$ 0,17	4,34 $\pm$ 0,35	5,74 $\pm$ 0,25	8,99 $\pm$ 0,45	12,86 $\pm$ 0,75
7.	Gly-Gly-MEM	1,44 $\pm$ 0,15	2,41 $\pm$ 0,09	4,57 $\pm$ 0,17	6,91 $\pm$ 0,90	7,51 $\pm$ 0,69

3.3.2.4. Изследване на хелиращи ефекти

Определянето на хелиращия ефект на веществата има пряко отношение към антиоксидантния потенциал, защото чрез хелатно свързване на прооксидантните йони на преходни метали може директно да се намали скоростта на генерирането на активни радикали, което е форма на антиоксидантна активност.

В организмите йоните на преходните метали катализират реакцията на Fenton – разпадане на H_2O_2 до хидроксидови радикали. Ето защо, в присъствието на съединения, които свързват в устойчиви комплекси йоните на преходните метали Fe^{2+} и Cu^+ биха могли да се преодолеят окислителните увреждания.

За да се определи хелатиращият потенциал на новосинтезираните хибриди, бе приложена генерираща система с дезоксирибоза като детекторна молекула, Fe^{2+} и H_2O_2 .

Хелатиращите ефекти при нарастващи концентрации на изследваните вещества са представени в Таблица 16.

Таблица 16. Хелатиращ антиоксидантен ефект на мемантинови хибриди с аминокиселини в проценти

No.	Съединения	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M
1.	Gly-MEM	0,83 $\pm$ 0,09	2,07 $\pm$	2,72 $\pm$ 0,12	2,90 $\pm$ 0,69	3,67 $\pm$ 0,79
2.	Ala-MEM	0,83 $\pm$ 0,10	2,48 $\pm$ 0,75	3,09 $\pm$ 0,15	3,25 $\pm$ 0,12	3,95 $\pm$ 0,57
3.	β -Ala-MEM	0,22 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,12	0,58 $\pm$ 0,05	0,76 $\pm$ 0,11	1,24 $\pm$ 0,25
4.	Val-MEM	0,69 $\pm$ 0,15	0,62 $\pm$ 0,13	1,66 $\pm$ 0,10	2,79 $\pm$ 0,03	3,03 $\pm$ 0,96
5.	PhE-MEM	1,14 $\pm$ 0,15	2,38 $\pm$ 0,35	5,25 $\pm$ 0,25	8,50 $\pm$ 0,10	11,21 $\pm$ 1,07
6.	(4-F)Phe-MEM	1,34 $\pm$ 0,13	2,41 $\pm$ 0,25	3,28 $\pm$ 0,25	7,38 $\pm$ 0,25	9,14 $\pm$ 0,69
7.	Gly-Gly-MEM	1,00 $\pm$ 0,13	1,00 $\pm$ 0,05	3,45 $\pm$ 0,20	4,03 $\pm$ 0,35	7,79 $\pm$ 0,51

3.3.3. Физико-химични параметри, свързани с кинетиката и динамиката на новосинтезираните съединения

3.3.3.1 Разтворимост

От първостепенно значение за всяко лекарство е неговата разтворимост. Тя е определяща за разпределението му, а от това зависи и фармакокинетиката на лекарството. Разтворимостта оказва значително влияние върху проникването на лекарството от червата в кръвта – процеси като абсорбция, филтрация, дифузия и др. Ниската разтворимост на всяко бъдещо лекарство води до ниска бионаличност, нежелани странични ефекти и в резултат на това – ниска терапевтична ефективност. Следователно преди всички по-нататъшни изследвания за намиране на нови лекарства трябва да търсят съединения с подходяща разтворимостта в разтворители, симулиращи биологична среда. Такива са водните буферните разтвори с рН 2.0 и рН 7.4, като модели на стомашното съдържание и кръвната плазма и n-хексана и 1-октанола, като модел на липидните образувания (клетчните мембрани) в организма.

Таблица 17. Температурна зависимост на разтворимостта, X_2 [mol. fraction] и S_2 [mol·L⁻¹] на изследваните съединения в буферни разтвори с pH 7.4 и pH 2.0 молна част

Gly-Mem				
T[K]	Buffer pH 7.4		Buffer pH 2	
	X ₂ .10 ⁴	S ₂ .10 ²	X ₂ .10 ³	S ₂ .10 ¹
293.15	4.49	2.48	3.12	1.67
298.15	4.88	2.69	3.87	2.05
303.15	5.44	3.00	4.57	2.39
310.15	5.90	3.26	5.73	2.98
315.15	6.31	3.48	6.85	3.51
A ^a	2.24±0.20		6.54±0.36	
Ba	1602±60		3607±108	
Rb	0.9979		0.9987	
σ ^c	3.26.10 ⁻⁴		1.04.10 ⁻³	
Val-Mem				
T[K]	Buffer pH 7.4		Buffer pH 2	
	X ₂ .10 ⁴	S ₂ .10 ²	X ₂ .10 ³	S ₂ .10 ²
293.15	2.12	1.17	1.24	6.75
298.15	2.46	1.36	1.39	7.58
303.15	2.88	1.59	1.65	8.95
310.15	3.32	1.83	1.90	10.25
315.15	3.79	2.09	2.17	11.71
A ^a	0.68±0.09		2.29±0.09	
B ^a	2676±26		2636±81	
R ^b	0.9979		0.9986	
σ ^c	5.91.10 ⁻⁵		5.90.10 ⁻⁴	
β-Ala-Mem				
T[K]	Buffer pH 7.4		Buffer pH 2	
	X ₂ .10 ⁴	S ₂ .10 ²	X ₂ .10 ³	S ₂ .10 ¹
293.15	1.25	6.95	6.84	3.77
298.15	1.49	8.29	8.41	4.62
303.15	1.69	9.37	10.30	5.64
310.15	2.01	11.12	12.50	6.85
315.15	2.34	12.95	14.60	7.97
A ^a	0.67±0.28		4.72±0.24	
B ^a	1602±60		3517±72	
R ^b	0.9987		0.9984	
σ ^c	6.41.10 ⁻⁴		4.65.10 ⁻⁴	
Phe-Mem				
T[K]	Buffer pH 7.4		Buffer pH 2	
	X ₂ .10 ⁴	S ₂ .10 ²	X ₂ .10 ³	S ₂ .10 ¹
293.15	1.20	6.68	1.46	0.811

298.15	1.45	8.03	2.13	1.18
303.15	1.74	9.64	2.64	1.47
310.15	2.03	11.30	3.67	2.04
315.15	2.43	13.50	4.62	2.57
A ^a	-0.38±0.13 3207±40 0.9998 1.45.10 ⁻⁴		6.74±0.78 5227±235 0.9970 4.96.10 ⁻³	
B ^a				
R ^b				
σ ^c				
Tyr-Mem				
T[K]	Buffer pH 7.4		Buffer pH 2	
	X ₂ .10 ⁴	S ₂ .10 ²	X ₂ .10 ³	S ₂ .10 ¹
293.15	2.62	1.45	2.88	1.52
298.15	2.97	1.64	3.33	1.75
303.15	3.23	1.79	3.88	2.01
310.15	3.54	1.95	4.38	2.26
315.15	3.91	2.17	4.98	2.54
A ^a	-2.03±0.22 1819±66 0.9981 3.84.10 ⁻⁴		2.74±0.14 2516±43 0.9997 1.68.10 ⁻⁴	
B ^a				
R ^b				
σ ^c				

^a parameters of the correlation equation: $\ln(X_2) = A - B/T$; ^b R – pair correlation coefficient; ^c σ – стандартно отклонение.

Таблица 18. Функция на термодинамичната разтворимост на съединенията в буферни разтвори с pH 7.4 и pH 2.0, при 298.15

Съединения	ΔG^0_{sol} kJ.mol ⁻¹	ΔH^0_{sol} kJ.mol ⁻¹	$T\Delta S^0_{sol}$ kJ.mol ⁻¹	ΔS^0_{sol} J.mol ⁻¹ .K ⁻¹	ΔG^0_{sol} JkJ.mol	ΔH^0_{sol} kJ.mol ⁻¹	$T\Delta S^0_{sol}$ kJ/mol ⁻¹	ΔS^0_{sol} J.mol ⁻¹ .K ⁻¹
	Buffer pH 7.4				Buffer pH 2.0			
Gly-Mem	18.9	13.3 ±3.3	-5.6	-18.8 ± 1.1	13 .8	30.0 ±0.0	16.2	54.3 ±4.3
Val-Mem	20.6	22.2 ±2.2	1.6	5.4 ± 0.2	16 .3	21.9 ±1.9	5.6	18.8 ±8.8
β-Ala-Mem	21.8	23.5 ±3.5	1.7	5.7 ± 0.3	17 .6	29.2 ±9.2	11.6	38.9 ±8.9
(4-F)Phe-Mem	27.6	26.7 ±6.7	-0.9	-3.0 ± 0.1	26 .7	43.5 ±3.5	16.8	56.2 ±6.2
Tyr-Mem	20.1	15.1 ±5.1	-5.0	-16.8 ± 0.9	14 .1	20.9 ±0.9	6.8	22.8 ±2.8

Проведени са експерименти за изследване на разтворимостта в п-хексан, но съединенията са неразтворими в него дори при температура 318.15 K. Поради тази причина не е възможно да се извлекат статистически значими резултати. От друга страна изследванията в 1-октанол също не бяха успешни, поради прекомерно голямата им

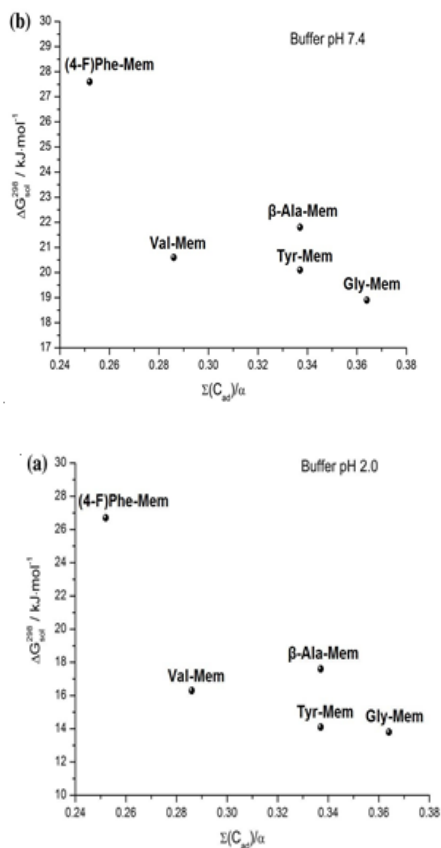
разтворимост в този разтворител. Резултатите от температурната зависимост на разтворимостта в буферни разтвори с pH 2.0 и pH 7.4 са представени в Таблица 17. и Таблица 18. са представени изчислените стойности на измененията на свободната енергия на Гибс, енталпията и ентропията (умножена по абсолютната температура) при разтваряне.

Изследваните мемантинови производни притежават йонизирани се функционални групи в техните структури. Йонизационните константи на съединенията бяха изчислени с помощта на програмата ACD/ChemSketch. Анализът на равновесието между йонизирано и нейонизирано състояние на молекулите беше проведен въз основа на Henderson-Hasselbalch подхода, с използването на пакет програми представен от Borodin et al. [105].

Разтворимостта в киселинен буферен разтвор (pH 2.0) е относително по-висока, спрямо тази във фосфатния буфер с близко до неутралното pH – 7.4. Това се отнася за всички съединения и е в съгласие с добре познатото правило, че по-полярните или йонизирани форми на съединенията са по-добре разтворими във водна среда.

Направен е опит да се намери връзката между изменението на енергията на Гибс при разтваряне (ΔG^{298}) и някои физикохимични показатели. Основната цел на такова проучване е свързана с идеята да се изгради алгоритъм, който да предвижда експериментални резултати на базата на данните за молекулната структура. Данните са анализирани по отношение на 32 показателя (интегрирани в HUBOT). Подходяща корелация между резултатите за разтворимост при pH=2.0. е получена с отчитане на независима променлива, която отчита донорно-акцепторната способност на молекулата – възможността да се осъществят водородни връзки с молекулите на разтворителя, разделена на молекулната поляризуемост ($\sum C_{ad})/\alpha$).

Резултатите от анализа са обобщени на Фиг. 31а. В нашия случай не може да се получи адекватно уравнение на корелацията поради малкия брой синтезирани и изследвани за разтворимост съединения. Въпреки това връзката между промяната на разтворимостта и изменението на избраните показатели е съвсем ясна: с увеличаване стойността на изменението енергията на Гибс при разтваряне (ΔG^{298}) разтворимостта се понижава. Сходни са резултатите за разтворимостта в буферния разтвор с pH 7,4 (Фиг.31).



Фиг. 31. Зависимост между изменението на свободната енергията на Гибс при разтваряне (ΔG_{sol}^{298}) и показателя за донорно-акцепторни взаимодействия в молекулите ($\Sigma(C_{ad})/\alpha$) за буфери с рН 2,0 (а) и рН 7,4 (б).

3.3.3.2. Разпределение на веществата в различни среди

Един от важните процеси, играещи ключова роля при приема на лекарства, е разпределението на веществата в различните тъкани. Обикновено този процес е в съответствие с началните етапи на абсорбция, които предхождат дифузионните процеси (пасивен транспорт). Различните пътища за доставяне на лекарства в мембраните (трансцелуларни или парацелуларни) се определят и от характеристиките на разпределението. С други думи, процесите на

разпределение описват хидрофилно-липофилния баланс на молекулата. В тази част от експериментите бяха изследвани процесите на разпределение в несмесващи се среди, като модел на различни видове биологични мембрани. По-специално системата 1-октанол/воден буфер (pH 7,4) описва процесите, протичащи в мембраните на стомашно-чревния тракт, докато системата хексан/воден буфер (pH 7,4) – в кръвно-мозъчната бариера. За съжаление, поради ниската разтворимост на изследваните вещества в хексан, не успяхме да проучим процесите на разпределение в системата хексан/буфер (pH 7,4). Резултатите от проведените експерименти са представени в Таблица 19.

Таб.19. Експериментални стойности на коефициентите на разпределение в n-октанол/вода (pH 7.4) ($D^{oct/buf}$), начална концентрация на донорния разтвор (C_0^{donor}), видими коефициенти на пропускливост (P_{app}) на изследваните съединения, донорно-акцепторна способност на молекулата – създаване водородни връзки ($\Sigma(C_{ad})$), донорно-акцепторна способност на молекулата да създава водородни връзки, пригодени спрямо молекулярната поляризуемост ($\Sigma(C_a)/\alpha$).

Съединения	$D^{oct/buf}$	$\log(D^{oct/buf})$	C_0^{donor} mol/l ⁻¹	$P_{app} \cdot 10^5$ cm.sec ⁻¹	$\log(P_{app})$	$\Sigma(C_{ad})$	$\Sigma(C_a)/\alpha$
Gly-Mem	78.2 ± 0.4	1.890	1.190·10 ⁻²	17.14 ± 0.23	-3.77	9.88	0.196
Val-Mem	73.6 ± 0.5	1.867	1.107·10 ⁻²	20.97 ± 1.48	-3.68	9.32	0.146
β-Ala-Mem	86.8 ± 2.8	1.938	4.255·10 ⁻³	7.138 ± 0.272	-4.15	9.76	0.179
(4-F)Phe-Mem	5484 ± 258	3.739	3.672·10 ⁻⁴	7.303 ± 0.089	-4.14	9.72	0.134
Tyr-Mem	923 ± 32	2.948	2.099·10 ⁻³	3.628 ± 0.115	-4.44	13.1	0.154

Както се вижда на Таблица 19, коефициентите на разпределение на изследваните производни на мемантин с система n-октанол/ буфер (pH 7,4) ($D^{oct/buf}$) са разположени в диапазона от 73,62 до 5483,66 ($D^{oct/buf}$ от 1,87 до 3,74). Това е в съгласие с оптималния интервал на липофилност ($\log D^{oct/buf} = 1-3$), което означава добра чревна абсорбция, поради добрия баланс на разтворимост и пасивна дифузионна пропускливост. Съединения Gly-Mem, Val-Mem, β-Ala-Mem и Tyr-Mem притежават добри характеристики на липофилност. Изследваните производни на мемантина могат да бъдат подредени по нанаяване на стойността на $\log D^{oct/buf}$ в следния ред: (4-F)Phe-Mem ≥ Tyr-Mem ≥ β-Ala-Mem ≥ Gly-Mem ≥ Val-Mem. Сравнителният анализ ясно показва, че увеличаването обема на молекулата с бензенов заместител води до съществено увеличаване на липофилността –

приблизително 69 пъти и 12-кратно при (4-F)Phe-Mem и Tyr-Mem съответно.

3.3.3.3 Мембранна пропускливост

За да се оцени зависимостта между структурата на мемантиновите производни и тяхната способност да проникват през биологичните мембрани, с помощта на дифузионната клетка на Франц бяха определени коефициентите на пропускливост през новата мембрана Permeapad™. Стойностите на коефициентите на пропускливост са представени в Таблица 17. Експериментът за пропускливост разкрива много близки стойности на коефициентите на пропускливост за производни Gly-Mem и Val-Mem. При това се наблюдава минималната стойност за съединение Tyr-Mem, което може да се обясни с присъствието на ОН група, прикрепена към бензеновото ядро, която при рН 7.4 лесно би се дисоциирала. Добре известно е, че йонизираните молекули притежават по-слаба проникваемост в сравнение с незаредените. Увеличаването коефициентите на пропускливост на съединенията е в следната последователност: Val-Mem $\geq$ Gly-Mem > (4-F)Phe-Mem > β -Ala-Mem > Tyr-Mem.

3.4. Изследване на невропротективно действие *in vitro* на новосинтезираните съединения

В етиологията на AD съществуват различни фактори, които играят ключова роля в патофизиологичната прогресия: $A\beta$ натрупвания, хиперфосфорилирането на *tau* протеина, нарушението на хомеостазата на металните йони, екситотоксичността, оксидативният стрес, невровъзпалението и дисфункция на невротрансмитерната система [106]. Разглеждайки сложната патогенеза на заболяването, дизайнът на многоцелевите лиганди (MTDL), насочени едновременно към няколко мишени се очаква да бъдат по-успешен подход от монотерапията.

В тази връзка хибридните мемантинови структури са проучени *in vitro* за невропротективни ефекти на устойчивост към $A\beta$ токсичност, екситотоксичност, оксидативен стрес, хипоксия и невровъзпаление.

3.4.1. Невропротективни ефекти на мемантинови производни в APPswe клетки, дължащи се на Cu^{2+} - индуцираната $A\beta$ токсичност (A)

Като клетъчен модел на AD при това изследване са използвани APPswe клетки, свъръхекспресиращи шведската мутантна форма на човешки APP (амилоид прекурсорен протеин). Известно е, че йоните на преходните метали (напр. медните йони), участват в образуването и

невротоксичността на $A\beta$ разновидностите [107, 108]. С цел да се индуцира $A\beta$ -невротоксичност се прилагат Cu^{2+} йони [109].

Резултатите показват, че изследваните съединения имат относително благоприятен невропротективен ефект. Те поддържат жизнеспособността на невронните клетки, при бета-амилоид ($A\beta$) индуцирана цитотоксичност, в присъствието на медни йони, показвайки стойности на EC_{50} , вариращи от (0.218 ± 0.129) nM до (44.87 ± 9.30) μ M (Таблица 20, А).

В сравнение с референтното вещество (мемантин хидрохлорид), (4-F)Phe-Mem демонстрира сравнително еквивалентен невропротективен ефект в наномоларна концентрация, докато Tyr-Mem показва много по-добри невропротективни свойства със стойности на EC_{50} от (0.218 ± 0.129) nM. Тези резултати демонстрират, че само аминокиселинните производни на мемантина имат невропротективна активност срещу $A\beta$ -медирана невротоксичност.

Таблица 20. Стойности на ефективната концентрация (EC_{50}) и инхибиращата концентрация (IC_{50}) на изследваните съединения, сравнени със стойностите на мемантин

Съединени	$CuSO_4$ EC_{50} (μ M)	L -Glu EC_{50} (μ M)	H_2O_2 EC_{50} (μ M)	$CoCl_2$ EC_{50} (μ M)	TNF- α IC_{50} (μ M)	IL-6 IC_{50} (μ M)
	A	B	C	D	E	F
Gly-Mem	22.87 ± 1.89	31.33 ± 3.29	12.92 ± 0.74	0.74 ± 0.13	21.75 ± 3.88	26.10 ± 0.68
Val-Mem	44.87 ± 9.30	0.71 ± 0.06	19.07 ± 0.80	0.23 ± 0.07	53.23 ± 3.18	58.77 ± 0.66
β -Ala-Mem	33.17 ± 9.54	36.89 ± 10.86	> 100	0.12 ± 0.05	40.12 ± 1.29	42.39 ± 4.82
(4-F)Phe-Mem	$1.26 \times 10^{-2} \pm 0.86 \times 10^{-2}$	$4.13 \times 10^{-3} \pm 0.23 \times 10^{-3}$	0.62 ± 0.47	0.41 ± 0.06	0.023 ± 0.016	0.26 ± 0.03
Tyr-Mem	$2.18 \times 10^{-4} \pm 1.29 \times 10^{-4}$	$8.85 \times 10^{-3} \pm 0.92 \times 10^{-3}$	9.16 ± 1.68	0.56 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.97 ± 0.02
Mem.HCl	$8.34 \times 10^{-3} \pm 0.51 \times 10^{-3}$	$1.03 \times 10^{-3} \pm 0.16 \times 10^{-3}$	1.07 ± 0.36	0.12 ± 0.05	0.08 ± 0.02	0.14 ± 0.01

3.4.2. Невропротективни ефекти на мемантинови хибриди срещу NMDA-индуцирана токсичност (B)

Доказано е, че повишените нивата на екстрацелуларния глутамат са токсични за невроните в патологичния процес, наречен екситотоксичност. Тя участва в дефицитите на Алцхаймер, поради продължително активиране и постсинаптичните сигнализиращи компоненти на йонотропните глутаматни рецептори, от които основна роля играят NMDA (*N*-метил-*D*-аспартат) рецепторите [110].

Клетките SH-SY5Y бяха използвани за индуциране на екситотоксичността с NMDA при концентрация 100 nM [111]. За изследване на неврозащитните ефекти спрямо NMDA-индуцираната токсичност се приложен MTS-тест, а за оценка на ефикасността на мемантиновите производни се съди по EC₅₀.

Резултатите на аминокиселинните мемантинови хибриди (B, Таблица 20) показват, че съединенията имат положителен ефект върху клетъчната жизнеспособност на SH-SY5Y клетки, подложени на *L*-Glu. EC₅₀ варира от (4.13 ± 0.23) nM до (36.89 ± 10.86) μM. По-конкретно, съединенията 4-F-Phe-Mem и Tyr-Mem показват приблизително еквивалентни на положителната контрола на мемантина невропротективни ефекти.

3.4.3. Невропротективни ефекти на мемантинови хибриди срещу индуцирана с H₂O₂ токсичност (C)

Известно е, че оксидативният стрес се свързва тясно с възрастовата невродегенерация при AD [112], при което се наблюдава значително натрупване на Aβ плаки [113].

Предполага се, че повишеният оксидативния стрес е причина за едни от най-ранните патологични промени в мозъка при когнитивни нарушения, дължащи се на AD [114]. Тъй като мемантиновите производни са ефективни за предотвратяване на глутамат-индуцирана токсичност, считаме, че техните ефекти е възможно да намаляват оксидативното увреждане на невроните, което е в корелация с прекомерното активиране на NMDA рецепторите до определна степен.

В Таблица 20 (C) ясно се откроява съединението (4-F)Phe-Mem, което показва около 2 пъти по-добро невропротективно действие (EC₅₀ 0.62±0.47 μM) в сравнение с референтното вещество мемантин (EC₅₀ 1.07±0.36 μM). Тези резултати предполагат, че някои от тестваните структурни производни на мемантин вероятно притежават антиоксидантна активност, което са в съответствие с благоприятното им действие при предизвиканата от глутамата клетъчна токсичност.

3.4.4. Невропротективни ефекти на мемантинови производни спрямо хипоксия-индуцирана токсичност (D).

По време на прогресирането на заболяването, постепенно снабдяването на мозъка с кислород намалява [115]. Протективният ефект на мемантиновите аналози срещу хипоксия (патологично състояние на кислороден дефицит в организма) бе изследван върху PC12 клетки, третиран с CoCl_2 [116].

Както е показано в Таблица 20 (D) повечето от съединенията показват отлична невропротективна активност със стойности на EC_{50} , вариращи от $0,12 \pm 0,05 \mu\text{M}$ до $0,74 \pm 0,13 \mu\text{M}$ спрямо референта мемантин. При това изследване се наблюдава корелация с антиоксидантните и антиекситотоксичните им свойства. Това показва, че тези структурни производни на мемантина вероятно имат мултифармакологични ефекти върху невроналните клетки.

3.4.5 Противовъзпалителни ефекти на мемантиновите производни срещу LPS-индуцирано възпаление в микроглиални клетки (E и F)

Невроналната дисфункция и синаптичното увреждане при AD се индуцират от $\text{A}\beta$ и са частично медирано от микроглия и астроцитно активиране, произвеждайки възпалителни цитокини и повишавайки нивата на $\text{A}\beta$ [117].

Фармакологичната супресия на невровъзпалението също се счита като възможен подход за профилактика и лечение на AD. EOC20 клетките стимулирани от LPS се използват за „имитиране“ на невровъзпалителна и невротоксична активация на микроглия. За изследване силата на мемантиновите производни върху инхибиторните ефекти на $\text{TNF-}\alpha$ и IL-6 (получени от EOC20 клетки, стимулирани от LPS) се използва ELISA тест.

Както е показано в Таблица 15 (E и F), изследваните аналози на мемантина имат способността да инхибират освобождаването на $\text{TNF-}\alpha$ и IL-6, като всички стойности на IC_{50} са помалки от $60 \mu\text{M}$. По-специално, съединенията 4-F-Phe-Mem и Tug-Mem показват благоприятна инхибиторна активност при освобождаване на $\text{TNF-}\alpha$ и IL-6, подобно на контролата мемантин. Тези резултати показват, че изследваните производни имат потенциален ефект върху невровъзпалително действие.

3.5. *In vivo* токсикологично характеризирание на новосинтезираните съединения

3.5.1. Остра токсичност

Използвани са бели мъжки ICR мишки с начално телесно тегло 20-22 g, *отглеждани в стандартните условия на вивариума в Института по невробиология-БАН* и всички експериментите са извършени в

съответствие с правилата на работа с експериментални животни (Наредба № 20 от 01.11.2012).

За експерименти *in vivo* бяха подбрани съединения от различни химични групи (Tyr-Mem, Cav-Mem), проявяващи най-обещаващи *in vitro* характеристики. Животните са третираны с посочените съединения, а за свидетели са използвани изходните вещества – мемантин, кавинтон, тирозин. Животните бяха адаптирани три дни в условията на вивариума. Всяка отделна група беше третирана с три възходящи токсични дози, по два броя в подгрупа. Инжекционният обем беше 0.1mL/10g. т.т. интраперитонеално (ип).

Животните бяха наблюдавани за токсични прояви до 1 час, до 6 час, до 24 и 48 час, когато се отчита смъртността в групите и се прави дисекция на труповете.

Други групи от гореспоменатите бяха наблюдавани за пролонгирана токсичност след 48 часа и до 5 ден от последното третиране. Животните бяха подложени на дисекция.

Наблюденията за острата токсичност на веществата във високи дози показва следното:

➤ Cav-Mem – силен тремор, повишена локомоторна активност, увеличено почистване и засилена ориентировъчна активност, учестено дишане, атаксия, смърт от спиране на дишането;

➤ Tyr-Mem - липсват токсични прояви в изследваните дози;

➤ мемантин (Mem)– силен тремор, гърчове, цианоза;

➤ кавинтон (Cav) – потиснатост, атаксия;

➤ тирозин (Tyr) – липсват токсични прояви;

Първоначални данни за смъртни и ефективни дози са:

➤ Cav-Mem – ЛД₅₀=над 160 mg/kg ип, ЕД₅₀;

➤ Tyr-Mem – ЛД₅₀= над 250 mg/kg, ЕД₅₀= 30 mg/kg;

➤ мемантин – ЛД₅₀=85-90 mg/kg ип, ЕД₅₀= 20 mg/kg ип /данните са близки до литературните данни за мемантин [118] ;

кавинтон – ЛД₅₀= 300 mg/kg /по литературни данни около 200/ ЕД₅₀= 40-60 mg/kg;

тирозин – ЛД₅₀- над 3.5 g/kg по лит. данни [119], практически нетоксичен;

Резултатите от острата токсичност на мемантиновите хибриди във високи дози показват, че само при Tyr-Mem липсва токсични прояви в изследваните дози. Подобни са и данните за смъртна и ефективна дози.

4.6. Невробиологични изследвания на новосинтезираните съединения

3.6 Невробиологични изследвания на новосинтезираните съединения

3.6.1. Неврофармакологичната активност на мемантиновите хибриди (Tyr-Mem, Cav-Mem)

Проведено е начално обучение съгласно *step through* теста на животните от всички групи. На 24^{-я} час животните се инжектират еднократно с ефективни дози от веществата/контролите получават същия обем физиологичен разтвор и на 1-я час след инжектирането се изследва отново паметта им в 3 различни дози.

Третирането продължава ежедневно в същите ефективни дози до 5^{-я} ден. На 24^{-я} час след последното третиране – т.е. на 6^{-я} ден, отново се проследяват промените в паметта и обучението със същия тест. Оставят се за няколко часа за възстановяването им, след което се декапитират. Мозъците се изваждат на лед, промиват се с леден физиологичен разтвор и се замразяват при минусови температури за последващо биохимично изследване.

3.6.2. Изследвания върху поведенческите реакции на третираните животни (мишки)

Проследяване за промени в паметта и обучението при гризачи (*step through* тест; пасивно избягване с отрицателно подкрепление) по метода на *Jarvik и Kopp/1967/[120]*.

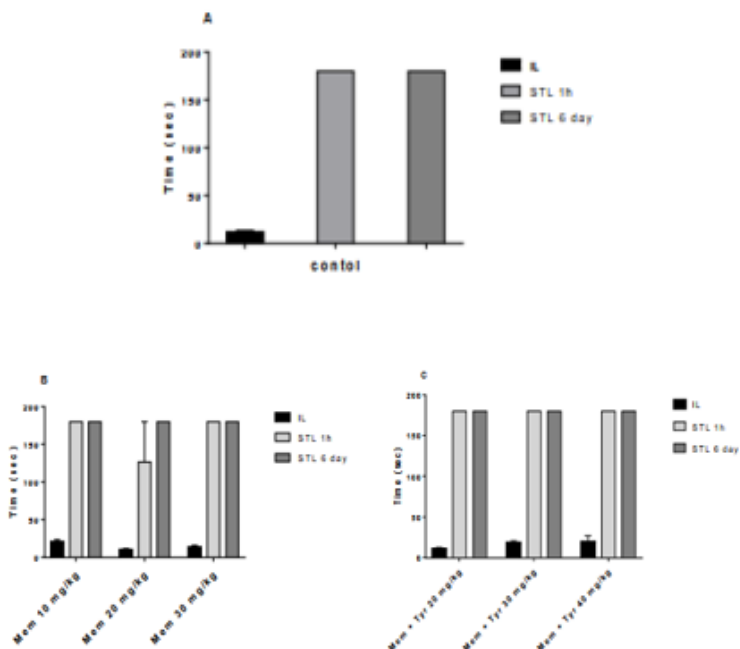
Доза-отговор ефект на Tyr-Mem (20, 30 и 40 mg/kg).

Tyr-Mem (20, 30 и 40 mg/kg) – и в трите изследвани дози, веществото не промени продължителността на латентното време на реакцията спрямо контролите и няма увреждащ паметта ефект (Фиг. 32С)

мемантин (10, 20 и 30 mg/kg) - в ниската и висока доза не променя продължителността на латентното време на реакцията спрямо контролите и няма увреждащ паметта ефект. В средната доза (20 mg/kg) е показва понижаване на латентното време на 1 час след инжектирането на първата доза, ефект, който напълно отшумява след 5 дневното третиране (Фиг. 32В).

Вижда се, че ефектът на новата хибридна молекула (Tyr-Mem) върху паметта е по-добър от този на изходния мемантин (10, 20 и 30

mg/kg). Същите са данните и по отношение на токсичността на двете вещества.

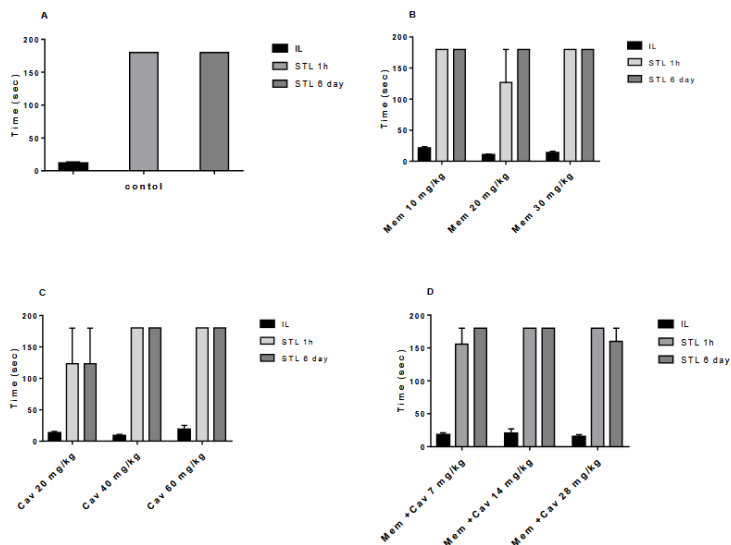


Фиг 32. Доза-отговор ефект на мемантин (10, 20 и 30 мг/кг) и Туг-Мем (20, 30 и 40 mg/kg).

Веществата са прилагани за пет последователни дни. Резултатите са отчитани на 1 час след първото инжектиране и на 6 ден (24 часа след последното инжектиране).

Доза-отговор ефект Cav-Мем (7, 14 и 28 mg/kg).

Cav-Мем (7, 14 и 28 mg/kg). – средната доза няма увреждащ паметта ефект. Ниската (7 mg/kg) и високата (28 mg/kg) показват слабо понижение на латентното време на 1 час и след 5 дневно третиране респективно спрямо контролата (Фиг. 33 D).



Фиг. 33. Доза-отговор ефект на мемантин (10, 20 и 30 mg/kg), кавинтон (20, 40 и 60 mg/kg) и CavMem (7, 14 и 28 mg/kg). Веществата са прилагани за пет последователни дни. Резултатите са отчитани на 1 час след първото инжектиране и на 6 ден (24 часа след последното инжектиране).

В сравнение с мемантин (10, 20 и 30 mg/kg), който в ниската и висока доза не променя продължителността на латентното време на реакцията спрямо контролите и няма увреждащ паметта ефект. В средната доза (20 mg/kg) показва понижаване на латентното време на 1 час след инжектирането на първата доза, ефект, който напълно отшумява след 5 дневното третиране (Фиг. 33В). Кавинтон (20, 40 и 60 mg/kg) – средната и висока доза на веществото няма увреждащ паметта ефект. Ниската доза обаче намалява продължителността на латентното време спрямо контролата както на 1 час след инжектирането на първата доза, така и след 5 дневното третиране, което говори за увреждащ паметта ефект (Фиг. 33С). От високата доза 60 mg/kg се наблюдава смъртност на 3 и 4-я ден говорещо за пролонгирана токсичност на веществото.

Веществото е въвеждано като интраперитонеална суспензия от таблетна форма, което може да има увреждащ перитонеалната кухина ефект.

Новите хибридни молекули (Tyr-Mem и Cav-Mem) имат съизмерими с мемантина ефекти върху паметовите функции - в остър опит и след 5 дневно третиране и имат значително по-ниска остра

токсичност. Ефектите на същите комплексни молекули върху паметта също са съизмерими с тези на изходните кавинтон и тирозин (данните не са показани), при значително намалена остра токсичност.

3.7. Биохимични и хистологични изследвания на Tug-Mem върху експериментална деменция при мишки

Изследванията бяха извършени върху експериментален модел на деменция от AD тип- чрез прилагане на скополамин 9 дни, в доза 1 мг/кг. За целта бяха използвани мъжки ICR мишки (18-20g)

За контроли са използвани в следните дози:

Физиологичен разтвор (0.1 mL/10g, интраперитонеално (и.п))

Мемантин (20 mg/kg, и.п)

Tug-Mem (20 mg/kg, и.п)

Тирозин (40 mg/kg, и.п)

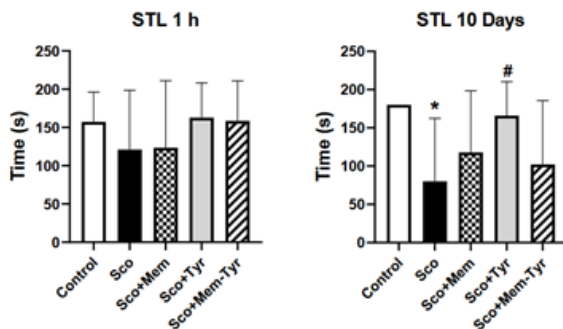
Всички тествани субстанции, включително и физиологичния разтвор при контролите, бяха приложени ежедневно за 9 последователни дни, паралелно със скополамина.

Използвани бяха поведенчески методи-метод за определяне на промени в процесите на обучение и памет (**step through**) и метод за определяне на промени в изследователското поведение ("hole board" тест).

Обработка на експерименталните данни бе извършена с метода на вариационния анализ с прилагане метода на еднофакторния или двуфакторен анализ (ANOVA).

3.7.1 Ефект на Tug-Mem върху процесите на обучение и памет при дементни мишки.

С помощта на тест за пасивно избягване с отрицателно подкрепление беше оценен ефекта на Tug-Mem върху промените от скополамина процеси на обучение и памет при използваните експериментални животни (Фиг. 34).



Фиг. 34. Ефект на Туг-Мем върху процесите на обучение и памет при скополаминов модел на деменция. Резултатите са представени като средно-аритметично и неговото отклонение от 8 проби в група. Звездичките показват статистически значима разлика между групите Sco и Control при $*P < 0.05$. Хаштаговете показват статистически значима разлика между групите Sco + Туг и Sco при $\#P < 0.05$.

Апаратът използван за този тест има две камери-светла и тъмна. В тъмната му част подът е уребрен и по него тече електрически ток (0.8 mA for 3 s) при поискване. При този тест се създава противоречие между природните инстинкти на животното да преминат от светлата в тъмната част на апарата и електрическото дразнение, което получават там. Самият тест има две фази. 1. Обучителна фаза-при нея се отчита времето за което животното ще премине от светлата в тъмната част на апарата (първична латенция), където ще получи електрическото дразнене. 2. Фаза на припомняне - в тази фаза се отчита доколко животните са запомнили значението на отрицателния стимул (електрическото дразнене). Времето прекарано в светлата част на апарата (stepthrough латенция, STL), в рамките на 180s е показател за изпълнението на задачата - да запомнят стимула. Нашите резултати показват, че прилагането на скополамин (холинорецепторен антагонист) нарушава процесите на обучение и памет при експерименталните животни. Засегнати са както краткосрочната (1 час), така и дългосрочната памет (10 ден). На 1 час след третирането със скополамин понижението на STL е с 23.57% (ns), а на 10 ден с 55.48% ($P < 0.05$) спрямо контролата. По отношение на краткосрочната памет Туг и Туг-Мем показаха най-добър стимулиращ паметта ефект, връщайки намалената от скополамина STL близо до контролни нива. Мемантинът не

повлия нарушената от скополамина краткосрочна памет на мишките от съответната група.

По отношение на дългосрочната памет, статистически значим, най-силен и положителен беше ефектът на Туг. Повишението на STL в тази група беше с 52% ($P < 0.05$) спрямо скополамин третираните животни. В групата на третираните с мемантин животни се отбелязва слабо и недостоверно повишение на STL спрямо дементната група. Според нашите резултати третирането с Туг-Мет не повлия нарушената от скополамина дългосрочна памет в използвания тест.

Мемантинът има слаб положителен ефект върху нарушената дългосрочна памет на мишки с експериментален, скополамин предизвикан модел на деменция. Ефектът на Туг е също положителен, много добре подчертан и се проявява както по отношение на краткосрочната, така и по отношение на дългосрочната памет

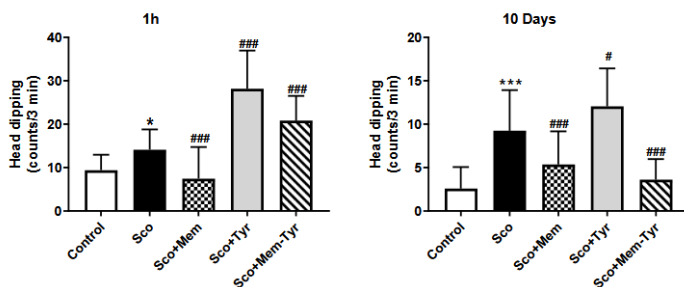
Туг-Мет има положителен ефект само върху нарушената от скополамина краткосрочна памет, като ефектът му е съизмерим с този на Туг.

3.7.2. Ефект на Туг-Мет върху изследователското поведение на дементни мишки

С помощта на *holeboard* тест беше проследена промяната в изследователското поведение на животните между различните експериментални групи. Holeboard апаратът представлява повдигната от земята платформа с 16 правилно подредени дупки. По честотата, с която животните надничат в тях за единица време се съди за тяхното изследователско поведение и степен на тревожност.

Нашите резултати показаха, че в групата на скополамин третираните животни има едно стимулиране на изследователското поведение. Един час след третирането животните от тази група са надничали с около 1.5 ($P < 0.05$) пъти повече, а 10 дена след първото третирана с около 4 ($P < 0.001$) пъти повече от контролите.

В краткосрочен план единствено третирането с мемантин връща надничанията/3 мин на животните до контролни нива. В групите третираните с Туг-Мет изследователското поведение на животните е силно стимулирано, както спрямо контролите, така и спрямо скополаминовата група.

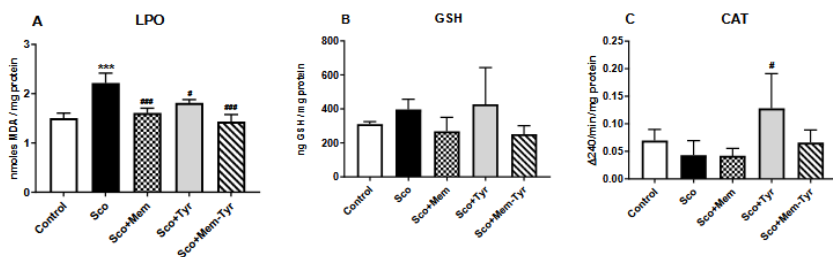


Фиг.35. Ефект на Тург-Мет върху изследователското поведение на мишки при скополаминов модел на деменция. Резултатите са представени като средно-аритметично и неговото отклонение от 8 проби в група. Звездичките показват статистически значима разлика между групите Sco и Control при * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$. Хаштаговете показват статистически значима разлика между Sco и другите експериментални групи при # $P < 0.05$; ### $P < 0.001$.

На 10 ден след първото третиране, изследователското поведение в Тург-Мет групата е най-близко до контролите, а в групата на мемантина е с 42% ($P < 0.001$) по-слабо проявено в сравнение със скополаминовата група. Единствено при тирозина третираните животни, нивата на изследователската активност при животните остава висока.

В краткосрочен план третирането с мемантин, а в дългосрочен третирането с Тург-Мет възстановява контролните нива на изследователска активност при експерименталните животни.

3.7.3 Ефекти на тирозин-мемантин върху нивото на оксидативния стрес в мозък на дементни мишки



Фиг.36. Ефект на Тург-Мет върху нивото на оксидативен стрес в мозък на мишки със скополаминов модел на деменция. Резултатите са представени като средно-аритметично и неговото отклонение от 8 проби

в група. Звездичките показват статистически значима разлика между групите Sco и Control при $***P < 0.001$. Хаштаговете показват статистически значима разлика между Sco и другите експериментални групи при $^{\#}P < 0.05$; $^{###}P < 0.001$

Получените от нас резултати показват, че третирането със скополамин повишава нивата на биохимичните маркери за оксидативен стрес в изследваните мозъчни хомогенати. Така нивата на липидна пероксидация в скополаминовата група са повишени с 32% ($P < 0.001$), а тези на антиоксидантния ензим САТ са понижени с 42% (ns) в сравнение с контролата. В нито една от останалите експериментални групи няма повишаване в нивата на липидната пероксидация, което показва, че про-оксидантния ефект на скополамина е потиснат. Тирозинът показва тенденция да повишава нивата на естествения неензимен клетъчен антиоксидант глутатиона и силно повишава активността на антиоксидантния ензим САТ- повече от три пъти сравнено със скополаминовата група.

Всички изследвани молекули показват антиоксидантен ефект изразен в поддържане контролните нива на липидната пероксидация в мозъчни хомогенати на животни третирани със скополамин. Единствено тирозинът има стимулиращ ефект върху ензимната антиоксидантна защитна система на клетките.

3.8. Противовирусна активност срещу грипни вируси *in vitro*

Експерименталните резултати от противовирусната активност на съединенията, изследвани срещу 3 грипни щама, са представени в Таблица 21. Резултати от експериментите са аналогични при тройно тестване.

Новите аналози на мемантин с аминокиселините глицин, валин, β -аланин, (4-F)фенилаланин и тирозин бяха изследвани за противовирусна активност спрямо щам на грипен вирус A/Fort Monmouth/1/1947 (H1N1), както и щамове A/Wuhan/359/1995 (H3N2) и A/Jinnan/15/2009 (H1N1), резистентни към оселтамивир.

Таблица 21. Противовирусна активност на мемантиновите производни срещу три грипни щама

Съединение	TC ₅₀ µg/mL	A/FortMonmouth/1/19 47		A/Jinnan/15/200 9		A/Wuhan/359/1995	
		IC ₅₀ µg/mL	SI	IC ₅₀ µg/mL	SI	IC ₅₀ µg/mL	SI
Gly-Mem	96.23	>55.56	-	>55.56	-	>55.56	-
Val-Mem	32.08	10.69	3.0	>18.52	-	>18.52	-
β-Ala-Mem	96.23	>55.56	-	>55.56	-	>55.56	-
(4-F)Phe-Mem	32.08	>18.52	-	>18.52	-	>18.52	-
Tyr-Mem	288.6 8	>166.67	-	166.67	1.7	>166.67	-
Oseltamivir	577.3 5	2.47	233.7	115.47	5.0	3.12	185.0
Amantadine	39.22	0.32	122.6	2.86	13.7 1	2.86	13.71

Смята се, че шамът на грип A/ Fort Monmouth /1/1947 (H1N1) е наследник на испанския грип, причинил от 50 до 130 милиона смъртни случая от януари 1918 г. до декември 1920 г. Аналогът на мемантин с валин (Val-Mem) е показал гранична активност срещу чувствителния към оселтамивир щам A /FortMonmouth /1/1947, останалите съединения са неактивни. Активността обаче не се наблюдава при резистентните на озелтамивир щамове A / Jinnan / 15/2009 и A / Wuhan / 359/1995. Важно е да се подчертае, че там активността на амантадина също е намаляла значително. Тези резултати показват, че ролята на ароматните и алифатни аминокиселини не е от решаващо значение за противогрипната активност.

Мемантиновите аминокиселинни аналози бяха изследвани и за антибактериална активност срещу Грам-положителни и Грам-отрицателни бактерии, както и за активност срещу дрожди.

3.9. Антимикробна активност

3.9.1. Активност срещу Грам-положителни бактерии и Грам-отрицателни бактерии

Грам-положителни бактерии: *Staphylococcus aureus* NBIMCC (6538), *Bacillus megaterium*, Грам-отрицателни бактерии: *Escherichia coli* (NBIMCC 3397), *Salmonella enterica* (NBIMCC 869) и дрожди: *Rhodotorula sp.* (BF 16-25), *Candida lusitanae* (BF 74-4). Антибактериалната активност на изследваните съединения е представена в Таблица 22. Бяха приготвени две концентрации: 1 mM и 10 mM. Ефикасността на изпитваните

съединения се определя чрез измерване на зоната на инхибиране (в mm) и се сравнява с контролите. Съединението (4-F)Phe-Mem показва най-висока антибактериална активност, както срещу Грам-положителните, така и срещу Грам-отрицателните бактерии. Неговият инхибиторен ефект е подобен на този на търговски достъпния тетрациклин (30µg/диск). Антибактериалната активност на съединенията Val-Mem и Thz-Mem е пониска и променлива, между 10 и 16 mm зона на инхибиране. Съединение β-Ala-Mem демонстрира активност само срещу *S. enterica*, докато съединенията Gly-Mem и Fmoc-Thz-Thz-Mem са неактивни. Всички тествани съединения се разтварят в DMSO. Разтворителя, 4-F-L-фенилаланин, тетрациклин и мемантин (немдатин 10 mg таблетки) бяха включени като референтни съединения.

Таблица 22. Активност на мемантиновите аналози срещу Грам (+) и Грам (-) бактерии, при концентрация от 10 mM

Съединение (10 mM)	Gram (-) bacteria		Gram (+) bacteria	
	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. megaterium</i>
Gly-Mem	n/a	n/a	n/a	n/a
Val-Mem	11	11	n/a	16
β-Ala-Mem	16	n/a	n/a	n/a
(4-F)Phe-Mem	20	22	21	22
Thz-Mem	n/a	13	10	16
Fmoc-Thz-Thz-Mem	n/a	n/a	n/a	n/a
Memantine.HCl - (C ₁)	n/a	n/a	n/a	n/a
(4-F)Phenylalanine - (C ₂)	n/a	n/a	n/a	n/a
DMSO - (C ₃)	n/a	n/a	n/a	n/a
Tetracycline - (C ₄)	26	26	28	34

* Областта на инхибиране е представена в mm, включително ямката.

** C₁ и C₂ – основен компонент на (4-F)Phe-Mem, C₃ – отрицателна контрола; C₄ – положителна контрола

При изследването с концентрация 1 mM инхибиращ ефект показва само съединението (4-F)Phe-Mem, единствено при Грам-положителните бактерии *Staphylococcus aureus* и *Bacillus megaterium*.

3.9.2 Активност срещу дрожди

Дрождите са широко разпространени в природата и често могат да причинят микози при индивиди с имунокомпрометиран статус. Видовете, принадлежащи към родовете *Candida* и *Rhodotorula*, са сред основните причинители на микози. Анти-дрождовата активност на новите мемантинови аналози на беше тествана по метода на дифузия на агар. Данните за инхибиране са представени в Таблица 23. Впечатление прави, че (4-F)Phe-Mem е единственото съединение, активно срещу всички тествани микроорганизми. Ефектът му е подобен на добре познатото противогъбично лекарство нистатин. Съединението Gly-Mem притежава активност само срещу микроорганизма *Sacch. cerevisiae*.

Таблица 23. Активност на мемантиновите аналози срещу дрожди при концентрация от 10 mM

Съединения (10 mM)	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Candida lusitanae</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
Gly-Mem	n/a	n/a	14
Val-Mem	n/a	n/a	n/a
β -Ala-Mem	n/a	n/a	n/a
(4-F)Phe-Mem	26	23	21
Thz-Mem	n/a	n/a	n/a
Fmoc-Thz-Thz-memantine	n/a	n/a	n/a
Memantine.HCl - (C ₁)	n/a	n/a	n/a
(4-F)Phenylalanine - (C ₂)	n/a	n/a	n/a
DMSO - (C ₃)	n/a	n/a	n/a
Nystatin - (C ₄)	26	24	n/a

* Областта на инхибиране е представена в mm, включително ямката.

** C₁ и C₂ – основен компонент на (4-F)Phe-Mem, C₃ – отрицателна контрола; C₄ – положителна контрола

3.9.3. Количествен анализ на антимикробната активност:

Определяне на минимална инхибиторна/бактерицидна концентрация (MIC)

Съединението Gly-Mem е активно срещу *Salmonella enteria* и *Bacillus megaterium* със стойност на MIC 1,25 mM. По отношение на β -Ala-Mem, наблюдавахме ниска антимикробна активност (MIC = 10 mM) срещу *Escherichia coli*. Съединение 4-F-Phe-Mem демонстрира най-висок

антимикробен потенциал срещу всички тествани микроорганизми. Стойностите на MIC са в широк диапазон, от 1,25 mM до 0,078 mM.

Съединението Thz-Mem също е активно срещу всички тествани микроорганизми, но при по-високи концентрации в сравнение с 4-F-Phe-Mem. Val-Mem също има активност, но при по-високи концентрации. Резултатите са предствени в Таблица 24.

Таблица 24. Стойности на минималната инхибираща концентрация на мемантиновите аналози

Съединение (μM)	Gram (-) Bacteria		Gram (+) Bacteria		Yeasts	
	<i>S. enterica</i>	<i>E.coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>Rhodotorula sp.</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
Gly-Mem	1.25	n/a	n/a	1.25	n/a	0.3125
Val-Mem	1.25	5	10	2.5	n/a	0.3125
β-Ala-Mem	n/a	10	n/a	n/a	n/a	0.078
(4-F)Phe-Mem	0.156	1.25	1.25	0.625	0.078	0.078
Thz-Mem	5	5	10	10	1.25	0.3125

Антимикробна активност на съединенията може да бъде подредена в такава последователност:

S. enterica: (4-F)Phe-Mem >> Val-Mem ≈ Gly-Mem > Thz-Mem;

E. Coli: (4-F)Phe-Mem > Val-Mem ≈ Thz-Mem > β-Ala-Mem

St. Aureus: (4-F)Phe-Mem >> Val-Mem ≈ Thz-Mem;

B. megaterium: (4-F)Phe-Mem > Gly-Mem > Val-Mem >> Thz-Mem;

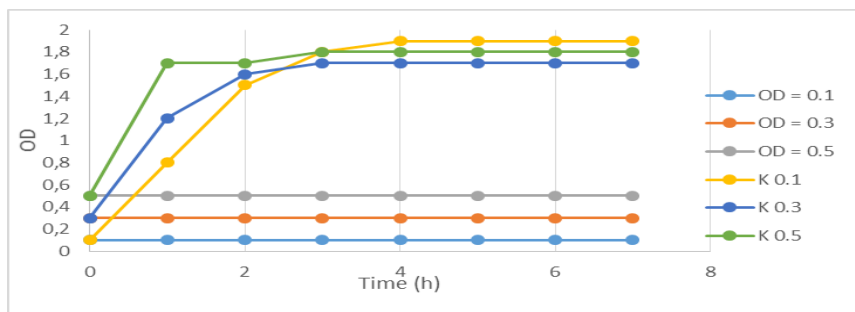
Rhodotorula sp.: (4-F)Phe-Mem >> Thz-Mem;

Candida lusitaniae: (4-F)Phe-Mem ≈ β-Ala-Mem > Val-Mem ≈

Gly-Mem ≈ Thz-Mem.

3.9.4. Time-Kill тест за оценка на бактериостатично/бактерицидното действие

Time-Kill тестът на (4-F)Phe-Mem проведен с най-чувствителните бактериални видове *Salmonella enterica*, показва бактерициден ефект и 100% и инхибиране на растежа на бактериите след 7 часа култивиране в присъствието на изпитваното вещество (Фиг. 37)



Фиг. 37. Динамика на размножаване на *Salmonella enterica* в присъствието на 1mM (4-F)Phe-Mem.

Наблюдава се пълно инхибиране, независимо от началната клетъчна плътност на изпитваната култура (0,1, 0,3 или 0,5 единици, стандарт McFarland). За същия период съответните нетретираните контроли достигат клетъчна плътност от 1,7 - 1,9 единици, стандарт McFarland. Потенциалът на (4-F)Phe-мемантин да повлияе на растежа на гъбичките беше оценен чрез измерване на радиалната скорост на растеж (Kr) на два гъбични щама *Penicillium chaviforme* и *Fusarium graminearum*. Представените резултати показват силен инхибиращ ефект върху им на гъбичките в диапазона от 8% за *Penicillium chaviforme* и 62.9 % за *Fusarium graminearum*, в сравнение с нетретираните контроли (Таблица 25).

Таблица 25. Инхибиране радиалната скорост на растеж (Kr) на нишковидни гъби в присъствието на 4-F-Phe-Mem

Hours	<i>Penicillium chaviforme</i> d (mm)				<i>Fusarium graminearum</i> d (mm)			
	<i>C_{Penicillium}</i>	Tops in	DMS O	(4-F)PheMem	<i>C_{Fusarium}</i>	Tops in	DMS O	(4-F)PheMem
0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	5,6	0/0	9,8	7,6	10/7	15/16	20/22	7/7
48	11,12	0/0	14/13	11,10	26/26	39/39	39/39	35/35
72	16/16	0/0	13/14	15/14	52/49	44/44	70/62	43/49
98	21/21	0/0	23/23	20/19	71/70	49/45	83/82	46/50
120	25/25	0/0	27/27	24/22	85/85	50/50	85/85	51/55
Kr (mm/h)	19.7	0	17.5	15.7	84.9	49.8	84.8	19.8

4. ИЗВОДИ

1. Синтезирани са: **осем нови аналози** на мемантин – с **неприродните киселини** H-Phe(4-F)-OH, H- β -L- Ala-OH и с **природните аминокиселини** H-Gly-OH, H-Val-OH, H-Phe-OH, H-Ala-OH, H-Tyr-OH, **4 нови аналози** на мемантин с ноотропици: кавинтон, пирацетам, модафинил и пикамилон, и **2 нови аналога на мемантин** с тиазолови производни.

2. Направен е рентгеноструктурен анализ на β -Ala-Mem и (4-F)Phe-Mem. Получените резултати показват, че монокристали на β -Ala-Mem кристализира по centrosymetrichen начин, а съединението (4-F)Phe-Mem по неcentrosymetrichen начин.

3. Изследвана е химичната стабилност на част от новите аналози на мемантин с Ala, β -Ala, Gly, Phe и Val при pH= 1 и pH= 7.4. Получените резултати показват висока стабилност на аналозите > 10 часа.

4. Проведени са следните физикохимични изследвания - промяна на разтворимостта, определена е липофилността на съединенията и сравнителният анализ показва, че увеличаването на обема на молекулата с бензенов заместител води до съществено увеличаване и на липофилността – приблизително 69- и 12-кратно при (4-F)Phe-Mem и Tyr-Mem съответно;

5. Изследвана е *in vitro* антиоксидантната активност на серия от хибриди на мемантина с различни аминокиселини и е намерено е, че активността на съединенията е незначителна с изключение на Gly-Gly-MEM, (4-F)Phe-Mem и Phe-Mem.

6. Определена е противовирусната активност срещу грипни вируси A/Fort Monmouth/1/1947 (H1N1), както и щамове A/Wuhan/359/1995 (H3N2) и A/Jinnan/15/2009 (H1N1) *in vitro* и е показано, че H-Val-Mem показва гранична активност срещу чувствителния към оселтамивир щам A /FortMonmouth /1/1947, останалите съединения са неактивни. Тези резултати показват, че ролята на ароматните и алифатни аминокиселини не е от решаващо значение за противогрипната активност.

7. Изследвано е действието на мемантиновия хибрид (Tyr-Mem) срещу Болестта на Паркинсон. Установено е, че новия мемантинов хибрид - Tyr-Mem, подобрява паметовите функции съизмерим с мемантина и показва по-ниска токсичност. Ефектите на същите комплексни молекули върху паметта също са съизмерими с тези на изходните кавинтон и тирозин, при значително намалена остра токсичност.

Проведените биологични и хистологични изследвания на мемантиновия хибрид (Туг-Мем), показват, че той има положителен ефект само върху нарушената от скополамина краткосрочна памет, като ефектът му е съизмерим с този на Н-Туг-ОН.

8. Изследвано е невропротективното действие *in vitro* на новосинтезираните съединения срещу Болестта на Алцхаймер.

- Аминокиселинните мемантинови хибриди показват невропротективни ефекти срещу индуцирани от медни йони А β токсичност, индуцирана от глутамат екситотоксичност, оксидативен стрес и хипоксия. Те също показват инхибиране на възпалителното освобождаване на цитокини от активираната микроглия и потенциални антиневровъзпалителни ефекти. Двете най-обещаващи съединения (4-F)Phe-мемантин и Туг-мемантин демонстрират еквивалентни активности спрямо контролата мемантин хидрохлорид.

9. Изследвана е антимикробната активност на новосинтезираните аналози срещу Грам-положителни и Грам отрицателни бактерии и дрожди - Грам-положителни бактерии: *Staphylococcus aureus* NBIMCC (6538), *Bacillus megaterium*, Грам-отрицателни бактерии: *Escherichia coli* (NBIMCC 3397), *Salmonella enterica* (NBIMCC 869) и дрожди: *Rhodotorula sp.* (BF 16-25), *Candida lusitaniae* (BF 74-4). Резултатите показват, че **Н-(4-F)Phe-Mem** действа ефективно срещу всички изследвани щамове. Инхибиторният ефект е съизмерим с този на антибиотиците тетрациклин и нистатин.

- *Производното Н-(4-F)-Phe-Mem* проявяващо най-добро невропротективно действие *in vitro* срещу Болестта на Алцхаймер, показва инхибиторен ефект срещу клинично значими, условно патогенни микроорганизми съизмерим с този на антибиотиците тетрациклин и нистатин.

Този резултат е обещаващ, защото при пациенти, страдащи от умерена до тежка деменция от типа на AD (обикновено в напреднала възраст), инфекциозните заболявания са съпътстващи.

5. ПРИНОСИ

1. Създаден е дизайн и е извършен целенасочен синтез на производни на мемантина.

2. Синтезирани са **16 нови аналози** на мемантин – с *неприродните киселини* H-(4-F)Phe-OH, H- β -L- Ala-OH, с *природните аминокиселини* H-Gly-OH, H-Val-OH, H-Phe-OH, H-Ala-OH, H-Tyr-OH, с ноотропици: кавинтон, пирацетам, модафинил и пикамилон и с тиазолови производни.

3. Намерено е производно, проявяващо най-добро невропротективно действие *in vitro* срещу Болестта на Алцхаймер и със значителен инхибиторен ефект срещу клинично значими, условно патогенни микроорганизми съизмерим с този на антибиотиците тетрациклин и нистатин - ***H-(4-F)-Phe-Mem.***

Приложения

Списък с научни публикации свързани с дисертационния труд:

1. **A Tencheva**, R Liu, TV Volkova, R Chayrov, Y Mitrev, M Štícha, Y Li, H Jiang, Zh Li, I Stankova and G L Perlovich, Synthetic analogues of memantine as neuroprotective and influenza viral inhibitors: in vitro and physicochemical studies, *Amino acids*, 2020, 52,1559–1580, **Q1**
2. **Aleksandra Tencheva**, Radoslav Chayrov, Petko Mandjukov, Dancho Danalev and Ivanka Stankova, Hydrolytic stability of new amino acids analogues of memantine, *Scientia Pharmaceutica*, 2020, 88(3), 38, **Q2**

Списък със забелязани цитати:

1. Chayrov, R. L., Stylos, E. K., Chatziathanasiadou, M. V., Chuchkov, K. N., **Tencheva, A. I.**, Kostagianni, A. D., Milkova, Ts. S., Angelova A. L., Galabov A. S., Shishkov S. A., Todorov D. G., Tzakos A. G., Stankova, I. G., (2018). Tailoring acyclovir prodrugs with enhanced antiviral activity: Rational design, synthesis, human plasma stability and in vitro evaluation, *Amino acids*, 50, 1131-1143, **Q1**

Цитира се:

1. Pergolizzi Jr, Joseph V., et al. "Pharmacologic agents directed at the treatment of pain associated with maladaptive neuronal plasticity." *Expert opinion on pharmacotherapy* 23.1 (2022): 105-116.
2. Chayrov, Radoslav, et al. "Synthesis, neuroprotective effect and physicochemical studies of novel peptide and nootropic analogues of alzheimer disease drug." *Pharmaceuticals* 15.9 (2022): 1108.
3. Todorov, Petar, et al. "Synthesis and characterization of new 5, 5'-dimethyl-and 5, 5'-diphenylhydantoin-conjugated hemorphan derivatives designed as potential anticonvulsant agents." *New Journal of Chemistry* 46.5 (2022): 2198-2217.
4. Todorov, Petar, et al. "Study of novel peptides for antimicrobial protection in solution and on cotton fabric." *Molecules* 27.15 (2022): 4770.

5. Yang, Cuiting, et al. "Synthesis of acid-activated reversible conversion supramolecular nanoplatfrom: application in drug delivery and anti-tumor activity." *Macromolecular Research* 32.1 (2024): 71-83.
6. Zakzouk, Wesam Samy, Ahmed Barakat, and Omar Alfarouk Rabiee. "Assessment of Pomegranate Peel and Seeds extracts antiviral potential and antioxidant activity against HAV and HSV-1 virus models and related In Silico computational study." *Egyptian Journal of Chemistry* 68.3 (2025): 217-233.
7. Kumar, Vinod, et al. "Memantine-Based Derivatives: Synthesis and Their Biological Evaluation." *Natural Product-based Synthetic Drug Molecules in Alzheimer's Disease: Therapeutic & Theranostic Agents*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. 185-209.
8. Пиотровский, Левон Борисович, Л. Г. Кубарская, and М. А. Брусина. "NMDA-рецепторы как фармакологическая мишень." *Экспериментальная и клиническая фармакология* 86.2 (2023): 36-41.
9. Xiao, Danmei, et al. "The Activity of Plant-Derived Ren's Oligopeptides-1 against the Pseudorabies Virus." *Animals* 12.11 (2022): 1341.

Участия в международных конференциях

Aleksandra. Tencheva, R. Chayrov, I. Stankova, D. Marinkova, R. Raykova, D. Danalev: Synthesis and antimicrobial activity of some amino acids esters containing adamantane. 8th BULGARIAN PEPTIDE SYMPOSIUM with international participation, Stara Zagora, 2018.

Aleksandra Tencheva, Maya Chochkova, Radoslava Kyoseva, Hailun Jiang, Rui Liu, Yavor Mitrev and Martin Sticha, Memantine-cinnamic acid hybrids: Synthesis and in vitro evaluation og their effects against Alzheimer's disease, 28th International Conference on Neuroscience and Neurochemistry and 28th Euro- Global Neurologists Meeting, June 13-14, 2019, Barcelona, Spain.

Aleksandra Tencheva, Radoslav Chayrov, Ivanka Stankova: Amantadine and rimantadine analogues with glycine based amino acids and small peptides, 9th International Conference of Peptides, Velingrad, 2021.

Ivanka Stankova, **Aleksandra Tencheva**, Radoslav Chayrov, Tsvetelina Angelova, Veronika Nemska, Nelly Georgieva, Dancho Danalev: Biological activity of amino acid derivatives of memantine, 9th International Conference of Peptides, Velingrad, 2021.

Участия в проекти

КП-06-М 23/2 от 18.12.2018 г. „Новосинтезирани мемантинови производни с потенциални превантивни ефекти срещу деменция от алцхаймеров тип” с ръководител гл. ас. д-р Радослав Чайров

South-West University "Neofit Rilski"
Faculty of Natural Sciences and Mathematics
Department of Chemistry

Aleksandra Ivanova Tencheva

"Synthesis of memantine derivatives with expected protective effects against Alzheimer's disease"

ABSTRACT

*for awarding the educational and scientific degree "Doctor" in
the professional field:*

4.2. Chemical Sciences (Organic Chemistry)

Scientific supervisor: Prof. Dr. Ivanka Stankova

Blagoevgrad, 2025

The dissertation is written on 107 pages in A4 format. It contains 25 tables, 8 diagrams and 37 figures. Their numbering in the abstract corresponds to that in the dissertation. 120 literary sources are cited.

The dissertation was prepared at the Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, South-West University "Neofit Rilski", Blagoevgrad.

The defense of the dissertation will take place on June 19, 2025 at the Department of Chemistry at the Faculty of Natural Sciences and Mathematics of the Southwestern University "Neofit Rilski", Blagoevgrad, 56 Todor Aleksandrov Street, 3rd floor, room 2301.

Abbreviations used

Ap – Amyloid β -peptide
WHO – World Health Organization
AD – Alzheimer's disease
PD – Parkinson's disease
NMDAR – N-methyl-D-aspartate receptor
AChA – Acetylcholinesterase
BuChE – Butyrylcholinesterase
hBuChE – human butyrylcholinesterase
MTDL – multi-target targeting ligands
TCX – Thin layer chromatography
TFA – Trifluoroacetic acid
TBTU – (1-H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3- tetrabutyluronium tetrafluoroborate
LA – Lipoic acid
SGH – Glutathione
EEG – Electroencephalography
ADHD – Attention Deficit Hyperactivity Disorder
GABA – Gamma-aminobutyric acid
ApoE4 – Apolipoprotein E4
HPLC – High Performance Liquid Chromatography
ESI-MS – Electrospray Ionization Mass Spectrometer
DMSO – Dimethyl Sulfoxide
NMR – Nuclear Magnetic Resonance
PAS – Peripheral Anion Binding Site
CAS – Catalytic Anion Site
Cys – Cysteine
AMPA – α -amino- β -(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)-propanoic acid
Et3N – triethylamine
Et2O – diethyl ether
AK – amino acid
Boc – tert-Buoxycarbonyl
Thz – thiazole
TCX – Thin layer chromatography
PD – Parkinson's disease
OS – oxidative stress
KATP – potassium channels
ROS – reactive oxygen molecules, radicals or radical ions
MCI – mild cognitive impairment
NFT – neurofibrillary tangles
DMBA – 7,12-dimethylbenzo[a]anthracene
TH – tyrosine hydroxylase

ANOVA – analysis of variance
MIC – minimal inhibitory/bactericidal concentration
BBB – blood-brain barrier
APPswe cells – mouse model of AD
EOC20 – microglial cells
TNF-a – tumor necrosis factor alpha
Sco – scopolamine
IL-6 – interleukin-6
ICR mice – white mice

Contents

1. Introduction	7
2. Purpose and objectives.....	8
3. Results and discussion.....	9
3.1 Approaches to drug development	9
3.1.1. Synthesis of memantine with amino acids and peptides	9
3.1.2. Synthesis with nootropics	10
3.1.3. Synthesis of memantine with thiazole analogues	12
3.2. Results of the research conducted	14
3.2.1. X-ray structural analysis	14
3.2.2. Crystal structure study	15
3.2.3. Thermal behavior of molecules	16
3.3. Determination of chemical stability and antioxidant activity of memantine hybrids	17
3.3.1. Hydrolytic stability	17
3.3.2. In vitro antioxidant activity	21
3.3.2.1 Radical-scavenging activity of memantine hybrids against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH test).....	21
3.3.2.2. Superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) generating system.....	22
3.3.2.3. Radical scavenging activity towards hydroxyl radical ($\bullet OH$).....	23
3.3.2.4. Chelating effects research	24
3.3.3. Physicochemical parameters related to the kinetics and dynamics of newly synthesized compounds	25
3.3.3.1 Solubility	25
3.3.3.2. Distribution of substances in different environments	39
3.3.3.3. Membrane permeability	30
3.4. <i>In vitro</i> study of the neuroprotective effect of the newly synthesized compounds	30
3.4.1. Neuroprotective effects of memantine derivatives in APPsw cells due to Cu^{2+} -induced $A\beta$ toxicity (A).....	30
3.4.2. Neuroprotective effects of memantine hybrids against NMDA- induced toxicity (B).....	31
3.4.3. Neuroprotective effects of memantine hybrids against H_2O_2 - induced toxicity (C).....	32
3.4.4. Neuroprotective effects of memantine derivatives against hypoxia-induced toxicity (D).....	32
3.4.5. Anti-inflammatory effects of memantine derivatives against LPS-induced inflammation in microglial cells (E and F)	30

3.5. <i>In vivo</i> toxicological characterization of the newly synthesized compounds	33
3.5.1 Acute toxicity	33
3.6. Neurobiological studies of newly synthesized compounds	34
3.6.1 The neuropharmacological activity of memantine hybrids (Tyr-Mem, Cav-Mem).....	34
3.6.2. Studies on the behavioral responses of treated animals (mice).....	34
3.7. Biochemical and histological studies of Tyr-Mem on dementia in mice.....	37
3.7.1. Effect of Tyr-Mem on learning and memory processes in demented mice.....	37
3.7.2. Effect of Tyr-Mem on the exploratory behavior of demented mice	39
3.7.3. Effects of Tyr-Men on the level of oxidative stress in the brain of demented mice	40
3.8. Antiviral activity against influenza viruses <i>in vitro</i>	41
3.9. Antimicrobial activity	42
3.9.1. Activity against Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria.....	42
3.9.2. Activity against yeast	43
3.9.3. Quantitative analysis of antimicrobial activity: Determination of minimum inhibitory/bactericidal concentration (MIC)....	44
3.9.4. Time-Kill test for evaluating bacteriostatic/bactericidal activity	45
4. Conclusions	47
5. Contributions	48
Applications.....	59

1. INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD) are neurodegenerative conditions with a strong social impact. Despite significant advances in medicine in recent years, it cannot be considered that an effective treatment for these diseases has been found at this stage.

Diseases of the nervous system represent a significant medical and financial burden, with large expenditures for the treatment of AD and PD, while the medical benefits are small [1]. Neurodegenerative diseases remain incurable and debilitating conditions [2], leading to nerve cell death and dementia, disorganization, and loss of balance during movement (ataxia) [3].

Pre-dementia stages play a key role in preventive interventions. The development of early and accessible diagnostic methods may prevent or delay the progression of cognitive deficits and the onset of dementia in AD [4].

In the final stages, the possibilities for impacting patients with dementia are insignificant. Alzheimer's disease is the fourth leading cause of death in people over 65 years of age [5, 6].

Currently, AD therapy is aimed at improving cognitive and behavioral symptoms in the pre-dementia stages [5], but the limited number of drugs available on the market cannot significantly improve the quality of life of patients suffering from this disease.

One of the drugs currently used in clinical practice is memantine. This dissertation describes the syntheses of memantine derivatives, the results of their biological action and their effect in the treatment of Alzheimer's disease.

The studies performed allow important conclusions to be drawn about the influence of the structure of these compounds on their biological activity.

2. PURPOSE AND OBJECTIVES OF THE DISSERTATION

The aim of this dissertation is the design and synthesis of memantine derivatives with amino acids, peptides and nootropics, as well as the study of their biological activities - against Alzheimer's disease, against Parkinson's disease, as well as antimicrobial, antioxidant and antiviral activities of some of them.

To achieve this goal, we set the following tasks:

1. Synthesis of memantine derivatives with natural and unnatural amino acids and peptides: glycine, valine, alanine, β -alanine, 4-fluorophenylalanine, phenylalanine, tyrosine, glycyl-glycine, thiazole and thiazolyl-thiazole.
2. Synthesis of memantine derivatives with nootropics – cavintone, piracetam, modafinil and picamilon.
3. Study of the chemical stability of some memantine derivatives.
4. Study of the biological activities of the newly synthesized derivatives against Alzheimer's disease and Parkinson's disease.
5. Study of the antimicrobial, antioxidant and antiviral activity of some of the memantine analogues.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Drug Development Approaches

Structural changes in the molecule of drugs lead to changes in their effectiveness. The literature review showed that improving the drug effect of memantine can be achieved by modifying it with various natural substances: amino acids, phenolic acids; synthetic products: nootropics and thiazole-containing compounds.

The high lipophilicity of adamantane allows it to cross the blood-brain barrier and thus affect the central nervous system. This is one of the reasons why amantadine and a number of aminoadamantanes are suitable for combating neurodegenerative diseases [67-68].

Memantine (Fig. 1. 4) has a better therapeutic tolerance compared to other NMDAR blockers. The drug memantine has a very good bioavailability of $\approx 100\%$ [69-71].

3.1.1. Synthesis of memantine with amino acids (glycine, valine, alanine, beta alanine, phenylalanine, 4-fluoro phenylalanine and tyrosine) and the peptide (glycyl-glycine)

The use of natural amino acids and their derivatives ensures “recognition” by the molecular system of the organism and is a prerequisite for biological activity [72].

The discovery of glycine as a co-agonist of NMDAR has led to intensive research into glycine/NMDA antagonists as potential CNS drugs [73,74].

The efficacy of L-valine ester prodrugs in combating viral infections has already been demonstrated [75].

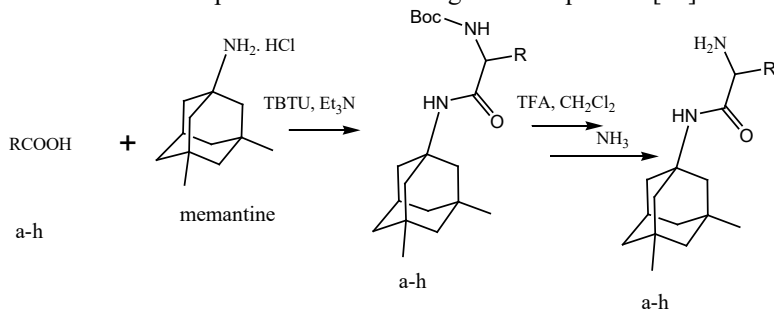
Phenylalanine and tyrosine are involved in the biosynthesis of dopamine, which in turn is the metabolic precursor of noradrenaline and adrenaline [76]. Phenylalanine concentration affects brain function; in phenylalanine deficiency, dopamine synthesis decreases: it has been shown to cause EEG slowing and prolong the time to perform neuropsychological tests [77].

The amino acids phenylalanine and tyrosine have been found to have an important role in the normal functioning of the CNS [78].

Glutamine, glutamic acid, and γ -amino butyric acid (GABA) are essential amino acids for brain metabolism and function [79].

The binding of various amino acids and their derivatives to memantine in one molecule is a prerequisite for the expected high biological and, in particular, neurological activity. This proposal is also supported by the large number of literature data on the biological activity of similar compounds [80,81,82].

In patients with Alzheimer's disease, the amount of tyrosine hydroxylase is reduced in areas characterized by loss of dopaminergic neurons. Therefore, the reduction in the cellular content of this enzyme may be associated with the presence of a neurodegenerative process [83].



a: R=N Boc-glycyl; **b:** R=N-Boc-valyl; **c:** R= N-Boc- alanyl; **d:**R=N Boc-β alanyl; **e:** R=Boc- (4-F)phenilalanyl; **f:** R=N Boc-phenilalanyl; **g:** R=N Boc-tyroziny; **h:**R-N Boc-glycyl-glycine;

Scheme 2. Synthesis of amino acid derivatives of memantine.

3.1.2. Syntheses with nootropics

Cavinton and nootropil are representatives of a group of drugs for supporting brain function [84]. It has been established that nootropics lead to improved metabolism, strengthening of blood vessels, activation and regulation of cerebral blood circulation and brain nutrition. Thus, they accelerate its recovery after stroke and trauma, improve memory, memorization, concentration [85].

In medicinal chemistry, increasing attention is being paid to the design and synthesis of hybrid molecules that incorporate two pharmacological residues into a single structure, combining specific biological activities [86]. Nootropil helps to restore cell membranes and neural pathways in the brain. It improves nutrition, functioning, and blood circulation in the brain [87].

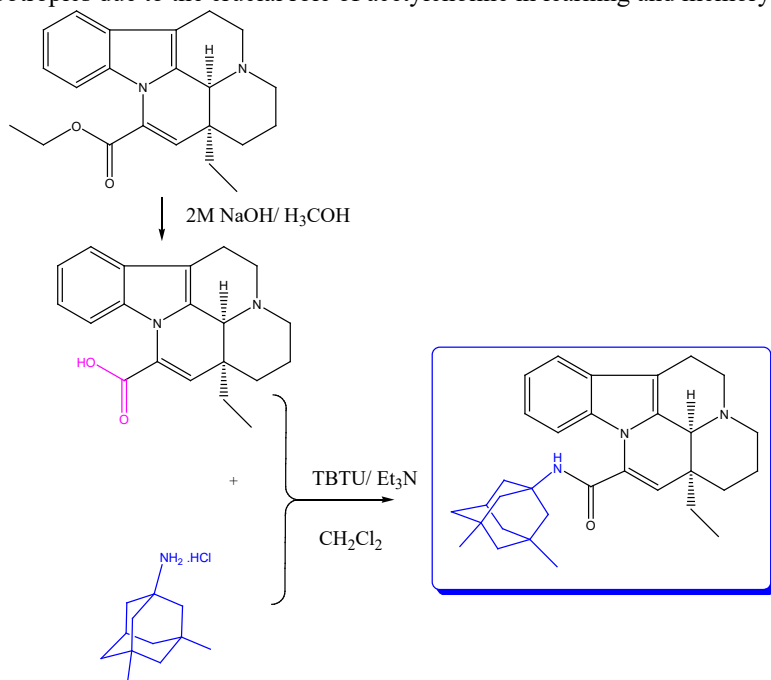
Modafinil is a psychostimulant. It is a drug used to treat attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). It is a functional antagonist of drugs with inhibitory effects on the central nervous system [88, 89, 90].

Picamilon increases cerebrovascular activity, is used to treat migraine, anxiety, and alcohol dependence [91].

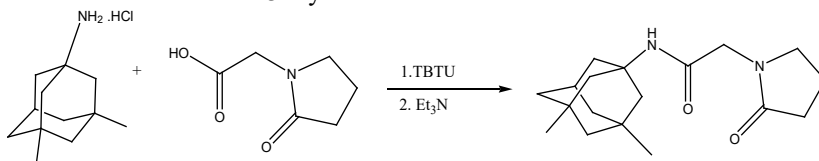
Picamilon has been shown to normalize dopamine levels in the brain. Dopamine, in turn, acts as a key neurotransmitter in the brain. It helps with memory, attention, focus, and cognition [92-93].

Nootropics (modafinil, piracetam, picamilon, etc.) support the learning and memory processes, attention and motivation. They facilitate recovery processes and improve the metabolism of nerve cells, protecting them from hypoxia.

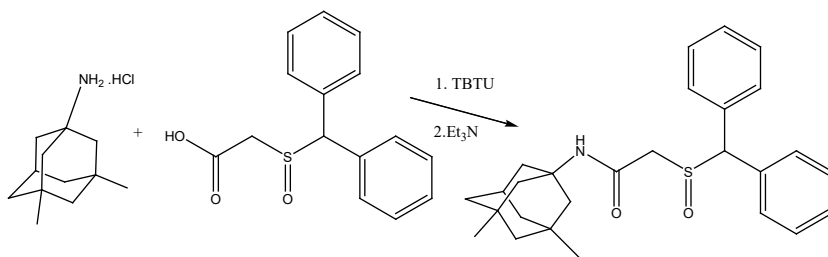
Over time, these substances have evolved into dopaminergic and serotonergic drugs. However, we should pay attention to cholinergically active nootropics due to the crucial role of acetylcholine in learning and memory [94].



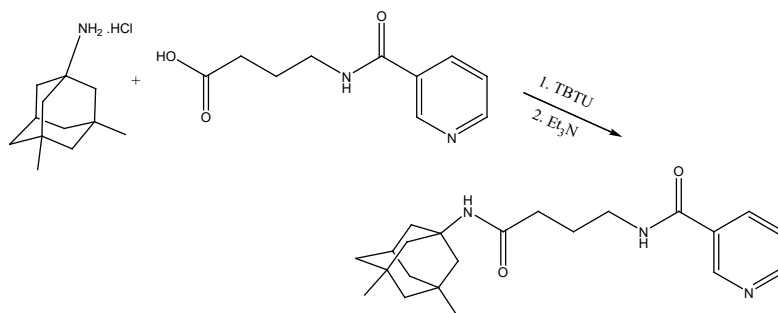
Scheme 3. Synthesis of memantine-cavinthone.



Scheme 4. Synthesis of a hybrid between memantine-piracetam.



Scheme 5. Synthesis of memantine-modafinil.



Scheme 6. Synthesis of memantine-picamilon.

3.1.3. Synthesis of memantine with thiazole analogues

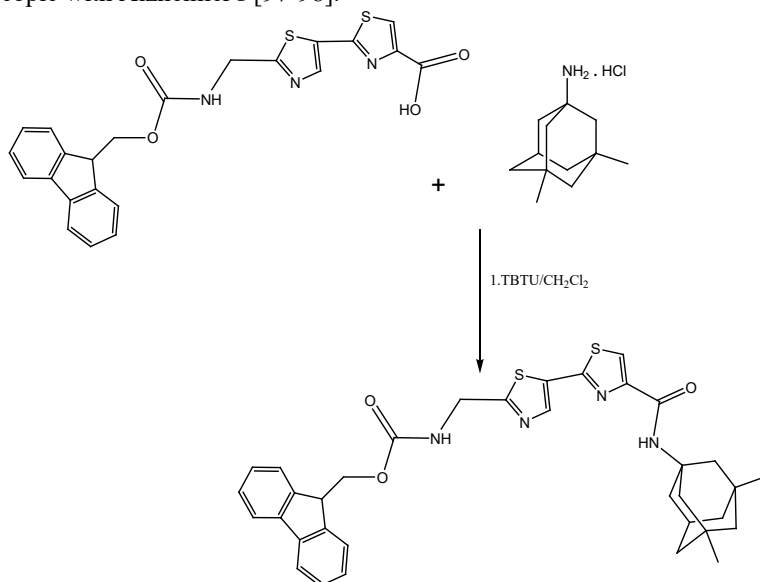
3.1.3.1. Fmoc-2-aminomethyl thiazolyl-5-2'-thiazolo-4'-(N-adamantyl)-carboxamide

There is a link between Alzheimer's disease and infections that cause long-term activation of the immune system, a process known as chronic inflammation. Infections thought to be associated with Alzheimer's disease include herpes, neuromonia, and bacterial infection [95].

There have been successes in this area, but the need for new effective therapeutic approaches for the treatment of AD has not yet been met. On the other hand, chronic viral, bacterial and fungal infections can be causative agents of the inflammatory pathway in the disease [96].

In Alzheimer's disease, the blood-brain barrier is damaged, especially in the area affected by the disease. Evidence suggests that inflammation, beta-amyloid protein, and the ApoE4 gene are associated with Alzheimer's disease and may contribute to the breakdown of the blood-brain barrier.

Once it is weakened by bacteria, viruses or other harmful substances can more easily enter the brain. This may explain why certain viruses and bacteria, such as herpes and spirochetes, are more common in the brains of people with Alzheimer's [97-98].



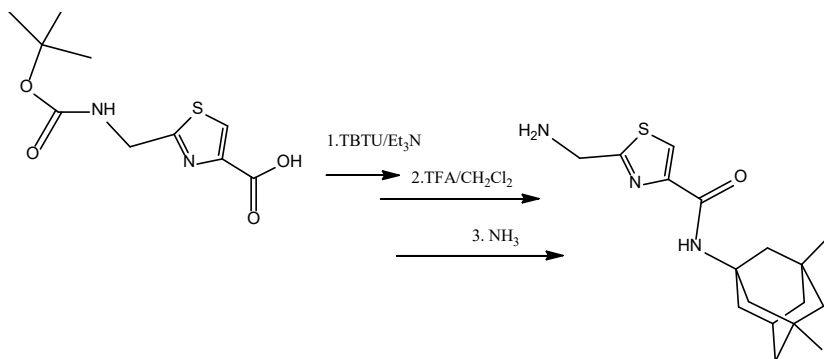
Scheme 7. Fmoc-2-aminomethyl thiazolyl-5-2'-thiazolo-4'-(N-adamantyl)-carboxamide.

3.1.3.2. Synthesis of Boc-2-aminomethyl-4(N 4'-(N-adamantyl)-carboxamide

The thiazole ring can be found in a wide range of natural or synthetic molecules with varying degrees of biological activity. Some thiazole analogues have previously been used as effective central nervous system (CNS) drugs.

Pramipexole, which contains a 2-amino-thiazole moiety linked to a cyclohexane ring, structurally similar to the catechol ring of dopamine, has dopamine-D2 agonist activity, and is used in the treatment of PD [99].

A number of heterocyclic compounds have shown remarkable radical-scavenging activity, which is a form of antioxidant activity [100].



Scheme 8. Synthesis of 2-aminomethyl-4(N 4'-(N-adamantyl)-carboxamide.

3.2. Results of the conducted studies

3.2.1. X-ray structural analysis

X-ray diffraction analysis of single crystals of the compounds shows that the compound β -Ala-Mem crystallizes in a centrosymmetric manner, and the compound (4-F) Phe-Mem in a non-centrosymmetric manner.

The asymmetric units of the two studied compounds are shown in Fig. 25 and Fig. 26. The bond lengths and angles of the two molecules are comparable (Tables 8 and 9). The aromatic ring system present in the (4-F)Phe-Mem molecule is essentially planar with an rmsd of 0.002 Å. Superposition of the two molecules shows that the geometry of memantine is well conserved.

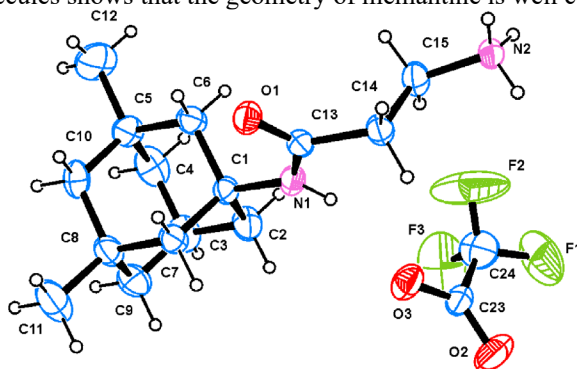


Fig. 25. View of the asymmetric unit β -Ala-Mem together with the atom numbering scheme.

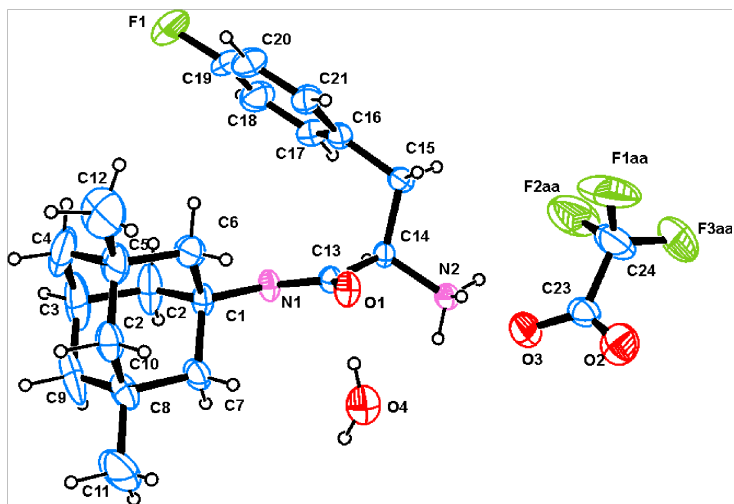


Fig. 26. View of the asymmetric unit (4-F)Phe-Mem and the numbering applied.

3.2.2 Study of the crystal structure of newly synthesized compounds

The differences in the molecular crystal structure of β -Ala-Mem and (4-F)Phe-Mem are insignificant. When superimposing the memantine residue in both molecules, it is seen that the amino acid fragments are oriented differently. (Fig. 27)

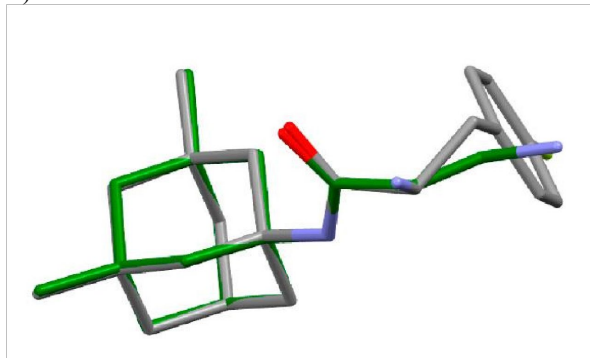


Fig. 27. Superposition of the molecules of β -Ala-Mem and (4-F)Phe-Mem based on the identical memantine moiety.

Given the similarity in bond lengths and bond angles, one would expect the two compounds to have similar hydrogen bonding interactions. The main differences between the two structures are due to differences in the side chains.

In fact, in both structures, intermolecular hydrogen bonds N-H...O (Table 10) stabilize the trimeric structure of the molecules. The crystal structure of (4-F)Phe-Mem and β -Ala-Mem also contains a trifluoroacetate ion, which indicates an ionic structure between the protonated free amino group of both compounds and the trifluoroacetate ion. In (4-F)Phe-Mem, one solvent molecule is present – water.

Table 10. Hydrogen bond geometry ($\text{\AA}$ and degrees) (A) for β -Ala-Mem and (B) for (4-F)Phe-Mem

A) β -Ala-Mem

D-	H	A	d(D-H)/ $\text{\AA}$	d(H...A)/ $\text{\AA}$	d(D...A)/ $\text{\AA}$	D-H...A/ $^\circ$
N2-	H2A	O1 ¹	0.89	1.87	2.725(5)	161.1
N2-	H2B	O15 ²	0.89	1.92	2.725(5)	149.3
N2-	H2C	O4 ³	0.89	1.93	2.788(5)	162.3
N3-	H3	O4	0.86	2.12	2.908(5)	151.5
C6-	H6A	O1	0.97	2.61	3.169(6)	117
C8-	H8B	F2	0.97	2.56	3.467(9)	155.9
C14-	H14B	O1	0.97	2.45	3.047(6)	119.5

B) (4-F)Phe-Mem

D-	H	A	d(D-H)/ $\text{\AA}$	d(H...A)/ $\text{\AA}$	d(D...A)/ $\text{\AA}$	D-H...A/ $^\circ$
N2-	H2A	O11 ¹	0.89	2.15	2.916(9)	144.3
N2-	H2B	O8 ²	0.89	1.91	2.766(8)	161.2
N2-	H2C	O8	0.89	2.04	2.868(10)	153.9
N3-	H3	O41	0.86	2.1	2.942(8)	164.5
C7-	H7	O4 ¹	0.98	2.57	3.441(9)	147.3
C23-	H23B	O1	0.97	2.5	3.071(10)	117.8

3.2.3. Thermal behavior of molecules

The thermal behavior of the compounds (4-F)Phe-Mem and β -Ala-Mem was studied in the temperature range between room temperature and 250°C using DTA – TG – DTG analysis (Fig.28).

For β -Ala-Mem (Fig. 28A), DTA measurements show a slow endothermic effect at 150–170 °C without mass loss along the TG curve. Such an endothermic effect can be related to the melting point of the compound. A second endothermic effect is detected at higher temperatures of 200–250 °C.

The second effect is accompanied by mass loss and can be related to the decomposition of β -Ala-Mem. Similarly, for (4-F)Phe-Mem (Fig. 28B), DTA measurement shows two endothermic effects: the first is in the range 150-170 °C and the second 200-250 °C.

The first endo effect is accompanied by a ~3% weight loss, which corresponds to the loss of a water molecule and is in agreement with the crystal structure – it can be seen that one water molecule is present in the crystal structure in Fig. 25. The second DTA effect is associated with a pronounced weight loss and most likely involves decomposition of (4-F)Phe-Mem. The two processes - melting and decomposition - cannot be clearly separated because they overlap.

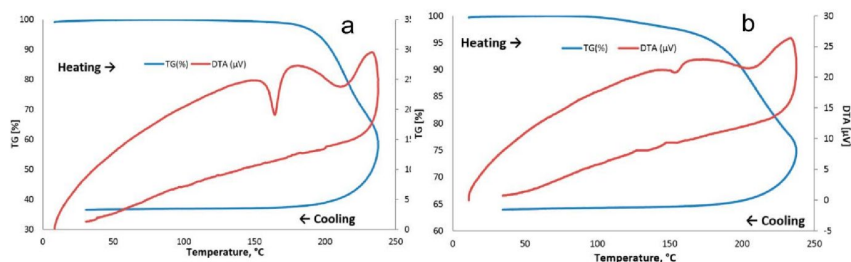


Fig. 28. DTA-TG curves: β -Ala-Mem; (4-F)Phe-Mem.

3.3. Determination of chemical stability and antioxidant activity of memantine hybrids

3.3.1. Hydrolytic stability

Prodrugs are compounds that facilitate the transport of the drug across cell membranes and lipid barriers, and maintain its optimal concentration in the cells for a longer period of time. The series of compounds studied includes memantine modified with the following amino acids: alanine, β -alanine, glycine, phenylalanine and valine.

The hydrolytic stability of the new amino acid analogues of memantine was investigated at different pH values corresponding to human biological fluids.

Hydrolytic stability was determined at two different pH values - 2.0 and 7.4, at 37 °C, analogous to those in human stomach and blood plasma. In this study, a specially developed UV-VIS spectrophotometric method [101] was applied to quantify the concentrations of unchanged compounds.

It was found that under the described experimental conditions all amides are subject to hydrolysis. The hydrolysis follows first order kinetics and the rate constants (k) were obtained as slopes from semi-logarithmic plots of

the unchanged amide concentration versus time. The chemical stability was estimated using the half-reaction time $t_{1/2} = \ln 2/k$ (Table 11 and 12).

In the present study, the R^2 values for linear and logarithmic kinetic curves did not differ significantly, as might be expected given the narrow range of concentrations.

Comparing the data from preliminary experiments and final studies, differences between the slopes of the linear kinetic curves were found.

Since the rate constant in all kinetic models must be independent of changes in concentration, first- or pseudo-first-order kinetics are assumed. The values of the rate constants are obtained as the slope of a linear regression line in the coordinates $\ln(C/C_0)$ versus t .

Val-MEM is the most stable compound in neutral medium and at 37° C – $t_{1/2} = 50.2$ hours ($t_{1/2}$ half-life). The compound Phe-MEM also has very good hydrolytic stability – $t_{1/2} = 29.6$ hours. The order of decreasing hydrolytic stability of the compounds is: Val-MEM >> Phe-MEM >> Ala-MEM $\approx$ β -Ala-MEM > Gly-MEM.

Ala-MEM and Gly-MEM are the most stable at pH=2 with almost identical values for $t_{1/2} = 17.8$ hours and $t_{1/2} = 16.3$ hours respectively. The stability of the tested compounds in acidic conditions is relatively lower than in neutral conditions. The order of stability is as follows: Ala-MEM $\approx$ Gly-MEM > Val-MEM $\approx$ Phe-MEM $\approx$ β -Ala-MEM (Table 11 and 12).

All compounds have relatively good hydrolytic stability – around and above 10 hours in both neutral and acidic environments. This is quite sufficient for them to enter the bloodstream and be used as potential prodrugs.

Table 11. Stability data of memantine derivatives with amino acids at acidic pH

Compound/environment	k	T_{1/2} h	R²
Ala-Mem / pH 2.0; 37°C /	-0.00103±0.00006	17.8±0.5	0.9919
β-Ala-Mem / pH 2.0; 37°C/	-0.00109±0.00004	9.9±0.2	0.9951
Gly-Mem / pH 2.0; 37°C/	-0.00065±0.00004	16.3±0.7	0.9908
Phe-Mem / pH 2.0; 37°C/	-0.00071±0.00006	10.6±0.2	0.9836
Val-Mem / pH 2.0; 37°C/	-0.00117±0.00006	11.2±0.3	0.9943

Table 12. Stability data of memantine derivatives with amino acids at neutral pH

Compound/environment	k	T_{1/2} h	R²
Ala-Mem / pH 7.4; 37°C/	-0.00023±0.00002	12.7±0.4	0.9928
β-Ala-Mem / pH 7.4; 37°C/	-0.00039±0.00002	11.8±0.4	0.9922
Gly-Mem / pH 7.4; 37°C/	-0.00091±0.00006	9.9±0.6	0.9908
Phe-Mem / pH 7.4; 37°C/	-0.00117±0.00014	29.6±0.8	0.9693
Val-Mem / pH 7.4; 37°C/	-0.00098±0.00006	50.2±2.2	0.9914

Chemical stability is assessed by the half-life $t_{1/2} = \ln 2/k$ (Table 11 and 12). Hydrolytic stability measurements reveal that the compounds are relatively stable at acidic pH (Figure 29).

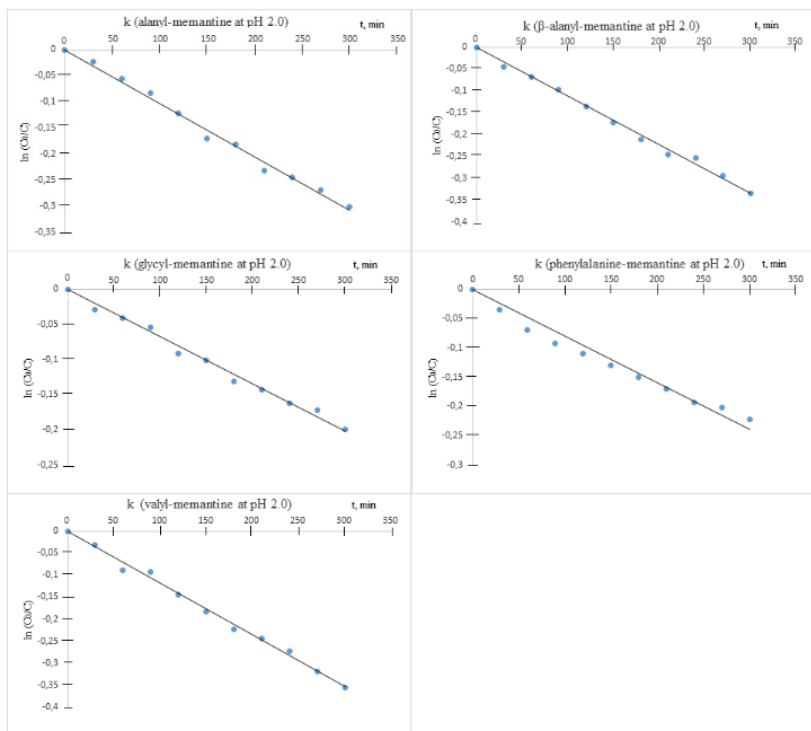


Fig. 29. Concentration change of the tested memantine derivatives with time at pH 2.0.

Under these conditions, all observed half-lives are more than 10 hours. All tested compounds are also stable at pH 7.4 (Figure 30).

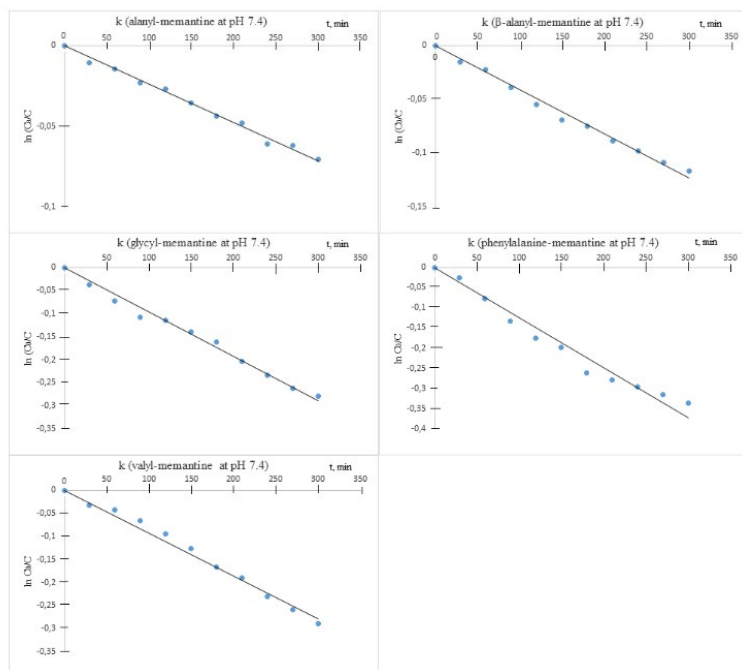


Fig. 30 Change in the concentration of the studied memantine derivatives with time at pH 7.4.

3.3.2. In vitro antioxidant activity

3.3.2.1. Radical scavenging activity of memantine hybrids against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH test)

The DPPH• test is used as an initial test to determine the antioxidant potential of compounds, as it is characterized by high reproducibility, low cost and is easy to perform. For this purpose, a modified methodology of Nenadis N. was applied.

The DPPH test of the seven derivatives is presented in Table 13.

Table 13. Radical scavenging activity (relative to DPPH•)

No.	Compounds	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M
		% Antioxidant activity				
1.	Gly-MEM	1,2 $\pm$ 0,29	2,4 $\pm$ 0,18	2,6 $\pm$ 0,09	2,7 $\pm$ 0,25	3,6 $\pm$ 0,40
2.	Ala-MEM	1,3 $\pm$ 0,27	2,4 $\pm$ 0,08	2,7 $\pm$ 0,08	3,0 $\pm$ 0,17	3,4 $\pm$ 0,27
3.	β -Ala-MEM	1,1 $\pm$ 0,12	1,1 $\pm$ 0,36	1,1 $\pm$ 0,18	1,2 $\pm$ 0,05	2,3 $\pm$ 0,20
4.	Val-MEM	1,2 $\pm$ 0,12	2,3 $\pm$ 0,05	3,3 $\pm$ 0,68	3,5 $\pm$ 0,35	3,6 $\pm$ 0,18
5.	Phe-MEM	1,3 $\pm$ 0,36	2,3 $\pm$ 0,35	3,5 $\pm$ 0,33	3,7 $\pm$ 0,18	3,7 $\pm$ 0,15
6.	(4-F)Phe-MEM	1,4 $\pm$ 0,07	2,5 $\pm$ 0,04	3,7 $\pm$ 0,09	3,8 $\pm$ 0,05	4,0 $\pm$ 0,20
7.	Gly-Gly-MEM	1,3 $\pm$ 0,13	2,4 $\pm$ 0,20	3,7 $\pm$ 0,06	4,0 $\pm$ 0,09	4,0 $\pm$ 0,18
	Ascorbic acid	63,6 $\pm$ 0,10	74,3 $\pm$ 0,31	75,8 $\pm$ 0,78	91,4 $\pm$ 0,45	95,7 $\pm$ 0,51

The radical scavenging potential of the tested substances was compared with that of ascorbic acid. The data showed that all substances had a negligible effect on reducing the DPPH concentration.

3.3.2.2. Superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) generating system

Although the superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) is less toxic than the hydroxyl radical, it is also among the harmful reactive oxygen species, as it is a precursor for the generation of other more reactive oxygen and nitrogen species.

The data on the activity against superoxide-anion radicals of the tested memantine hybrids are presented in Table 14. Memantine is not able to reduce the concentration of $O_2^{\bullet-}$ [103]. The tested amides also showed low activity against $O_2^{\bullet-}$. Only Phe-Mem, (4-F)Phe-Mem, and Gly-Gly-Mem have appreciable activity against the superoxide-anion radical.

Table 14. Activity of memantine hybrids against superoxide-anion radical

No.	Compounds	25 μ M	50 μ M	100 μ M
		% Antioxidant activity		
1.	Gly-MEM	0	1,5 $\pm$ 0,16	1,75 $\pm$ 0,15
2.	Ala-MEM	0	1,5 $\pm$ 0,27	1,5 $\pm$ 0,16
3.	β -Ala-MEM	0	1,0 $\pm$ 0,01	1,5 $\pm$ 0,05
4.	Val-MEM	0	2,0 $\pm$ 0,035	2,25 $\pm$ 0,035
5.	Phe-MEM	0	4,0 $\pm$ 0,05	9,0 $\pm$ 0,10
6.	(4-F)Phe-MEM	0	7,5 $\pm$ 0,30	10,0 $\pm$ 0,55
7.	Gly-Gly-MEM	0	8,5 $\pm$ 0,50	12,0 $\pm$ 0,75
	Ascorbic acid	5.0 $\pm$ 0.01	37,0 $\pm$ 0,10	65,0 $\pm$ 0,15

3.3.2.3. Radical scavenging activity against hydroxyl radical ($\bullet$ OH)

Another method used to assess the antioxidant activity of the newly obtained hybrids is the study of their activity against hydroxyl radicals ($\bullet$ OH). The latter are the most active oxidizing radicals that interact with biological molecules and cause various undesirable damages to biomolecules, which gives rise to a number of important diseases, including neurodegenerative processes [104].

The synthesized memantine hybrids were studied in a system containing $\bullet$ OH, derived from H₂O₂ using Fe(II)-EDTA complex. The results obtained are presented in Table. 15. It was found that the Phe-containing memantine derivative reduces the destructive effect of hydroxyl radicals on deoxyribose.

Table 15. Hydroxyl radical scavenging activity of memantine derivatives

No.	Compound s	5 μ M	10 μ M	25 μ M	50 μ M	100 μ M
		% Antioxidant activity				
1.	Gly-MEM	0,12 $\pm$ 0,00 9	0,15 $\pm$ 0,006	0,8 $\pm$ 0,010	0,88 $\pm$ 0,009	0,78 $\pm$ 0,069
2.	Ala-MEM	0,03 $\pm$ 0,00 0	0,68 $\pm$ 0,009	0,07 $\pm$ 0,00	0,44 $\pm$ 0,035	0,85 $\pm$ 0,09
3.	β -Ala-MEM	0,09 $\pm$ 0,00 1	0,41 $\pm$ 0,004	0,44 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,04	0,49 $\pm$ 0,14
4.	Val-MEM	0,11 $\pm$ 0,00 5	0,17 $\pm$ 0,005	0,33 $\pm$ 0,09	0,39 $\pm$ 0,07	0,36 $\pm$ 0,12
5.	Phe-MEM	4,66 $\pm$ 0,35	5,32 $\pm$ 0,68	6,00 $\pm$ 0,20	10,25 $\pm$ 0,95	16,75 $\pm$ 1,18

6.	(4-F)Phe-MEM	3,54±0,17	4,34±0,35	5,74±0,25	8,99±0,45	12,86±0,75
7.	Gly-Gly-MEM	1,44±0,15	2,41±0,09	4,57±0,17	6,91±0,90	7,51±0,69

3.3.2.4. Chelation Effects Study

Determining the chelating effect of substances is directly related to antioxidant potential, because by chelating prooxidant transition metal ions, the rate of generation of active radicals can be directly reduced, which is a form of antioxidant activity.

In organisms, transition metal ions catalyze the Fenton reaction – the decomposition of H₂O₂ to hydroxyl radicals. Therefore, in the presence of compounds that bind the transition metal ions Fe²⁺ and Cu⁺ in stable complexes, oxidative damage could be overcome.

To determine the chelating potential of the newly synthesized hybrids, a generating system with deoxyribose as a detector molecule, Fe²⁺ and H₂O₂ was applied.

The chelating effects at increasing concentrations of the tested substances are presented in Table 16.

Table 16. Chelating antioxidant effect of memantine hybrids with amino acids in percentages

No.	Съединения	5 μM	10μM	25μM	50μM	100 μM
1.	Gly-MEM	0,83±0,09	2,07±	2,72±0,12	2,90±0,69	3,67±0,79
2.	Ala-MEM	0,83±0,10	2,48±0,75	3,09±0,15	3,25±0,12	3,95±0,52
3.	β-Ala-MEM	0,22±0,01	0,36±0,12	0,58±0,05	0,76±0,11	1,24±0,25
4.	Val-MEM	0,69±0,15	0,62±0,13	1,66±0,10	2,79±0,03	3,03±0,96
5.	PhE-MEM	1,14±0,15	2,38±0,35	5,25±0,25	8,50±0,10	11,21±1,07
6.	(4-F)Phe-MEM	1,34±0,13	2,41±0,25	3,28±0,25	7,38±0,25	9,14±0,69
7.	Gly-Gly-MEM	1,00±0,13	1,00±0,05	3,45±0,20	4,03±0,35	7,79±0,51

3.3.3. Physicochemical parameters related to the kinetics and dynamics of newly synthesized compounds

3.3.3.1 Solubility

Of paramount importance for any drug is its solubility. It determines its distribution, and the pharmacokinetics of the drug also depend on it. Solubility has a significant impact on the penetration of the drug from the intestine into the blood - processes such as absorption, filtration, diffusion, etc.

The low solubility of any future drug leads to low bioavailability, unwanted side effects and, as a result, low therapeutic efficacy.

Therefore, all further drug discovery studies should seek compounds with appropriate solubility in solvents that simulate biological environments, such as aqueous buffer solutions with pH 2.0 and pH 7.4, as models of gastric contents and blood plasma, and n-hexane and 1-octanol, as models of lipid formations (cell membranes) in the body.

Table 17. Temperature dependence of solubility, X₂ [mol. fraction] and S₂ [mol·L⁻¹] of the studied compounds in buffer solutions with pH 7.4 and pH 2.0 mole fraction

more fraction

Gly-Mem				
T[K]	Buffer pH 7.4		Buffer pH 2	
	X ₂ .10 ⁴	S ₂ .10 ²	X ₂ .10 ³	S ₂ .10 ¹
293.15	4.49	2.48	3.12	1.67
298.15	4.88	2.69	3.87	2.05
303.15	5.44	3.00	4.57	2.39
310.15	5.90	3.26	5.73	2.98
315.15	6.31	3.48	6.85	3.51
A ^a	2.24±0.20 1602±60 0.9979 3.26.10 ⁻⁴		6.54±0.36 3607±108 0.9987 1.04.10 ⁻³	
Ba				
Rb				
σ ^c				
Val-Mem				
T[K]	Buffer pH 7.4		Buffer pH 2	
	X ₂ .10 ⁴	S ₂ .10 ²	X ₂ .10 ³	S ₂ .10 ²
293.15	2.12	1.17	1.24	6.75
298.15	2.46	1.36	1.39	7.58
303.15	2.88	1.59	1.65	8.95
310.15	3.32	1.83	1.90	10.25
315.15	3.79	2.09	2.17	11.71
A ^a	0.68±0.09 2676±26 0.9979 5.91.10 ⁻⁵		2.29±0.09 2636±81 0.9986 5.90.10 ⁻⁴	
B ^a				
R ^b				
σ ^c				
β-Ala-Mem				
T[K]	Buffer pH 7.4		Buffer pH 2	
	X ₂ .10 ⁴	S ₂ .10 ²	X ₂ .10 ³	S ₂ .10 ¹
293.15	1.25	6.95	6.84	3.77
298.15	1.49	8.29	8.41	4.62
303.15	1.69	9.37	10.30	5.64
310.15	2.01	11.12	12.50	6.85
315.15	2.34	12.95	14.60	7.97
A ^a	0.67±0.28 1602±60 0.9987 6.41.10 ⁻⁴		4.72±0.24 3517±72 0.9984 4.65.10 ⁻⁴	
B ^a				
R ^b				
σ ^c				

Phe-Mem				
T[K]	Buffer pH 7.4		Buffer pH 2	
	X ₂ .10 ⁴	S ₂ .10 ²	X ₂ .10 ³	S ₂ .10 ¹
293.15	1.20	6.68	1.46	0.811
298.15	1.45	8.03	2.13	1.18
303.15	1.74	9.64	2.64	1.47
310.15	2.03	11.30	3.67	2.04
315.15	2.43	13.50	4.62	2.57
A ^a	-0.38±0.13 3207±40 0.9998 1.45.10 ⁻⁴		6.74±0.78 5227±235 0.9970 4.96.10 ⁻³	
B ^a				
R ^b				
σ ^c				
Tyr-Mem				
T[K]	Buffer pH 7.4		Buffer pH 2	
	X ₂ .10 ⁴	S ₂ .10 ²	X ₂ .10 ³	S ₂ .10 ¹
293.15	2.62	1.45	2.88	1.52
298.15	2.97	1.64	3.33	1.75
303.15	3.23	1.79	3.88	2.01
310.15	3.54	1.95	4.38	2.26
315.15	3.91	2.17	4.98	2.54
A ^a	-2.03±0.22 1819±66 0.9981 3.84.10 ⁻⁴		2.74±0.14 2516±43 0.9997 1.68.10 ⁻⁴	
B ^a				
R ^b				
σ ^c				

^a parameters of the correlation equation: $\ln(X_2) = A - B/T$; ^b R – pair correlation coefficient; ^c σ – standard deviation.

Table 18. Thermodynamic solubility function of compounds in buffer solutions with pH 7.4 and pH 2.0, at 298.15

Compound	ΔG^0_{sol} kJ.mol ⁻¹	ΔH^0_{sol} kJ.mol ⁻¹	$T\Delta S^0_{sol}$ kJ.mol ⁻¹	ΔS^0_{sol} J.mol ⁻¹ .K ⁻¹	ΔG^0_{sol} JkJ.mol	ΔH^0_{sol} kJ.mol ⁻¹	$T\Delta S^0_{sol}$ kJ/mol ⁻¹	ΔS^0_{sol} J.mol ⁻¹ .K ⁻¹
	Buffer pH 7.4				Buffer pH 2.0			
Gly-Mem	18.9	13.3 ±3.3	-5.6	-18.8 ± 1.1	13 .8	30.0 ±0.0	16.2	54.3 ±4.3
Val-Mem	20.6	22.2 ±2.2	1.6	5.4 ± 0.2	16 .3	21.9 ±1.9	5.6	18.8 ±8.8
β-Ala-Mem	21.8	23.5 ±3.5	1.7	5.7 ± 0.3	17 .6	29.2 ±9.2	11.6	38.9 ±8.9
(4-F)Phe-Mem	27.6	26.7 ±6.7	-0.9	-3.0 ± 0.1	26 .7	43.5 ±3.5	16.8	56.2 ±6.2
Tyr-Mem	20.1	15.1 ±5.1	-5.0	-16.8 ± 0.9	14 .1	20.9 ±0.9	6.8	22.8 ±2.8

Experiments have been conducted to study the solubility in n-hexane, but the compounds are insoluble in it even at a temperature of 318.15 K.

For this reason, it is not possible to derive statistically significant results. On the other hand, studies in 1-octanol were also unsuccessful due to their excessively high solubility in this solvent.

The results of the temperature dependence of solubility in buffer solutions with pH 2.0 and pH 7.4 are presented in Table 17. and Table 18. The calculated values of the changes in Gibbs free energy, enthalpy and entropy (multiplied by the absolute temperature) upon dissolution are presented.

The studied memantine derivatives possess ionizable functional groups in their structures. The ionization constants of the compounds were calculated using the ACD/ChemSketch program. The equilibrium analysis between the ionized and unionized states of the molecules was performed based on the Henderson-Hasselbalch approach, using the software package presented by Borodin et al. [105].

The solubility in an acidic buffer solution (pH 2.0) is relatively higher than that in a phosphate buffer with a near-neutral pH of 7.4. This applies to all compounds and is in accordance with the well-known rule that more polar or ionized forms of compounds are better soluble in aqueous media. An attempt has been made to find the relationship between the change in Gibbs energy upon dissolution (ΔG_{298}) and some physicochemical parameters. The main goal of such a study is related to the idea of building an algorithm that can predict experimental results based on molecular structure data.

The data were analyzed in terms of 32 parameters (integrated in HYBOT). A suitable correlation between the solubility results at pH=2.0. was obtained by taking into account an independent variable that takes into account the donor-

acceptor ability of the molecule - the ability to form hydrogen bonds with solvent molecules, divided by the molecular polarizability ($\Sigma C_{ad})/\alpha$).

The results of the analysis are summarized in Fig. 31a. In our case, an adequate correlation equation could not be obtained due to the small number of compounds synthesized and tested for solubility.

However, the relationship between the change in solubility and the change in the selected parameters is quite clear: with increasing value of the change in Gibbs energy of dissolution (ΔG_{298}) the solubility decreases. Similar results are obtained for the solubility in the buffer solution with pH 7.4 (Fig. 31).

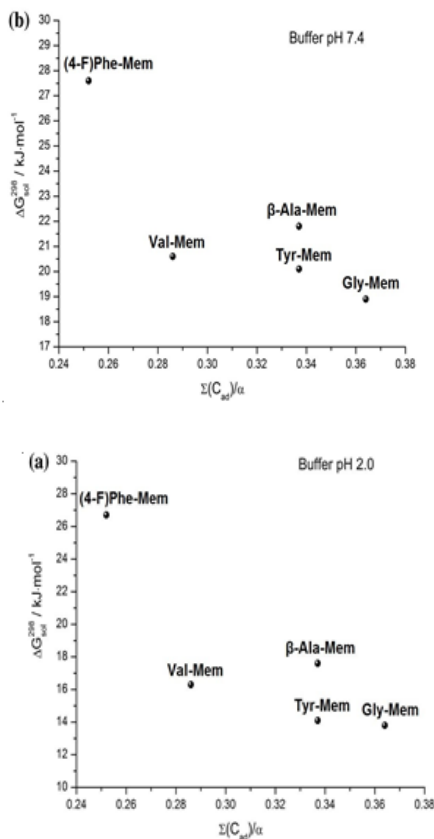


Fig. 31. Relationship between the change in Gibbs free energy upon dissolution (ΔG_{298}^{sol}) and the indicator of donor-acceptor interactions in molecules ($\Sigma(C_{ad})/\alpha$) for buffers with pH 2.0 (a) and pH 7.4 (b).

3.3.3.2. Distribution of substances in different environments

One of the important processes that plays a key role in drug administration is the distribution of substances into different tissues. Usually, this process corresponds to the initial stages of absorption, which precede diffusion processes (passive transport).

The different routes of drug delivery across membranes (transcellular or paracellular) are also determined by distribution characteristics. In other words, distribution processes describe the hydrophilic-lipophilic balance of the molecule.

In this part of the experiments, the distribution processes in immiscible media were investigated, as a model of different types of biological membranes. In particular, the 1-octanol/water buffer system (pH 7.4) describes the processes occurring in the membranes of the gastrointestinal tract, while the hexane/water buffer system (pH 7.4) – in the blood-brain barrier.

Unfortunately, due to the low solubility of the studied substances in hexane, we were unable to study the distribution processes in the hexane/buffer system (pH 7.4). The results of the experiments are presented in Table 19.

Tab.19. Experimental values of the partition coefficients in n-octanol/water (pH 7.4) ($D^{oct/buf}$), initial concentration of the donor solution (C_0^{donor}), apparent permeability coefficients (P_{app}) of the studied compounds, donor-acceptor ability of the molecule – forming hydrogen bonds ($\Sigma(C_{ad})$), donor-acceptor ability of the molecule to form hydrogen bonds, adjusted to the molecular polarizability ($\Sigma(C_a)/\alpha$).

Compound ds	$D^{oct/buf}$	$\log(D^{oct/buf})$	C_0^{donor} mol/l ⁻¹	$P_{app} \cdot 10^3$ cm.sec ⁻¹	$\log(P_{app})$	$\Sigma(C_{ad})$	$\Sigma(C_a)/\alpha$
Gly-Mem	78.2 ± 0.4	1.890	1.190·10 ⁻²	17.14 ± 0.23	-3.77	9.88	0.196
Val-Mem	73.6 ± 0.5	1.867	1.107·10 ⁻²	20.97 ± 1.48	-3.68	9.32	0.146
β-Ala-Mem	86.8 ± 2.8	1.938	4.255·10 ⁻³	7.138 ± 0.272	-4.15	9.76	0.179
(4-F)Phe-Mem	5484 ± 258	3.739	3.672·10 ⁻⁴	7.303 ± 0.089	-4.14	9.72	0.134
Tyr-Mem	923 ± 32	2.948	2.099·10 ⁻³	3.628 ± 0.115	-4.44	13.1	0.154

As shown in Table 19, the partition coefficients of the studied memantine derivatives with the n-octanol/buffer system (pH 7.4) ($D^{oct/buf}$) range from 73.62 to 5483.66 ($D^{oct/buf}$ from 1.87 to 3.74). This is in agreement with the optimal lipophilicity range ($\log D^{oct/buf} = 1-3$), which indicates good intestinal absorption due to the good balance of solubility and passive diffusion permeability.

Gly-Mem, Val-Mem, β -Ala-Mem and Tyr-Mem compounds have good lipophilicity characteristics. The studied memantine derivatives can be ranked by log Doct/buf value in the following order: (4-F)Phe-Mem $\geq$ Tyr-Mem $\geq$ β -Ala-Mem $\geq$ Gly-Mem $\geq$ Val-Mem.

Comparative analysis clearly shows that increasing the volume of the molecule with a benzene substituent leads to a significant increase in lipophilicity – approximately 69-fold and 12-fold for (4-F)Phe-Mem and Tyr-Mem, respectively.

3.3.3.3 Membrane permeability

To assess the relationship between the structure of memantine derivatives and their ability to penetrate biological membranes, the permeability coefficients through the new PermeapadTM membrane were determined using a Franz diffusion cell.

The permeability coefficient values are presented in Table 17. The permeability experiment revealed very close values of permeability coefficients for Gly-Mem and Val-Mem derivatives. The minimum value was observed for Tyr-Mem compound, which can be explained by the presence of an OH group attached to the benzene nucleus, which at pH 7.4 would easily dissociate.

It is well known that ionized molecules have lower permeability compared to uncharged ones. The increasing permeability coefficients of the compounds are in the following order: Val-Mem $\geq$ Gly-Mem $>$ (4-F)Phe-Mem $>$ β -Ala-Mem $>$ Tyr-Mem.

3.4. *In vitro* neuroprotective study of the newly synthesized compounds

In the etiology of AD, there are various factors that play a key role in the pathophysiological progression: β accumulation, hyperphosphorylation of tau protein, disruption of metal ion homeostasis, excitotoxicity, oxidative stress, neuroinflammation, and dysfunction of the neurotransmitter system [106].

Considering the complex pathogenesis of the disease, the design of multitargeted ligands (MTDLs) targeting multiple targets simultaneously is expected to be a more successful approach than monotherapy.

In this regard, hybrid memantine structures have been studied *in vitro* for neuroprotective effects of resistance to A β toxicity, excitotoxicity, oxidative stress, hypoxia and neuroinflammation.

3.4.1. Neuroprotective effects of memantine derivatives in APPswe cells due to Cu²⁺-induced A β toxicity (A)

APPswe cells, overexpressing the Swedish mutant form of human APP (amyloid precursor protein), were used as a cellular model of AD in this study. Transition metal ions (e.g. copper ions) are known to be involved in the formation and neurotoxicity of A β species [107, 108]. Cu²⁺ ions were applied to induce A β neurotoxicity [109].

The results show that the studied compounds have a relatively favorable neuroprotective effect. They maintain neuronal cell viability in beta-amyloid (A β)-induced cytotoxicity in the presence of copper ions, showing EC₅₀ values ranging from (0.218 $\pm$ 0.129) nM to (44.87 $\pm$ 9.30) μ M (Table 20, A).

Compared to the reference compound (memantine hydrochloride), (4-F)Phe-Mem demonstrated a relatively equivalent neuroprotective effect at nanomolar concentration, while Tyr-Mem showed much better neuroprotective properties with EC₅₀ values of (0.218 $\pm$ 0.129) nM. These results demonstrate that only amino acid derivatives of memantine have neuroprotective activity against A β -mediated neurotoxicity.

Table 20. Effective concentration (EC₅₀) and inhibitory concentration (IC₅₀) values of the tested compounds compared to those of memantine

Compounds	CuSO ₄ EC ₅₀ (μ M)	L-Glu EC ₅₀ (μ M)	H ₂ O ₂ EC ₅₀ (μ M)	CoCl ₂ EC ₅₀ (μ M)	TNF- α IC ₅₀ (μ M)	IL-6 IC ₅₀ (μ M)
	A	B	C	D	E	F
Gly-Mem	22.87 $\pm$ 1.89	31.33 $\pm$ 3.29	12.92 $\pm$ 0.74	0.74 $\pm$ 0.13	21.75 $\pm$ 3.88	26.10 $\pm$ 0.68
Val-Mem	44.87 $\pm$ 9.30	0.71 $\pm$ 0.06	19.07 $\pm$ 0.80	0.23 $\pm$ 0.07	53.23 $\pm$ 3.18	58.77 $\pm$ 0.66
β -Ala-Mem	33.17 $\pm$ 9.54	36.89 $\pm$ 10.86	> 100	0.12 $\pm$ 0.05	40.12 $\pm$ 1.29	42.39 $\pm$ 4.82
(4-F)Phe-Mem	1.26 $\times 10^{-2}$ $\pm$ 0.86 $\times 10^{-2}$	4.13 $\times 10^{-3}$ $\pm$ 0.23 $\times 10^{-3}$	0.62 $\pm$ 0.47	0.41 $\pm$ 0.06	0.023 0.016	0.26 $\pm$ 0.03
Tyr-Mem	2.18 $\times 10^{-4}$ $\pm$ 1.29 $\times 10^{-4}$	8.85 $\times 10^{-3}$ $\pm$ 0.92 $\times 10^{-3}$	9.16 $\pm$ 1.68	0.56 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.01	0.97 $\pm$ 0.02
Mem.HCl	8.34 $\times 10^{-3}$ $\pm$ 0.51 $\times 10^{-3}$	1.03 $\times 10^{-3}$ $\pm$ 0.16 $\times 10^{-3}$	1.07 $\pm$ 0.36	0.12 $\pm$ 0.05	0.08 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.01

3.4.2. Neuroprotective effects of memantine hybrids against NMDA-induced toxicity (B)

Elevated levels of extracellular glutamate have been shown to be toxic to neurons in a pathological process called excitotoxicity. It is implicated in Alzheimer's deficits due to prolonged activation and postsynaptic signaling components of ionotropic glutamate receptors, of which NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptors play a major role [110].

SH-SY5Y cells were used to induce excitotoxicity with NMDA at a concentration of 100 nM [111]. To investigate the neuroprotective effects

against NMDA-induced toxicity, the MTS assay was used, and to assess the efficacy of memantine derivatives, the EC₅₀ was used.

The results of the amino acid memantine hybrids (B, Table 20) showed that the compounds had a positive effect on the cell viability of SH-SY5Y cells exposed to L-Glu. The EC₅₀ ranged from (4.13 ± 0.23) nM to (36.89 ± 10.86) µM. Specifically, the compounds 4-F-Phe-Mem and Tyr-Mem showed approximately equivalent neuroprotective effects to the positive control memantine.

3.4.3. Neuroprotective effects of memantine hybrids against H₂O₂-induced toxicity (C)

Oxidative stress is known to be closely associated with age-related neurodegeneration in AD [112], in which significant accumulation of Aβ plaques is observed [113].

Increased oxidative stress is thought to be responsible for some of the earliest pathological changes in the brain in cognitive impairment due to AD [114].

Since memantine derivatives are effective in preventing glutamate-induced toxicity, we believe that their effects may reduce oxidative damage to neurons, which is correlated with excessive activation of NMDA receptors to some extent.

In Table 20 (C), the compound (4-F)Phe-Mem clearly stands out, which shows about 2 times better neuroprotective effect (EC₅₀ 0.62±0.47 µM) compared to the reference substance memantine (EC₅₀ 1.07±0.36 µM).

These results suggest that some of the tested structural derivatives of memantine likely possess antioxidant activity, which is consistent with their beneficial effects on glutamate-induced cellular toxicity.

3.4.4. Neuroprotective effects of memantine derivatives against hypoxia-induced toxicity (D)

During disease progression, oxygen supply to the brain gradually decreases [115].

The protective effect of memantine analogues against hypoxia (a pathological state of oxygen deficiency in the body) was studied on PC12 cells treated with CoCl₂ [116].

As shown in Table 20 (D), most of the compounds showed excellent neuroprotective activity with EC₅₀ values ranging from 0.12±0.05 µM to 0.74±0.13 µM relative to the reference memantine. In this study, a correlation was observed with their antioxidant and antiexcitotoxic properties.

This indicates that these structural derivatives of memantine likely have multipharmacological effects on neuronal cells.

3.4.5 Anti-inflammatory effects of memantine derivatives against LPS-induced inflammation in microglial cells (E and F)

Neuronal dysfunction and synaptic damage in AD are induced by A β and are partly mediated by microglia and astrocyte activation, producing inflammatory cytokines and increasing A β levels [117].

Pharmacological suppression of neuroinflammation is also considered as a possible approach for the prevention and treatment of AD. EOC20 cells stimulated by LPS were used to “mimic” neuroinflammatory and neurotoxic activation of microglia. To investigate the potency of memantine derivatives on the inhibitory effects of TNF- α and IL-6 (derived from EOC20 cells stimulated by LPS) ELISA assay was used.

As shown in Table 15 (E and F), the tested memantine analogs had the ability to inhibit the release of TNF- α and IL-6, with all IC₅₀ values less than 60 μ M. In particular, the compounds 4-F-Phe-Mem and Tyr-Mem showed favorable inhibitory activity on TNF- α and IL-6 release, similar to the control memantine.

These results indicate that the studied derivatives have a potential effect on neuroinflammatory action.

3.5. *In vivo* toxicological characterization of newly synthesized compounds

3.5.1. Acute toxicity

White male ICR mice with an initial body weight of 20-22 g were used, bred in the standard conditions of the vivarium at the Institute of Neurobiology-BAS, and all experiments were performed in accordance with the rules for working with experimental animals (Regulation No. 20 of 01.11.2012).

For *in vivo* experiments, compounds from different chemical groups (Tyr-Mem, Cav-Mem) exhibiting the most promising *in vitro* characteristics were selected.

The animals were treated with the indicated compounds, and the starting substances – memantine, cavintone, tyrosine – were used as controls. The animals were adapted for three days in the vivarium conditions. Each separate group was treated with three ascending toxic doses, two per subgroup. The injection volume was 0.1mL/10g. b.t. intraperitoneally (ip).

The animals were observed for toxic effects up to 1 hour, up to 6 hours, up to 24 and 48 hours, when mortality in the groups was recorded and the carcasses were dissected.

Other groups of the above were observed for prolonged toxicity after 48 hours and up to 5 days from the last treatment. The animals were dissected.

Observations of the acute toxicity of substances in high doses showed the following:

- Cav-Mem – severe tremor, increased locomotor activity, increased cleaning and enhanced orienting activity, rapid breathing, ataxia, death from respiratory arrest;
- Tyr-Mem - no toxic manifestations in the tested doses;

- memantine (Mem) – severe tremor, seizures, cyanosis;
- Cavinton (Cav) – depression, ataxia;
- tyrosine (Tyr) – no toxic manifestations

Initial data on lethal and effective doses are:

- Cav-Mem – LD₅₀=over 160 mg/kg ip, ED₅₀;
- Tyr-Mem – LD₅₀= over 250 mg/kg, ED₅₀= 30 mg/kg;
- memantine – LD₅₀=85-90 mg/kg ip, ED₅₀= 20 mg/kg ip/the data are close to the literature data for memantine [118] ;
- Cavinton – LD=300 mg/kg /according to literature data about 200/ ED₅₀= 40-60 mg/kg;
- Tyr - LD₅₀- over 3.5 g/kg according to citation data [119], practically non-toxic;

The results of the acute toxicity of memantine hybrids at high doses show that only Tyr-Mem lacks toxic manifestations at the doses tested. The data for lethal and effective doses are similar.

3.6 Neurobiological studies of newly synthesized compounds

3.6.1. The neuropharmacological activity of memantine hybrids (Tyr-Mem, Cav-Mem)

An initial training according to the step through test was conducted on animals from all groups. At the 24th hour, the animals were injected once with effective doses of the substances/controls received the same volume of saline and 1 hour after the injection, their memory was tested again in 3 different doses.

Treatment continues daily at the same effective doses until day 5. 24 hours after the last treatment – i.e. on day 6, changes in memory and learning are again monitored with the same test.

They are left for several hours to recover, then decapitated. The brains are removed on ice, washed with ice-cold saline, and frozen at sub-zero temperatures for subsequent biochemical analysis.

3.6.2. Studies on the behavioral responses of treated animals (mice)

Monitoring for changes in memory and learning in rodents (step through test; passive avoidance with negative reinforcement) according to the method of Jarvik and Kopp/1967/ [120].

Dose-response effect of Tyr-Mem (20, 30 and 40 mg/kg).

Tyr-Mem (20, 30 and 40 mg/kg) – in all three doses tested, the substance did not change the duration of the latent reaction time compared to controls and had no memory-impairing effect (Fig. 32C)

Memantine (10, 20 and 30 mg/kg) - in the low and high dose does not change the duration of the latency of the reaction compared to controls and has no memory-impairing effect. In the middle dose (20 mg/kg) it shows a decrease in the latency time 1 hour after the injection of the first dose, an effect that completely disappears after 5 days of treatment (Fig. 32B).

It can be seen that the effect of the new hybrid molecule (Tyr-Mem) on memory is better than that of the original memantine (10, 20 and 30 mg/kg). The data are the same regarding the toxicity of both substances.

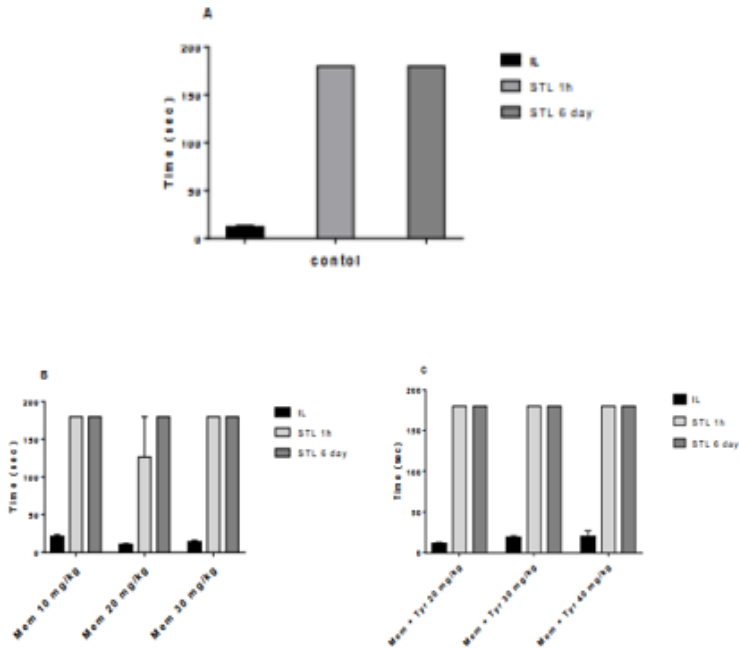


Fig 32. Dose-response effect of memantine (10, 20 and 30 mg/kg) and Tyr-Mem (20, 30 and 40 mg/kg).

The substances were administered for five consecutive days. Results were read 1 hour after the first injection and on day 6 (24 hours after the last injection).

Dose-response effect Cav-Mem (7, 14 and 28 mg/kg).

Cav-Mem (7, 14 and 28 mg/kg). – the middle dose has no memory-impairing effect. The low (7 mg/kg) and high (28 mg/kg) showed a slight decrease in

latency time at 1 hour and after 5 days of treatment, respectively, compared to the control (Fig. 33 D).

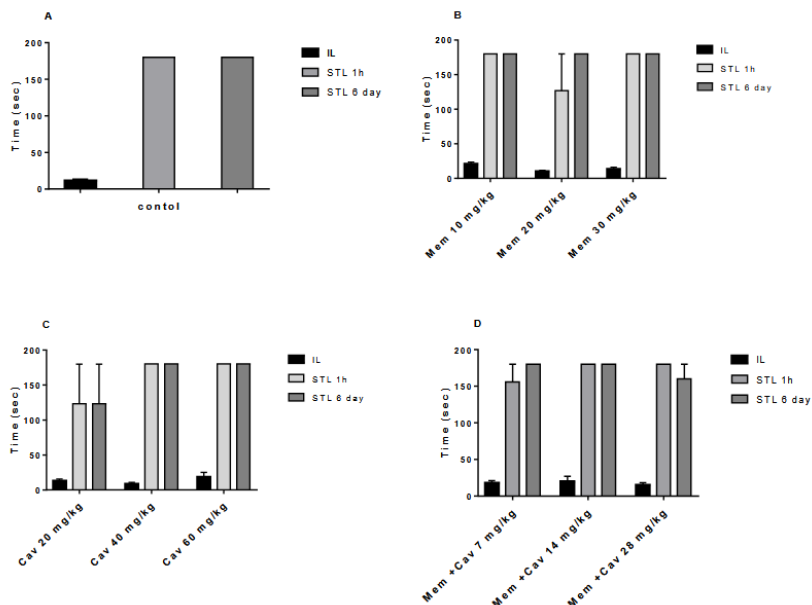


Fig. 33. Dose-response effect of memantine (10, 20 and 30 mg/kg), cavintone (20, 40 and 60 mg/kg) and CavMem (7, 14 and 28 mg/kg). The substances were administered for five consecutive days. The results were read 1 hour after the first injection and on day 6 (24 hours after the last injection).

Compared to memantine (10, 20 and 30 mg/kg), which at the low and high dose did not change the duration of the latency of the reaction compared to controls and had no memory-impairing effect. At the middle dose (20 mg/kg) it showed a decrease in the latency time 1 hour after the injection of the first dose, an effect that completely disappeared after 5 days of treatment (Fig. 33B).

Cavinton (20, 40 and 60 mg/kg) – the medium and high dose of the substance did not have a memory-impairing effect. However, the low dose reduced the duration of the latency time compared to the control both 1 hour after the injection of the first dose and after 5 days of treatment, which indicates a memory-impairing effect (Fig. 33C).

At the high dose of 60 mg/kg, mortality was observed on the 3rd and 4th day, indicating prolonged toxicity of the substance.

The substance was administered as an intraperitoneal suspension in tablet form, which may have a damaging effect on the peritoneal cavity.

The new hybrid molecules (Tyr-Mem and Cav-Mem) have comparable effects on memory functions to memantine - in acute experience and after 5 days of treatment and have significantly lower acute toxicity. The effects of the same complex molecules on memory are also comparable to those of the original cavintone and tyrosine (data not shown), with significantly reduced acute toxicity.

3.7. Biochemical and histological studies of Tyr-Mem on experimental dementia in mice

The studies were performed on an experimental model of AD-type dementia - by administering scopolamine for 9 days, at a dose of 1 mg/kg. Male ICR mice (18-20g) were used for this purpose.

The following doses were used for controls:

Saline (0.1 mL/10g, intraperitoneal (i.p.))

Memantine (20 mg/kg, i.p.)

Tyr-Mem (20 mg/kg, i.p.)

Tyrosine (40 mg/kg, i.p.)

All tested substances, including saline in the controls, were administered daily for 9 consecutive days, in parallel with scopolamine.

Behavioral methods were used - a method for determining changes in learning and memory processes (step through) and a method for determining changes in exploratory behavior ("hole board" test).

The experimental data were processed using the analysis of variance method using the one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) method.

3.7.1 Effect of Tyr-Mem on learning and memory processes in demented mice.

Using a passive avoidance test with negative reinforcement, the effect of Tyr-Mem on scopolamine-altered learning and memory processes in the experimental animals used was assessed (Fig. 34).

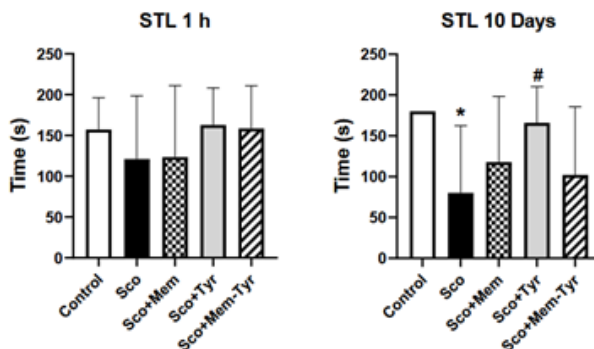


Fig. 34. Effect of Tyr-Mem on learning and memory processes in a scopolamine model of dementia. Results are presented as the arithmetic mean and its standard deviation from 8 samples per group. Asterisks indicate a statistically significant difference between the Sco and Control groups at $*P < 0.05$. Hashtags indicate a statistically significant difference between the Sco + Tyr and Sco groups at $\#P < 0.05$.

The apparatus used for this test has two chambers - a light and a dark chamber. In the dark chamber, the floor is ribbed and an electric current (0.8 mA for 3 s) flows through it on demand. In this test, a contradiction is created between the animal's natural instincts to move from the light to the dark chamber and the electrical stimulation they receive there.

The test itself has two phases: 1. Training phase - it measures the time it takes for the animal to move from the light to the dark part of the apparatus (primary latency), where it will receive the electrical stimulation. 2. Recall phase - in this phase, it is measured how much the animals have remembered the meaning of the negative stimulus (electrical stimulation).

The time spent in the light part of the apparatus (stepthrough latency, STL), within 180s, is an indicator of the performance of the task - to remember the stimulus. Our results show that the administration of scopolamine (a cholinergic receptor antagonist) disrupts the learning and memory processes in experimental animals. Both short-term (1 hour) and long-term memory (10 days) are affected.

At 1 hour after treatment with scopolamine, the decrease in STL was 23.57% (ns), and at 10 days by 55.48% ($P < 0.05$) compared to the control. Regarding short-term memory, Tyr and Tyr-Mem showed the best memory-stimulating effect, returning the scopolamine-decreased STL close to control levels. Memantine did not affect the scopolamine-impaired short-term memory of the mice in the respective group.

Regarding long-term memory, the statistically significant, strongest and most positive effect was that of Tyr. The increase in STL in this group was 52% ($P < 0.05$) compared to scopolamine-treated animals.

In the group of memantine-treated animals, a slight and non-significant increase in STL was noted compared to the demented group. According to our results, treatment with Tyr-Mem did not affect the scopolamine-impaired long-term memory in the test used.

Memantine has a weak positive effect on impaired long-term memory in mice with an experimental, scopolamine-induced dementia model. The effect of Tyr is also positive, very well-marked and manifests itself in both short-term and long-term memory.

Tyr-Mem has a positive effect only on scopolamine-impaired short-term memory, with its effect being comparable to that of Tyr.

3.7.2. Effect of Tyr-Mem on the exploratory behavior of demented mice

The holeboard test was used to track changes in the animals' exploratory behavior between the different experimental groups. The holeboard apparatus is a platform raised from the ground with 16 regularly arranged holes. The frequency with which the animals peer into them per unit time is used to judge their exploratory behavior and degree of anxiety.

Our results showed that in the scopolamine-treated group of animals there was a stimulation of exploratory behavior. One hour after treatment, animals from this group peeked about 1.5 ($P < 0.05$) times more, and 10 days after the first treatment about 4 ($P < 0.001$) times more than controls.

In the short term, only memantine treatment returned the animals' peeks/3 min to control levels. In the Tyr-Mem-treated groups, the animals' exploratory behavior was strongly stimulated, both in comparison to the controls and the scopolamine group.

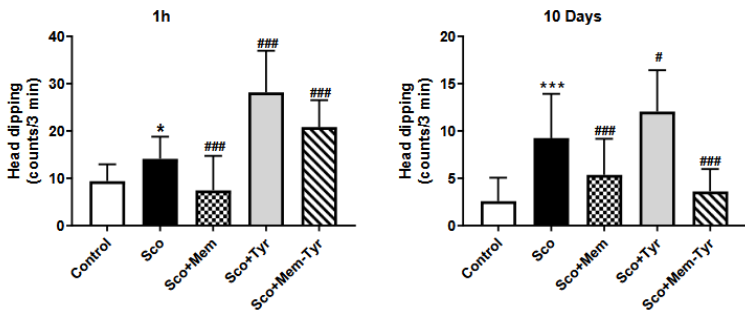


Fig.3

5. Effect of Tyr-Mem on exploratory behavior of mice in a scopolamine model of dementia. Results are presented as arithmetic mean and its standard deviation from 8 samples per group. Asterisks indicate a statistically significant difference between the Sco and Control groups at * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

Hashtags indicate a statistically significant difference between Sco and the other experimental groups at # $P < 0.05$; ### $P < 0.001$.

At 10 days after the first treatment, exploratory behavior in the Tyr-Mem group was closest to controls, and in the memantine group it was 42% ($P < 0.001$) less pronounced compared to the scopolamine group. Only in the tyrosine-treated animals did the levels of exploratory activity in the animals remain high.

In the short term, treatment with memantine, and in the long term, treatment with Tyr-Mem, restores control levels of exploratory activity in experimental animals.

3.7.3 Effects of tyrosine-memantine on the level of oxidative stress in the brain of demented mice

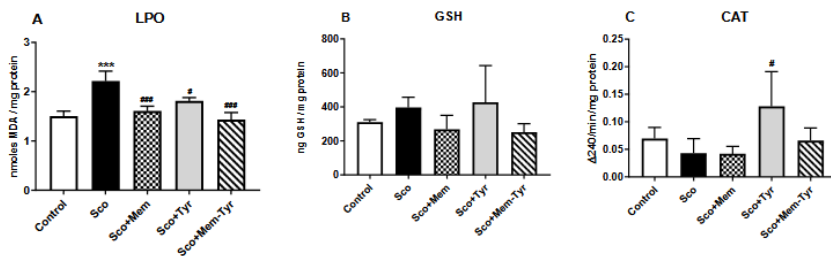


Fig.36. Effect of Tyr-Mem on the level of oxidative stress in the brain of mice with a scopolamine model of dementia. The results are presented as the arithmetic mean and its deviation from 8 samples per group. Asterisks indicate a statistically significant difference between the Sco and Control groups at *** $P < 0.001$. Hashtags indicate a statistically significant difference between Sco and the other experimental groups at # $P < 0.05$; ### $P < 0.001$

Our results show that scopolamine treatment increased the levels of biochemical markers of oxidative stress in the brain homogenates studied. Thus, the levels of lipid peroxidation in the scopolamine group were increased by 32% ($P < 0.001$), and those of the antioxidant enzyme CAT were decreased by 42% (ns) compared to the control.

In none of the other experimental groups was there an increase in lipid peroxidation levels, indicating that the pro-oxidant effect of scopolamine was suppressed. Tyrosine showed a tendency to increase the levels of the natural non-enzymatic cellular antioxidant glutathione and strongly increased the activity of the antioxidant enzyme SAT - more than threefold compared to the scopolamine group.

All the studied molecules showed antioxidant effect expressed in maintaining control levels of lipid peroxidation in brain homogenates of animals treated with scopolamine. Only tyrosine had a stimulating effect on the enzymatic antioxidant defense system of cells.

3.8. Antiviral activity against influenza viruses *in vitro*

The experimental results of the antiviral activity of the compounds tested against 3 influenza strains are presented in Table 21. The experimental results were similar when tested in triplicate.

New memantine analogues with the amino acids glycine, valine, β -alanine, (4-F)phenylalanine and tyrosine were tested for antiviral activity against the influenza virus strain A/Fort Monmouth/1/1947 (H1N1), as well as strains A/Wuhan/359/1995 (H3N2) and A/Jinnan/15/2009 (H1N1) resistant to oseltamivir.

Table 21. Antiviral activity of memantine derivatives against three influenza strains

compounds	TC ₅₀ μg/mL	A/FortMonmouth/1/1947		A/Jinnan/15/2009		A/Wuhan/359/1995	
		IC ₅₀ μg/mL	SI	IC ₅₀ μg/mL	SI	IC ₅₀ μg/mL	SI
Gly-Mem	96.23	>55.56	-	>55.56	-	>55.56	-
Val-Mem	32.08	10.69	3.0	>18.52	-	>18.52	-
β-Ala-Mem	96.23	>55.56	-	>55.56	-	>55.56	-
(4-F)Phe-Mem	32.08	>18.52	-	>18.52	-	>18.52	-
Tyr-Mem	288.68	>166.67	-	166.67	1.7	>166.67	-
Oseltamivir	577.35	2.47	233.7	115.47	5.0	3.12	185.0
Amantadine	39.22	0.32	122.6	2.86	13.71	2.86	13.71

The influenza A/ Fort Monmouth/1/1947 (H1N1) strain is believed to be a descendant of the Spanish flu, which caused 50 to 130 million deaths from January 1918 to December 1920. The valine analogue of memantine (Val-Mem) showed marginal activity against the oseltamivir-susceptible strain A /FortMonmouth /1/1947, the other compounds were inactive. However, activity was not observed in the oseltamivir-resistant strains A/Jinnan/15/2009 and A/Wuhan/359/1995. It is important to emphasize that there the activity of amantadine was also significantly reduced. These results indicate that the role of aromatic and aliphatic amino acids is not crucial for anti-influenza activity. Memantine amino acid analogues were also tested for antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as for activity against yeasts.

3.9. Antimicrobial activity

3.9.1. Activity against Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria

Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* NBIMCC (6538), *Bacillus megaterium*, Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* (NBIMCC 3397), *Salmonella enterica* (NBIMCC 869) and yeasts: *Rhodotorula* sp. (BF 16-25), *Candida lusitanae* (BF 74-4). The antibacterial activity of the tested compounds is presented in Table 22. Two concentrations were prepared: 1 mM and 10 mM. The efficacy of the test compounds was determined by measuring the zone of inhibition (in mm) and compared to the controls. The compound (4-F)Phe-Mem showed the highest antibacterial activity, both against Gram-

positive and Gram-negative bacteria. Its inhibitory effect is similar to that of commercially available tetracycline (30µg/disk). The antibacterial activity of the compounds Val-Mem and Thz-Mem is lower and variable, between 10 and 16 mm inhibition zone. Compound β-Ala-Mem demonstrated activity only against *S. enterica*, while compounds Gly-Mem and Fmoc-Thz-Thz-Mem were inactive. All tested compounds were dissolved in DMSO. The solvent, 4-F-L-phenylalanine, tetracycline and memantine (nemdatin 10 mg tablets) were included as reference compounds.

Table 22. Activity of memantine analogues against Gram (+) and Gram (-) bacteria, at a concentration of 10 mM

Compounds (10 mM)	Gram (-) bacteria		Gram (+) bacteria	
	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. megaterium</i>
Gly-Mem	n/a	n/a	n/a	n/a
Val-Mem	11	11	n/a	16
β-Ala-Mem	16	n/a	n/a	n/a
(4-F)Phe-Mem	20	22	21	22
Thz-Mem	n/a	13	10	16
Fmoc-Thz-Thz-Mem	n/a	n/a	n/a	n/a
Memantine.HCl - (C ₁)	n/a	n/a	n/a	n/a
(4-F)Phenylalanine - (C ₂)	n/a	n/a	n/a	n/a
DMSO - (C ₃)	n/a	n/a	n/a	n/a
Tetracycline - (C ₄)	26	26	28	34

* The area of inhibition is presented in mm, including the well.

** C₁ и C₂ – main component of (4-F)Phe-Mem, C₃ – negative control; C₄ – positive control

In the study with a concentration of 1 mM, only the compound (4-F)Phe-Mem showed an inhibitory effect, only on the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus megaterium*.

3.9.2 Activity against yeast

Yeasts are widely distributed in nature and can often cause mycoses in individuals with immunocompromised status. Species belonging to the genera *Candida* and *Rhodotorula* are among the main causative agents of mycoses. The anti-yeast activity of the new memantine analogues was tested by the agar diffusion method. The inhibition data are presented in Table 23. Strikingly, (4-F)Phe-Mem was the only compound active against all tested

microorganisms. Its effect was similar to the well-known antifungal drug nystatin. The compound Gly-Mem had activity only against the microorganism *Sacch. cerevisiae*.

Table 23. Activity of memantine analogues against yeast at a concentration of 10 mM

Съединения (10 mM)	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>Candida lusitanae</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
Gly-Mem	n/a	n/a	14
Val-Mem	n/a	n/a	n/a
β -Ala-Mem	n/a	n/a	n/a
(4-F)Phe-Mem	26	23	21
Thz-Mem	n/a	n/a	n/a
Fmoc-Thz-Thz-memantine	n/a	n/a	n/a
Memantine.HCl - (C ₁)	n/a	n/a	n/a
(4-F)Phenylalanine - (C ₂)	n/a	n/a	n/a
DMSO - (C ₃)	n/a	n/a	n/a
Nystatin - (C ₄)	26	24	n/a

* The inhibition zone is presented in mm, including the well.

** C1 and C2 – main component of (4-F)Phe-Mem,

C3 – negative control; C4 – positive control

3.9.3. Quantitative analysis of antimicrobial activity: Determination of minimum inhibitory/bactericidal concentration (MIC)

The compound Gly-Mem was active against *Salmonella enteria* and *Bacillus megaterium* with a MIC value of 1.25 mM. Regarding β -Ala-Mem, we observed low antimicrobial activity (MIC = 10 mM) against *Escherichia coli*. Compound (4-F)Phe-Mem demonstrated the highest antimicrobial potential against all tested microorganisms. MIC values were in a wide range, from 1.25 mM to 0.078 mM.

The compound Thz-Mem was also active against all tested microorganisms, but at higher concentrations compared to 4-F-Phe-Mem. Val-Mem also had activity, but at higher concentrations. The results are presented in Table 24.

Table 24. Minimum inhibitory concentration values of memantine analogues

Compounds (μM)	Gram (–) Bacteria		Gram (+) Bacteria		Yeasts	
	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>Rhodotorula sp.</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
Gly-Mem	1.25	n/a	n/a	1.25	n/a	0.3125
Val-Mem	1.25	5	10	2.5	n/a	0.3125
β -Ala-Mem	n/a	10	n/a	n/a	n/a	0.078
(4-F)Phe-Mem	0.156	1.25	1.25	0.625	0.078	0.078
Thz-Mem	5	5	10	10	1.25	0.3125

The antimicrobial activity of the compounds can be arranged in this sequence:

S. enterica: (4-F)Phe-Mem >> Val-Mem $\approx$ Gly-Mem > Thz-Mem;

E. Coli: (4-F)Phe-Mem > Val-Mem $\approx$ Thz-Mem > β -Ala-Mem

St. Aureus: (4-F)Phe-Mem >> Val-Mem $\approx$ Thz-Mem;

B. megaterium: (4-F)Phe-Mem > Gly-Mem > Val-Mem >> Thz-Mem;

Rhodotorula sp.: (4-F)Phe-Mem >> Thz-Mem;

Candida lusitaniae: (4-F)Phe-Mem $\approx$ β -Ala-Mem > Val-Mem $\approx$

Gly-Mem $\approx$ Thz-Mem.

3.9.4. Time-Kill test for evaluation of bacteriostatic/bactericidal activity

Time-Kill тестът на (4-F)Phe-Mem проведен с най-чувствителните бактериални видове *Salmonella enterica*, показва бактерициден ефект и 100% и инхибиране на растежа на бактериите след 7 часа култивиране в присъствието на изпитваното вещество (Фиг. 37)

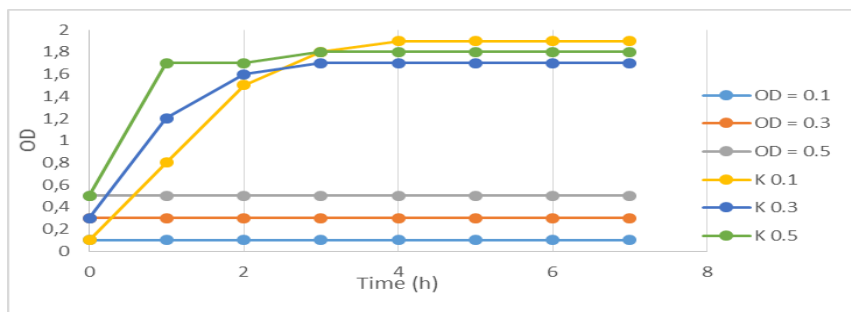


Fig. 37. Growth dynamics of *Salmonella enterica* in the presence of 1 mM (4-F)Phe-Mem.

Complete inhibition was observed regardless of the initial cell density of the test culture (0.1, 0.3 or 0.5 units, McFarland standard). Over the same period, the corresponding untreated controls reached a cell density of 1.7 - 1.9 units, McFarland standard. The potential of (4-F)Phe-memantine to affect fungal growth was assessed by measuring the radial growth rate (Kr) of two fungal strains *Penicillium chaviforme* and *Fusarium graminearum*. The results presented show a strong inhibitory effect on the growth of the fungi in the range of 8% for *Penicillium chaviforme* and 62.9% for *Fusarium graminearum*, compared to the untreated controls (Table 25).

Table 25. Inhibition of radial growth rate (Kr) of filamentous fungi in the presence of (4-F)Phe-Mem

Hours	<i>Penicillium chaviforme</i> d (mm)				<i>Fusarium graminearum</i> d (mm)			
	<i>C_{Penicillium}</i>	Tops in	DMS O	(4-F)PheMem	<i>C_{Fusarium}</i>	Tops in	DMS O	(4-F)PheMem
0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	5,6	0/0	9,8	7,6	10/7	15/16	20/22	7/7
48	11,12	0/0	14/13	11,10	26/26	39/39	39/39	35/35
72	16/16	0/0	13/14	15/14	52/49	44/44	70/62	43/49
98	21/21	0/0	23/23	20/19	71/70	49/45	83/82	46/50
120	25/25	0/0	27/27	24/22	85/85	50/50	85/85	51/55
Kr (mm/h)	19.7	0	17.5	15.7	84.9	49.8	84.8	19.8

4. CONCLUSIONS

1. Synthesized were: eight new analogs of memantine – with the unnatural acids H-Phe(4-F)-OH, H- β -L-Ala-OH and with the natural amino acids H-Gly-OH, H-Val-OH, H-Phe-OH, H-Ala-OH, H-Tyr-OH, 4 new analogs of memantine with nootropics: cavintone, piracetam, modafinil and picamilon, and 2 new analogs of memantine with thiazole derivatives.

2. X-ray diffraction analysis of β -Ala-Mem and (4-F)Phe-Mem was performed. The results showed that single crystals of β -Ala-Mem were crystallized in a centrosymmetric manner, and the compound (4-F)Phe-Mem in a non-centrosymmetric manner.

3. The chemical stability of some of the new memantine analogues with Ala, β -Ala, Gly, Phe and Val at pH= 1 and pH= 7.4 was investigated. The results obtained show high stability of the analogues > 10 hours.

4. The following physicochemical studies were conducted - change in solubility, lipophilicity of the compounds was determined and comparative analysis showed that increasing the volume of the molecule with a benzene substituent lead to a significant increase in lipophilicity - approximately 69- and 12-fold for (4-F)Phe-Mem and Tyr-Mem, respectively.

5. The in vitro antioxidant activity of a series of hybrids of memantine with different amino acids was investigated and it was found that the activity of the compounds was insignificant except for Gly-Gly-MEM, (4-F)Phe-Mem and Phe-Mem.

6. Antiviral activity against influenza virus's A/Fort Monmouth/1/1947 (H1N1), as well as strains A/Wuhan/359/1995 (H3N2) and A/Jinnan/15/2009 (H1N1) in vitro was determined and it was shown that H-Val-Mem showed borderline activity against the oseltamivir-susceptible strain A/FortMonmouth/1/1947, the other compounds were inactive. These results indicate that the role of aromatic and aliphatic amino acids is not crucial for anti-influenza activity.

7. The effect of the memantine hybrid (Tyr-Mem) against Parkinson's disease has been studied. It was found that the new memantine hybrid - Tyr-Mem, improves memory functions comparable to memantine and shows lower toxicity. The effects of the same complex molecules on memory are also comparable to those of the original cavintone and tyrosine, with significantly reduced acute toxicity. The biological and histological studies conducted on the memantine hybrid (Tyr-Mem) show that it has a positive effect only on short-term memory impaired by scopolamine, with its effect being comparable to that of H-Tyr-OH.

8. The in vitro neuroprotective activity of the newly synthesized compounds against Alzheimer's disease was investigated.

- Amino acid memantine hybrids showed neuroprotective effects against copper-induced A β toxicity, glutamate-induced excitotoxicity, oxidative stress and hypoxia. They also showed inhibition of inflammatory cytokine release from activated microglia and potential anti-neuroinflammatory effects. The two most promising compounds (4-F) Phe-memantine and Tyr-memantine demonstrated equivalent activities to the control memantine hydrochloride.

9. The antimicrobial activity of the newly synthesized analogues against Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeasts was investigated

- Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* NBIMCC (6538), *Bacillus megaterium*, Gram-negative bacteria: *Escherichia coli* (NBIMCC 3397), *Salmonella enterica* (NBIMCC 869) and yeasts: *Rhodotorula* sp. (BF 16-25), *Candida lusitanae* (BF 74-4). The results show that H-(4-F) Phe-Mem is effective against all tested strains. The inhibitory effect is comparable to that of the antibiotic's tetracycline and nystatin.

- The derivative H-(4-F)-Phe-Mem, which exhibits the best neuroprotective effect in vitro against Alzheimer's disease, shows an inhibitory effect against clinically relevant, opportunistic pathogens comparable to that of the antibiotics tetracycline and nystatin. This result is promising because in patients suffering from moderate to severe dementia of the AD type (usually in old age), infectious diseases are concomitant.

5. CONTRIBUTIONS

1. A design was created and a targeted synthesis of memantine derivatives was performed.

2. 16 new analogues of memantine have been synthesized – with the unnatural acids H-(4-F)Phe-OH, H- β -L-Ala-OH, with the natural amino acids H-Gly-OH, H-Val-OH, H-Phe-OH, H-Ala-OH, H-Tyr-OH, with nootropics: cavintone, piracetam, modafinil and picamilon, and with thiazole derivatives.

3. A derivative has been found that exhibits the best neuroprotective effect in vitro against Alzheimer's disease and has a significant inhibitory effect against clinically relevant, conditionally pathogenic microorganisms comparable to that of the antibiotics tetracycline and nystatin - H-(4-F)-Phe-Mem.

Appendices

List of scientific publications related to the dissertation:

1. **A Tencheva**, R Liu, TV Volkova, R Chayrov, Y Mitrev, M Štícha, Y Li, H Jiang, Zh Li, I Stankova and G L Perlovich, Synthetic analogues of memantine as neuroprotective and influenza viral inhibitors: in vitro and physicochemical studies, *Amino acids*, 2020, 52,1559–1580, **Q1**
2. **Aleksandra Tencheva**, Radoslav Chayrov, Petko Mandjukov, Dancho Danalev and Ivanka Stankova, Hydrolytic stability of new amino acids analogues of memantine, *Scientia Pharmaceutica*, 2020, 88(3), 38, **Q2**

List of noted quotes:

1. Chayrov, R. L., Stylos, E. K., Chatziathanasiadou, M. V., Chuchkov, K. N., **Tencheva, A. I.**, Kostagianni, A. D., Milkova, Ts. S., Angelova A. L., Galabov A. S., Shishkov S. A., Todorov D. G., Tzakos A. G., Stankova, I. G., (2018). Tailoring acyclovir prodrugs with enhanced antiviral activity: Rational design, synthesis, human plasma stability and in vitro evaluation, *Amino acids*, 50, 1131-1143, **Q1**

Quoted:

1. Pergolizzi Jr, Joseph V., et al. "Pharmacologic agents directed at the treatment of pain associated with maladaptive neuronal plasticity." Expert opinion on pharmacotherapy 23.1 (2022): 105-116.
2. Chayrov, Radoslav, et al. "Synthesis, neuroprotective effect and physicochemical studies of novel peptide and nootropic analogues of alzheimer disease drug." Pharmaceuticals 15.9 (2022): 1108.
3. Todorov, Petar, et al. "Synthesis and characterization of new 5, 5'-dimethyl-and 5, 5'-diphenylhydantoin-conjugated hemorphin derivatives designed as potential anticonvulsant agents." New Journal of Chemistry 46.5 (2022): 2198-2217.
4. Todorov, Petar, et al. "Study of novel peptides for antimicrobial protection in solution and on cotton fabric." Molecules 27.15 (2022): 4770.
5. Yang, Cuiting, et al. "Synthesis of acid-activated reversible conversion supramolecular nanoplatfrom: application in drug delivery and anti-tumor activity." Macromolecular Research 32.1 (2024): 71-83.

6. Zakzouk, Wesam Samy, Ahmed Barakat, and Omar Alfarouk Rabiee. "Assessment of Pomegranate Peel and Seeds extracts antiviral potential and antioxidant activity against HAV and HSV-1 virus models and related In Silico computational study." *Egyptian Journal of Chemistry* 68.3 (2025): 217-233.
7. Kumar, Vinod, et al. "Memantine-Based Derivatives: Synthesis and Their Biological Evaluation." *Natural Product-based Synthetic Drug Molecules in Alzheimer's Disease: Therapeutic & Theranostic Agents*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. 185-209.
8. Пиотровский, Левон Борисович, Л. Г. Кубарская, and М. А. Брусина. "NMDA-рецепторы как фармакологическая мишень." *Экспериментальная и клиническая фармакология* 86.2 (2023): 36-41.
9. Xiao, Danmei, et al. "The Activity of Plant-Derived Ren's Oligopeptides-1 against the Pseudorabies Virus." *Animals* 12.11 (2022): 1341.

Participation in international conferences

Aleksandra Tencheva, R. Chayrov, I. Stankova, D. Marinkova, R. Raykova, D. Danalev: Synthesis and antimicrobial activity of some amino acids esters containing adamantane. 8th BULGARIAN PEPTIDE SYMPOSIUM with international participation, Stara Zagora, 2018.

Aleksandra Tencheva, Maya Chochkova, Radoslava Kyoseva, Hailun Jiang, Rui Liu, Yavor Mitrev and Martin Sticha, Memantine-cinnamic acid hybrids: Synthesis and in vitro evaluation of their effects against Alzheimer's disease, 28th International Conference on Neuroscience and Neurochemistry and 28th Euro- Global Neurologists Meeting, June 13-14, 2019, Barcelona, Spain.

Aleksandra Tencheva, Radoslav Chayrov, Ivanka Stankova: Amantadine and rimantadine analogues with glycine based amino acids and small peptides, 9th International Conference of Peptides, Velingrad, 2021.

Ivanka Stankova, **Aleksandra Tencheva**, Radoslav Chayrov, Tsvetelina Angelova, Veronika Nemska, Nelly Georgieva, Dancho Danalev: Biological activity of amino acid derivatives of memantine, 9th International Conference of Peptides, Velingrad, 2021.

Participation in projects

KП-06-M 23/2 of 18.12.2018 "Newly synthesized memantine derivatives with potential preventive effects against Alzheimer's type dementia" supervised by Senior Assistant Professor Dr. Radoslav Chayrov