



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCZYNY
LABORATORYJNEJ

Damian Szczesny

**Oznaczanie fizykochemicznych i biochemicznych
właściwości naturalnych alkaloidów pirydynowych
i piperydynowych oraz ich prostych pochodnych,
istotnych dla działania przeciwko chorobie Alzheimera**

Praca doktorska wykonana
w Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:

prof. dr hab. Roman Kaliszan, czł. rzecz. PAN

Gdańsk 2016

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej zostały sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu Preludium (Nr 2012/07/N/NZ7/04275).

STRESZCZENIE	5
ABSTRACT	7
WYKAZ SKRÓTÓW	9
1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	14
1.1. Choroba Alzheimera jako przykład schorzenia stanowiącego istotny problem społeczny.....	14
1.2. Obraz kliniczny i diagnostyka choroby Alzheimera	15
1.2.1. Obraz kliniczny oraz diagnostyka w oparciu o kryteria kliniczne	15
1.2.2. Biomarkery choroby Alzheimera	18
1.3. Czynniki ryzyka i patofizjologia choroby Alzheimera	20
1.3.1. Czynniki ryzyka i mutacje genetyczne w chorobie Alzheimera.....	20
1.3.2. Rola amyloidu β w chorobie Alzheimera	23
1.3.3. Hiperfosforylowane białko tau.....	25
1.3.4. Wybrane teorie tłumaczące rozwój choroby Alzheimera.....	26
1.4. Farmakoterapia choroby Alzheimera.....	30
1.4.1. Obecnie stosowane leki spowalniające rozwój choroby Alzheimera	30
1.4.2. Eksperymentalne strategie leczenia choroby Alzheimera	36
1.4.3. Znaczenie alkaloidów pirydynowych oraz piperydynowych w leczeniu choroby Alzheimera.....	46
1.5. Przykładowe sposoby oceny potencjalnych leków przeciwko chorobie Alzheimera	50
2. CEL PRACY	58
3. MATERIAŁY I METODY	60
3.1. Dokowanie trygoneliny oraz innych pochodnych alkaloidów pirydynowych do cząsteczki β -amyloidu	60
3.2. Ocena cytotoksyczności <i>in vitro</i> wybranych związków	64
3.2.1. Odczynniki i materiały	65
3.2.2. Hodowla komórek linii SH-SY5Y	65
3.2.3. Ocena cytotoksyczności badanych związków	66
3.3. Walidacja metody analitycznej oraz wyznaczenie parametrów farmakokinetycznych dla chlorowodoru trygoneliny	66
3.3.1. Odczynniki.....	67
3.3.2. Warunki chromatograficzne oraz spektrometria mas.....	67
3.3.3. Przygotowanie roztworów kontrolnych do procesu walidacji	69

3.3.4. Walidacja opracowanej metody analitycznej	69
3.3.5. Wyznaczenie parametrów farmakokinetycznych trygoneliny oraz ocena penetracji do ośrodkowego układu nerwowego	73
4. WYNIKI.....	74
4.1. Dokowanie trygoneliny oraz innych pochodnych alkaloidów pirydynowych do cząsteczki β -amyloidu	74
4.2. Ocena cytotoksyczności wybranych związków	76
4.3. Walidacja metody analitycznej oraz wyznaczenie parametrów farmakokinetycznych dla chlorowodoru trygoneliny	77
5. DYSKUSJA WYNIKÓW I WNIOSKI	84
SPIS TABEL.....	91
SPIS RYSUNKÓW	92
6. PIŚMIENNICTWO.....	93

STRESZCZENIE

Choroba Alzheimera należy do najczęściej występujących zaburzeń pamięci u osób powyżej 65 roku życia. Pomimo licznych badań, dokładna etiologia i patomechanizm tego schorzenia pozostaje nieznany. Obecnie uważa się, że istotną rolę odgrywają dwa białka: β -amyloid oraz białko τ , których patologiczna produkcja i gromadzenie prowadzi do neurodegeneracji, w czym pośredniczą również takie procesy, jak stres oksydacyjny czy neurozapalenie. Do tej pory jedynie pięć leków zostało zarejestrowanych w terapii choroby Alzheimera. Cztery z nich – takryna, donepezyl, rywastygmina oraz galantamina – są inhibitorami acetylocholinesterazy, enzymu rozkładającego jeden z najważniejszych neuroprzekaźników zaangażowanych w powstawanie i utrzymywanie pamięci. Piąty lek, memantyna, będąc antagonistą pobudzającego receptora NMDA, ogranicza ekscytotoksyczność. Żaden z tych leków nie hamuje rozwoju choroby, dlatego wciąż usilnie poszukiwane są nowe substancje, które mogłyby doprowadzić do istotnego postępu w terapii choroby Alzheimera.

Bogatym źródłem potencjalnych leków są rośliny. Wykryte w nich związki mają zdolność wpływania na różne procesy patologiczne związane z chorobą Alzheimera, często wykazując działanie wielokierunkowe. Jedną z takich grup związków są alkaloidy pirydynowe i piperydynowe, do których należą między innymi nikotyna, arekolina czy trygonelina. Opierając się na doniesieniach o negatywnej korelacji pomiędzy paleniem tytoniu a występowaniem schorzeń neurodegeneracyjnych, korzystnym wpływie arekoliny na zdolności poznawcze czy trygoneliny na rozwój tkanki nerwowej, podjęto decyzję o zbadaniu grupy związków o budowie zbliżonej do tego ostatniego alkaloidu pod kątem cech istotnych z punktu widzenia terapii lub prewencji choroby Alzheimera. Wybór trygoneliny i analogów wynikał ze szczególnej struktury czwartorzędowej soli amoniowej (pirydyniowej).

Dla grupy 25 związków charakteryzujących się obecnością N-podstawionego pierścienia pirydynowego wykonano molekularne dokowanie do cząsteczki fragmentu 1-42 β -amyloidu. Miało to na celu sprawdzenie zdolności tych potencjalnych ligandów do lokowania się w rejonie miejsc peptydu odpowiedzialnych za tworzenie struktury β -harmonijki i zainicjowanie agregacji białka do postaci charakteryzujących się wysoką neurotoksycznością.

Zbadana została również cytotoksyczność związków, cechujących się największą interakcją z β -amyloidem. W tym celu wykonano test *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowej ludzkiego nowotworu neuroblastoma SH-SY5Y. Wykazano, że tylko jeden z badanych związków, chlorek 1,1'-(etylenodisulfonylodietyleno)-bis-pirydyniowy, powoduje istotny spadek żywotności komórek w badanym zakresie stężeń. Trygonelina i pozostałe analogi nie wykazały cytotoksyczności *in vitro*.

Dla chlorowodoru trygoneliny opracowano i zwalidowano metodę analityczną pozwalającą na pomiar stężenia w surowicy krwi mysiej. Wykorzystano technikę chromatografii cieczej oddziaływań hydrofilowych (HILIC), dedykowaną małym cząsteczkom o dużej polarności. Detekcja trygoneliny oraz jej deuterowanego odpowiednika, zastosowanego jako wzorzec wewnętrzny, przeprowadzona została przy użyciu spektrometrii mas z elektrorozpylaniem jako źródłem jonów. Opracowana metoda charakteryzuje się liniowością w zakresie stężeń od 5 do 250 ng/ml, niskim limitem detekcji na poziomie 1,5 ng/ml oraz wysoką precyzją i dokładnością. Potwierdzona została stabilność wykorzystywanych roztworów wzorcowych. Analizy wykonane przy pomocy zaproponowanej w pracy doktorskiej metody pozwoliły na wyznaczenie profilu zmian stężenia trygoneliny w surowicy oraz wyliczenie podstawowych parametrów farmakokinetycznych. Przeprowadzone także zostały wstępne oznaczenia stopnia przechodzenia trygoneliny do mózgu myszy.

W efekcie przeprowadzonych badań stwierdzono, że z powodów farmakokinetycznych trygonelina oraz jej pochodne raczej słabo rokują jako struktury wyjściowe dla potencjalnych leków dawkowanych według standardowych schematów terapeutycznych. Powodem jest szybka eliminacja z ustroju i spodziewana w związku z tym krótkotrwałość efektów. Można jednak oczekiwać, że systematyczna podaż trygoneliny w diecie mogłaby mieć znaczenie zapobiegające rozwojowi choroby Alzheimera.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is one of the most common cognitive disorders in people over 65 years old. Despite a lot of studies, the exact etiology and pathomechanism still remain unknown. It is believed that two proteins are especially involved: β -amyloid and tau protein. Their pathological production and accumulation, along with oxidative stress, neuroinflammation and other deleterious processes leads to neurodegeneration. Until now only five medicines were approved in therapy of Alzheimer's disease. Four of them – tacrine, donepezil, rivastigmine and galantamine – are acetylcholinesterase inhibitors, the enzyme that decompose one of the most important neurotransmitter involved in learning and memory. The fifth medicine – memantine – reduces excitotoxicity by NMDA receptor antagonism. Unfortunately, none of these drugs could stop the progression of disease, wherefore new substances able to significant modification of this disorder are investigated.

Plants serve as a rich source of potential medicines. Compounds found in many plants demonstrate the ability to influence variety of pathological processes involved in Alzheimer's disease, often in a multifunctional mode. These groups include pyridine and piperidine alkaloids, represented by nicotine, arecoline or trigonelline. Negative correlations between smoking and prevalence of neurodegenerative diseases, beneficial influence of arecoline on cognition and ability to restore neuronal network by trigonelline were found. Based on this, we decided to study a group of structurally similar compounds for their properties important for the treatment or prevention of Alzheimer's disease. Trigonelline and its analogues were chosen because of their particular structure of quaternary ammonium salt (pyridinium compounds).

For the group of twenty five N-substituted pyridine derivatives molecular docking with β -amyloid 1-42 fragment was performed. Hypothesis on location of these compounds near the site responsible for β -sheet generation and $A\beta_{1-42}$ aggregation was tested.

Cytotoxicity of compounds with the most promising aggregation inhibiting properties was also assessed. In order to do this, *in vitro* test with human neuroblastoma SH-SY5Y cells was performed. It was proved, that only one of compound studied, 1,1'-(ethylenedisulfonyldiethylene)-bis-(pyridinium chloride) induce significant decrease

in cells viability in tested concentration range. Trigonelline and other analogues were no cytotoxic *in vitro*.

For trigonelline hydrochloride analytical method for determination of concentration in mice serum was developed and validated. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) mode was used due to high polarity of trigonelline. For the detection of alkaloid and its deuterated derivative used as an internal standard, tandem mass spectrometry with electrospray ionization was used. Developed method is linear from 5 to 250 ng/ml, is also characterized by low limit of detection (1,5 ng/ml) and high precision and accuracy. Stability of reference solutions used for analysis was also proved. Analytical methods proposed in PhD thesis were succesfully applied for determination of trigonelline concentration in mice serum. Concentration-time profile was plotted and basic pharmacokinetic parameters were calculated. Preliminary determination of brain penetration for trigonelline was also performed.

Results of this study suggest that due to pharmacokinetic properties trigonelline and its derivatives are rather weak candidates for a lead compounds in development of new medicines with standard dosing regimen. This is because of fast elimination from the organism and putative short time of action. However, regular diet intake of trigonelline might be beneficial in prevention of Alzheimer's disease.

WYKAZ SKRÓTÓW

A β ₍₁₋₄₂₎ – amyloid β (fragment 1-42)

ACh – acetylocholina

AChE – acetylocholinesteraza

AD – *Alzheimer's Disease* – choroba Alzheimerera

ADDL – *Amyloid β -Derived Diffusible Ligands* – rozpuszczalne ligandy powstałe z β -amyloidu

AMPA – kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy

APOE – apolipoproteina E

APP – *Amyloid Precursor Protein* – białko prekursorowe amyloidu

BACE1 – β -sekretaza 1

BH₄ – (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopteryna

BuChE – butyrylocholinesteraza

CaM – *Calmodulin* – kalmodulina

CaMKII – *Calmodulin-Dependent Protein Kinase II* – zależna od kalmoduliny kinaza białkowa II

CDK4 – *Cyclin-Dependent Kinase 4* – kinaza zależna od cykliny 4

CDK5 – *Cyclin-Dependent Kinase 5* – kinaza zależna od cykliny 5

CL – klirens

COX – cyklooksygenaza

CV – *Coefficient of Variation* – współczynnik zmienności

D3-TRG – deuterowana trygonelina

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

EMEM – *Eagle's Minimum Essential Medium* – pożywka Eagle'a

EOAD – *Early Onset Alzheimer's Disease* – choroba Alzheimera o wczesnym początku

ESI – *Electrospray Ionisation* – jonizacja za pomocą elektrorozpylania

FAD – *Familial Alzheimer's Disease* – rodzinna postać choroby Alzheimera

FBS – *Fetal Bovine Serum* – płodowa surowica cielęca

FDA – *Food and Drug Administration* – Agencja Żywności i Leków

GC – *Gas Chromatography* – chromatografia gazowa

GSK3 – *Glycogen Synthase Kinase 3* - kinaza syntazy glikogenu 3

Hb – hemoglobina

HBMEC – *Human Brain Microvascular Endothelial Cells* – ludzkie komórki śródbłonna mikrokrążenia mózgowego

HIF-1 α – *Hypoxia Inducible Factor 1 α* – czynnik indukowany hipoksją 1 α

HILIC – *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* – chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych

HMG-CoA – 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzym A

HNE – 4-hydroksynonenal

HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography* – wysokosprawna chromatografia cieczowa

HQC – *High Quality Control* – próbka kontrolna wysokiego stężenia

Hsp – *Heat Shock Protein* – białko szoku termicznego

ICH – *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* - Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi

IEC – *Ion-Exchange Chromatography* – chromatografia jonowymienna

IS – *Internal Standard* – wzorzec wewnętrzny

LDH – *Lactate Dehydrogenase* – dehydrogenaza mleczanowa

LLOQ – *Lower Limit Of Quantification* – dolna granica oznaczalności

LOD – *Limit Of Detection* – granica wykrywalności

LQC – *Low Quality Control* – próbka kontrolna niskiego stężenia

LRP – *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein* – białko związane z receptorem lipoprotein o niskiej gęstości

LTD – *Long-Term Depression* – długotrwałe osłabienie (synaptyczne)

LTP – *Long-Term Potentiation* – długotrwałe wzmocnienie (synaptyczne)

MAPT – *Microtubule Associated Protein Tau* – związane z mikrotubulami białko tau

MARK – *Microtubule-Affinity-Regulating Kinase* – kinaza regulująca powinowactwo do mikrotubul

MCI – *Mild Cognitive Impairment* – umiarkowane zaburzenia poznawcze

ME – *Matrix Effect* – efekt matrycy

MeSH – *Medical Subject Headings* – Słownik Terminów Medycznych

MPTP – *Mitochondrial Permeability Transition Pore* – pory mitochondrialne

MQC – *Medium Quality Control* – próbka kontrolna średniego stężenia

MRM – *Multiple Reaction Monitoring* – tryb monitorowania wielu reakcji

MS – *Mass Spectrometry* – spektrometria mas

MTT – bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu

nAChR – nikotynowy receptor acetylocholinowy

NFT – *Neurofibrillar Tangles* – splątki neurofibrylarne

NGF – *Nerve Growth Factor* – czynnik wzrostu nerwów

NMDA – kwas N-metylo-D-asparaginowy

NO – tlenek azotu

NOS – *Nitric Oxide Synthase* – syntaza tlenku azotu (nNOS – neuronalna, eNOS – endotelialna, iNOS – indukowalna)

NP(C) – *Normal-Phase (Chromatography)* – (chromatografia) w normalnym układzie faz

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PBS – *Phosphate Buffered Saline* – buforowany fosforanem roztwór soli

PE – *Process Efficiency* – efektywność procesu przygotowania próbki

PPAR γ – *Peroxisome Proliferators-Activated Receptors* – receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów

PSEN1(2) – presenilina 1(2)

QSAR – *Quantitative Structure – Activity Relationships* – ilościowe zależności struktura – aktywność

RAGE – *Receptor for Advanced Glycation End Products* – receptory końcowych produktów zaawansowanej glikacji

RE – *Recovery* – odzysk analitu z próbki

ROS – *Reactive Oxygen Species* – reaktywne formy tlenu

RP(C) – *Reversed-Phase (Chromatography)* – (chromatografia) w odwróconym układzie faz

RSD – *Relative Standard Deviation* – względne odchylenie standardowe

S/N – *Signal to Noise ratio* – stosunek sygnału do szumu

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor α* – czynnik martwicy nowotworu α

TRG – trygonelina

V_D – objętość dystrybucji

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

WHO – *World Health Organisation* – Światowa Organizacja Zdrowia

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1.1. Choroba Alzheimera jako przykład schorzenia stanowiącego istotny problem społeczny

Choroba Alzheimera (ang. *Alzheimer disease* – AD) należy do grupy chorób otępiennych, występujących głównie w populacji osób w wieku podeszłym [1]. Szacuje się, że jej rozpowszechnienie sięga 4% wśród osób w wieku 65 lat i wskaźnik ten wzrasta dwukrotnie na każde kolejne pięć lat, osiągając 30% wśród pacjentów powyżej 80 roku życia [2]. Choroba ta najczęściej ma charakter spontaniczny, jednak w ok. 5 – 15% przypadków można mówić o tak zwanej rodzinnej postaci choroby Alzheimera (ang. *Familial Alzheimer's Disease* – FAD) [3]. Obecnie choroba Alzheimera dotyczy około 20 milionów ludzi na całym świecie, których leczenie i opieka generuje koszt rzędu 100 miliardów dolarów rocznie [4].

Czynnikiem mającym istotny wpływ na rozpowszechnienie choroby Alzheimera jest wzrastający średni wiek społeczeństwa, zwłaszcza w krajach rozwiniętych. Na przestrzeni XX wieku zaobserwowano największy wzrost średniej długości życia w dziejach ludzkości – w przeciągu tylko ostatnich pięćdziesięciu lat wydłużyła się ona o około dwie dekady i obecnie wynosi 66 lat [5]. W związku z tym coraz bardziej zwiększa się liczba osób w wieku podeszłym. Obecnie ponad 70 milionów ludzi na świecie przekroczyło 80 rok życia, a do 2050 r. szacuje się jeszcze kilkukrotny wzrost tej liczby.

W Polsce 4,75 miliona mieszkańców, co stanowi 12,4% populacji, osiągnęło już wiek 65 lat. Do 2030 roku liczba ta może wzrosnąć do 8 milionów. Występowanie różnych form otępienia w omawianej grupie wiekowej szacuje się na blisko 10%, co stanowi niemalże 500 tysięcy przypadków. Do roku 2040 w całym rejonie Europy Środkowo-Wschodniej spodziewany jest wzrost liczby osób cierpiących na choroby otępienne z 1,0 do 2,8 miliona lub z 1,8 do 3,2 miliona, odpowiednio dla obszarów o niższej lub wyższej śmiertelności wśród osób starszych. Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organisation* – WHO) podaje, że na całym świecie co roku przybywa 4,5 miliona nowych przypadków otępienia i w 2040 roku liczba pacjentów cierpiących z tego powodu przekroczy 80 milionów [5].

Istotnym problemem, który również będzie się nasilał z upływem lat, są społeczne i ekonomiczne koszty opieki nad osobami cierpiącym na chorobę Alzheimera. W polskich warunkach osoby takie stosunkowo rzadko mają zapewnioną profesjonalną opiekę, najczęściej otoczone są opieką bliskich, którzy nierzadko sami są w co najmniej średnim wieku i mają liczne problemy zdrowotne oraz nie posiadają odpowiednich kwalifikacji do zajmowania się tak wymagającymi chorymi. Sytuacja taka sprawia, że opiekunowie narażeni są na silny stres psychiczny oraz duży wysiłek fizyczny, co może prowadzić do pogorszenia się ich stanu zdrowia i w rezultacie będą oni sami wymagać leczenia lub hospitalizacji [5]. W 2014 roku amerykańskie rodziny i osoby prywatne zajmujące się swoimi bliskimi cierpiącymi z powodu choroby Alzheimera i innych postaci demencji świadczyły około 17,9 miliarda godzin bezpłatnej opieki. Dwie trzecie opiekunów to kobiety, z czego ok. 30% przekroczyło 65 rok życia. Na leczenie własnych problemów zdrowotnych, między innymi depresji spowodowanej nadmiernym stresem, osoby te wydały łącznie 9,7 miliarda dolarów [6]. Duże znaczenie dla państwowych systemów ochrony zdrowia ma również ekonomiczny koszt opieki nad takimi chorymi. Według danych z 1998 roku w Wielkiej Brytanii, gdzie odsetek osób z chorobą Alzheimera objętych profesjonalną opieką sięga 50%, jej koszt stanowi ok. 0,6% produktu krajowego brutto [2]. W 2015 r. amerykańskie społeczeństwo na opiekę nad takimi osobami wydało 226 miliardów dolarów. Biorąc pod uwagę wartość amerykańskiej waluty w roku 2015, w 2050 koszt opieki nad chorymi wyniesie ponad 1,1 trylion dolarów [6].

1.2. Obraz kliniczny i diagnostyka choroby Alzheimera

1.2.1. Obraz kliniczny oraz diagnostyka w oparciu o kryteria kliniczne

Pierwszą osobą, u której zdiagnozowano i opisano objawy choroby Alzheimera była Auguste Deter, pacjentka szpitala dla psychicznie chorych we Frankfurcie nad Menem, gdzie praktykował również dr Alois Alzheimer. Jego praca „*Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*” (pol. „O osobliwej chorobie kory mózgowej”) dokładnie opisuje objawy, jakich doświadczyła pacjentka. Pierwsze niepokojące symptomy przybrały postać nieuzasadnionych napadów zazdrości o męża oraz szybkiej utraty pamięci. We własnym domu czuła się zdezorientowana, przenosiła przedmioty codziennego użytku z miejsca na miejsce lub ukrywała je. Miewała napady paniki

wywołane przeświadczeniem, że ktoś chce ją zabić. W 1901 r., w wieku 51 lat, Auguste trafiła do wspomnianego wyżej szpitala, gdzie obserwowano u niej dezorientację w czasie i przestrzeni, zmienne zachowanie – od uprzejmości po gwałtowny gniew i bezpodstawne oskarżenia. Często wzywała nieobecne osoby, jak swojego męża i córkę, co mogło świadczyć o halucynacjach słuchowych. Podczas testów nie rozpoznawała prostych przedmiotów a jej odpowiedzi nie były adekwatne do zadawanych pytań. Często używała obrazowych wyrażen, które miały zastąpić słowa, których nie pamiętała. Po czterech i pół roku spędzonych w szpitalu, Auguste Deter zmarła w wieku 55 lat [7].

Obecnie przyjmuje się, że pierwsze objawy choroby Alzheimera mogą pojawiać się już ok. 40, najczęściej jednak powyżej 65 roku życia. Wcześniejsze wystąpienie symptomów może świadczyć o rodzinnej postaci choroby Alzheimera, która zostanie szerzej omówiona w rozdziale 1.3.1. Manifestacja choroby rozpoczyna się od utraty pamięci krótkotrwałej przy zachowanych wspomnieniach dotyczących wydarzeń z dalekiej przeszłości. Pojawiają się trudności w uczeniu się nowych rzeczy, zmniejsza się efektywność w pracy, zaczynają się problemy z utrzymaniem płynności codziennych obowiązków. Jest to pierwsze stadium choroby, które utrzymuje się do 5 lat. Wraz z upływem czasu następuje dalsze upośledzenie pamięci, obejmujące również wspomnienia z przeszłości, chory traci zdolność samodzielnego prowadzenia gospodarstwa domowego, a następnie traci kontrolę nad podstawowymi czynnościami i zaczyna wymagać opieki. Często rozwijają się zaburzenia zachowania, urojenia, zachwianie rytmu dobowego – pacjent jest pobudzony w nocy i senny w ciągu dnia. U wielu chorych pojawia się niekontrolowany przymus chodzenia, co w połączeniu z narastającą dezorientacją i zagubieniem nawet w dobrze znanych miejscach, stwarza poważne zagrożenie zaginięciem chorej osoby. Wszystkie te objawy mogą nasilać się przez okres od 2 do 12 lat, po czym choroba wkracza w ostatnie stadium, kończące się zgonem chorego. Pacjent przestaje utrzymywać kontakt z otoczeniem, spada jego aktywność do pełnego unieruchomienia w pozycji leżącej. Śmierć następuje najczęściej na skutek powikłań długotrwałego unieruchomienia [5].

Podstawą do klinicznego rozpoznania choroby Alzheimera jest ustalenie, że zaburzenia pacjenta mają charakter otępienia. Osoba taka musi spełniać następujące kryteria:

- występowanie objawów prowadzi do zaburzenia dotychczasowej codziennej aktywności zawodowej i prywatnej;
- widoczne jest obniżenie poziomu aktywności i funkcjonowania w stosunku do wcześniejszego stanu;
- objawy nie mogą być wytłumaczone przez delirium lub inne zaburzenia psychiatryczne;
- upośledzenie funkcji poznawczych zostaje zauważone przez pacjenta i opiekuna oraz potwierdzone za pomocą odpowiedniego testu oceniającego zdolności poznawcze;
- upośledzenie dotyczy co najmniej dwóch spośród wymienionych obszarów:
 - umiejętność nabywania i zapamiętywania nowych informacji;
 - rozumienie i rozwiązywanie złożonych problemów, ocena sytuacji;
 - orientacja wzrokowo-przestrzenna;
 - funkcje językowe, dotyczące czytania, pisanie i mówienia;
 - zmiany w zachowaniu i osobowości.

Po stwierdzeniu, że dany pacjent spełnia powyższe kryteria, aby mówić o rozpoznaniu choroby Alzheimera, należy potwierdzić również stopniowy początek objawów, rozwijający się w przeciągu miesięcy lub lat. Jednoznacznie należy potwierdzić utratę zdolności poznawczych oraz udowodnić, że ubytki poznawcze wyrażone są w dwóch kategoriach:

- objawy amnestyczne, a więc utrudnione uczenie się nowych rzeczy i zapominanie niedawno nauczonych oraz dodatkowo, co najmniej jedno kolejne zaburzenie z wymienionych powyżej obszarów zdolności poznawczych;
- objawy nieamnestyczne:
 - sprawność językowa – kłopoty w dobieraniu słów;
 - orientacja wzrokowo-przestrzenna – między innymi: upośledzone rozpoznawanie obiektów i twarzy, simultanagnozja (brak zdolności rozpoznania więcej niż jednego obiektu lub elementu obiektu) oraz aleksja (niezdolność rozumienia słowa pisanego lub drukowanego);
 - zaburzenia funkcjonowania, zwłaszcza dotyczące rozwiązywania problemów, osądu i rozumowania.

Dodatkowo, przy rozpoznaniu choroby Alzheimera należy wykluczyć choroby naczyniowe ośrodkowego układu nerwowego oraz inne choroby mózgu, które mogłyby być przyczyną obserwowanych zaburzeń [1, 5, 8].

1.2.2. Biomarkery choroby Alzheimera

Opisane powyżej kliniczne kryteria stanowią dobrą podstawę do diagnostyki choroby Alzheimera. Ich znaczącym ograniczeniem jest wymóg posiadania odpowiedniego doświadczenia przez lekarza, który je przeprowadza. W zrozumiały sposób prowadzi to do konieczności przeprowadzania takiego badania przez specjalistę, co ogranicza szybką i masową wykrywalność choroby na wczesnym etapie rozwoju. Rozpoznanie utrudnia również fakt, że określenie stopnia upośledzenia funkcji poznawczych jest zależne od wyjściowego poziomu tych zdolności [5].

W związku z powyższymi ograniczeniami, prowadzone są intensywne prace nad poszukiwaniem biomarkerów choroby Alzheimera. Według słownika MeSH (ang. *Medical Subject Headings* – Słownik Terminów Medycznych), biomarkery to “mieralne i policzalne parametry biologiczne (np. stężenie określonego enzymu, stężenie określonego hormonu, dystrybucja określonego fenotypu genów w środowisku lub obecność określonych substancji biologicznych), które służą jako wskaźniki w szacunkach dotyczących stanu zdrowia lub parametrów fizjologicznych” [9]. Raport Grupy Roboczej z *The Ronald and Nancy Reagan Research Institute of the Alzheimer’s Association* i *The National Institute of Aging* z 1998 roku określa kryteria, jakie powinien spełnić idealny biomarker choroby Alzheimera. Obejmują one następujące cechy:

- zdolność do wykrycia podstawowych cech neuropatologicznych choroby Alzheimera;
- możliwość walidacji za pomocą przypadków choroby Alzheimera potwierdzonych neuropatologicznie;
- zdolność wykrycia choroby na wczesnym etapie rozwoju i odróżnienie jej od innych postaci demencji;
- niezawodność;
- nieinwazyjność;
- prostota przeprowadzenia testu;
- niska cena.

W czasie tworzenia raportu żaden z istniejących biomarkerów nie spełniał całkowicie powyższych kryteriów [10, 11]. Obecnie stosowane wskaźniki podzielić można na dwie grupy: markery neurochemiczne oraz uzyskane za pomocą diagnostyki obrazowej. Spośród markerów neurochemicznych największe znaczenie mają pomiary poziomu dwóch białek – β -amyloidu oraz białka τ – w płynie mózgowo-rdzeniowym.

β -amyloid jest produktem nieprawidłowego rozkładu proteolitycznego białka prekursorowego (ang. *Amyloid Precursor Protein* – APP), którego nagromadzenie w przestrzeni zewnątrzkomórkowej ośrodkowego układu nerwowego prowadzi do powstania tak zwanych blaszek starczych, będących jednym z charakterystycznych elementów choroby Alzheimera [12]. Szczegółowy opis β -amyloidu oraz jego roli w patofizjologii choroby Alzheimera znajduje się w rozdziale 1.3.2. Pod względem diagnostycznym, największe znaczenie ma oznaczanie stężenia zbudowanego z 42 aminokwasów fragmentu tego białka ($A\beta_{1-42}$) w płynie mózgowo-rdzeniowym. Wykazano, że jest ono odwrotnie proporcjonalne do ilości płytek starczych w mózgu i u pacjentów z potwierdzoną chorobą Alzheimera jest o ok. 50% niższe w stosunku do odpowiadającej pod względem wieku grupy kontrolnej [11].

Oprócz β -amyloidu, kolejnym ważnym białkiem w patofizjologii AD jest białko τ , a szczególnie jego nadmiernie fosforylowana postać. Białko to zostanie szerzej omówione w rozdziale 1.3.3. Do celów diagnostycznych wykorzystuje się pomiar zarówno całkowitego poziomu białka τ w płynie mózgowo-rdzeniowym, jak również tylko formy fosforylowanej. Wykazano, że poziom białka τ jest wyższy o 300% u osób z chorobą Alzheimera w stosunku do odpowiedniej grupy kontrolnej. Poziom całkowitego białka τ pozwala również ocenić ryzyko rozwoju choroby u pacjentów cierpiących na umiarkowane zaburzenia poznawcze (ang. *Mild Cognitive Impairment* – MCI). Pomimo dobrych właściwości prognostycznych (selektywność i specyficzność tego testu osiąga, według różnych doniesień, od 42 do 90%), rutynowe zastosowanie testu ogranicza znaczna inwazyjność, związana z koniecznością wykonania nakłucia lędźwiowego. W związku z tym prowadzone są próby oznaczania $A\beta_{1-42}$ we krwi [11, 13-15].

1.3. Czynniki ryzyka i patofizjologia choroby Alzheimera

1.3.1. Czynniki ryzyka i mutacje genetyczne w chorobie Alzheimera

Choroba Alzheimera najczęściej związana jest ze starzeniem się, więc osoby w podeszłym wieku, powyżej 65 roku życia, są najbardziej narażone na wystąpienie tego schorzenia. Wykazano, że za zwiększone ryzyko odpowiada również niski poziom edukacji oraz aktywności zawodowej. Uważa się, że wynika to z większej rezerwy zdolności poznawczych u osób z dłuższym czasem aktywności intelektualnej, przez co objawy choroby mogą ujawniać się później [16]. Za czynniki ryzyka choroby Alzheimera uznawane są też dolegliwości ze strony układu krążenia, zwłaszcza nadciśnienie tętnicze czy choroby serca [17, 18].

Istotne znaczenie mają czynniki genetyczne. Wykazano, że dziedziczne mutacje genetyczne mogą odpowiadać zarówno za przypadki choroby o wczesnym początku (ang. *Early Onset Alzheimer's Disease* - EOAD), jak i choroby rozwijającej się w starszym wieku. Zidentyfikowanych zostało kilkanaście genów, których mutacje powodują wzrost ryzyka wystąpienia choroby Alzheimera [19].

Wczesny początek choroby związany jest z rodzinną postacią choroby Alzheimera. W postaci tej objawy ujawniają się przed 65 rokiem życia. FAD dotyczy tylko niewielkiego ułamka wszystkich przypadków choroby i w zależności od źródła wynosi od 0,1 do 7% [17, 18]. Za rozwój EOAD odpowiadają między innymi mutacje w genach kodujących białko prekursorowe amyloidu oraz preseniliny (PSEN1, PSEN2), przy czym miejsce i rodzaj mutacji wpływają na czas wystąpienia oraz stopień nasilenia objawów [20].

Wczesna postać choroby Alzheimera najczęściej związana jest z nieprawidłowym powstawaniem i przetwarzaniem białka prekursorowego amyloidu. APP jest białkiem o masie od 110 do 140 kDa. Różnice wynikają zarówno z obecności izoform, z których najważniejsze zbudowane są z 695, 751 lub 770 reszt aminokwasowych, jak również z modyfikacji posttranslacyjnych. APP jest białkiem transbłonowym, którego dłuższy, N-końcowy fragment znajduje się po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Wytwarzane jest ono przez liczne komórki, przy czym największą ilość wykryto w neuronach. Fizjologiczna rola białka prekursorowego amyloidu nie została dokładnie poznana, ale uważa się, że może ono brać udział

w rozwoju synaps, migracji neuronów lub pełnić funkcje receptora [3, 20, 21]. APP podlega enzymatycznemu rozkładowi przez trzy proteazy: α -, β - i γ -sekretazę. Pierwszy z tych enzymów, α -sekretaza, odcina N-końcowy łańcuch w odległości 12 reszt aminokwasowych od granicy błony komórkowej, tworząc rozpuszczalny fragment α -APPs. Pozostały fragment APP trawiony jest przez γ -sekretazę, będącą wewnątrz błonowym kompleksem białek, w skład którego wchodzi między innymi presenilina 1 i 2. Enzym ten przecina łańcuch APP w miejscu 711 lub 713 reszty aminokwasowej, uwalniając fragment p3. Opisana droga przemian białka prekursorowego amyloidu nie prowadzi do powstania fragmentów amyloidu β , ponieważ rozkład łańcucha przy udziale α -sekretazy zachodzi wewnątrz domeny $A\beta$ i powstający fragment p3 składa się z mniejszej liczby aminokwasów. Fragment amyloidogenny powstaje w wyniku aktywności enzymu BACE1, będącego β -sekretażą, przecinającą łańcuch APP w odległości 28 reszt aminokwasowych od domeny przez błonowej, w wyniku czego po działaniu γ -sekretazy powstają odcinki o długości od 40 do 42 aminokwasów [3, 22].

Gen kodujący białko prekursorowe amyloidu znajduje się na 21 chromosomie. Zwiększenie jego ekspresji u osób cierpiących na zespół Downa, charakteryzujący się trisomią chromosomu 21, powoduje nasilone wytwarzanie $A\beta_{1-42}$ oraz bardzo wczesne wystąpienie blaszek amyloidowych [3, 20]. Dodatkowo, zidentyfikowano co najmniej 32 inne, autosomalne dominujące mutacje w obrębie genu kodującego APP, które również prowadzą do rozwoju wczesnej postaci choroby Alzheimera. Mutacje te najczęściej znajdują się w miejscu działania γ -sekretazy, mogą jednak znajdować się również w innych lokalizacjach, jak chociażby podwójna mutacja szwedzka, znajdująca się w kodonie 670/671, a więc w miejscu działania β -sekretazy [22, 23]. Efekty powyższych mutacji zależą od ich umiejscowienia. Mutacja szwedzka, znajdując się w miejscu działania enzymu BACE1, będzie nasilała trawienie APP przez β -sekretazę i zwiększała całkowitą ilość wytwarzanego β -amyloidu. Mutacje w obrębie kodonów 716 i 717 prowadzą z kolei do zwiększonego wytwarzania fragmentu 1-42 lub 1-43 amyloidu [23].

Kolejne mutacje istotne z punktu widzenia choroby Alzheimera o wczesnym początku, to mutacje w obrębie genów kodujących preseniliny – *PSEN1* oraz *PSEN2*. Preseniliny należą do grupy białek błonowych, posiadających osiem lub dziewięć

domen przezbłonowych połączonych hydrofilowymi pętlami. Funkcja tych białek nie została jeszcze w pełni poznana, wiadomo jednak, że stanowią one fragment kompleksu γ -sekreazy, będąc albo istotnym kofaktorem, albo wręcz jego centrum katalitycznym [23, 24]. Mutacje genu *PSENI* występują częściej niż *PSEN2* i ich efektem najczęściej jest zwiększenie stosunku $A\beta_{1-42}$ do fragmentu 1-40. Gen kodujący presenilinę 1 znajduje się na chromosomie 14 i do tej pory wykryto co najmniej 185 mutacji powodujących wczesny rozwój AD. Choroba wywołana przez mutacje genu *PSENI* dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący, jednak objawy choroby nie rozwijają się u wszystkich nosicieli mutacji. Mutacje genu kodującego presenilinę 2, znajdującego się na chromosomie 1, występują rzadziej i prowadzą do rozwoju choroby w późniejszym wieku. Mutacje w obu genach prowadzą do zachwiania stosunku $A\beta_{1-42}$ do $A\beta_{1-40}$ w stronę zwiększania ilości fragmentu 1-42, przy czym nie ma wciąż pewności, czy odbywa się to na skutek nasilenia wytwarzania amyloidu β_{1-42} , czy też osłabienia wytwarzania amyloidu β_{1-40} [20, 23, 24].

Wymienione powyżej mutacje są przykładami zmian genetycznych powodujących wczesny rozwój choroby Alzheimera. Czynniki genetyczne mogą również odpowiadać za wystąpienie „późnej” choroby Alzheimera, w której objawy pojawiają się po 65 roku życia. Pierwszym zidentyfikowanym i najlepiej poznanym genetycznym czynnikiem ryzyka choroby Alzheimera jest allel $\epsilon 4$ genu kodującego apolipoproteinę E (APOE). Jest to glikoproteina zbudowana z 299 aminokwasów o masie ok. 34 kDa, biorąca udział między innymi w usuwaniu z krążenia lipoprotein o bardzo małej gęstości (ang. *Very Low Density Lipoprotein* – VLDL) [20, 25]. Gen *APOE* znajduje się na chromosomie 19 i posiada trzy allele: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ i $\epsilon 4$, które kodują białka różniące się resztą aminokwasową w pozycjach 112 i 158. Jak wspomniano wcześniej, zwiększone ryzyko rozwoju choroby Alzheimera występuje u osób posiadających allel $\epsilon 4$, przy czym wzrost ryzyka jest zależny od odziedziczonego genotypu. Największe prawdopodobieństwo wystąpienia schorzenia dotyczy nosicieli dwóch kopii allelu – $\epsilon 4/\epsilon 4$, następnie pojedynczej kopii: $\epsilon 3/\epsilon 4$ oraz $\epsilon 2/\epsilon 4$. Ryzyko zachorowania wzrasta trzykrotnie w przypadku posiadania jednej kopii allelu $\epsilon 4$. Natomiast homozygoty obciążone są dwunastokrotnie - piętnastokrotnie większym ryzykiem [3, 20]. Przeciwnie do allelu $\epsilon 4$, uważa się że $\epsilon 2$ powoduje spadek ryzyka rozwoju choroby Alzheimera.

1.3.2. Rola amyloidu β w chorobie Alzheimera

Powiązanie β -amyloidu z chorobą Alzheimera nastąpiło w 1984 roku za sprawą odkrycia Glennera i Wonga [26], którzy wykazali, iż płytki starcze zbudowane są z agregatów polipeptydów składających się z 39-42 reszt aminokwasowych. Dalsze badania wykazały, że peptydy te stanowią produkty trawienia enzymatycznego białka prekursorowego amyloidu, które zostało szerzej omówione w rozdziale 1.3.1 [27]. Przy udziale β - i γ -sekreazy powstają fragmenty składające się z różnej liczby aminokwasów, z wyraźną dominacją peptydów o długości 40 ($A\beta_{1-40}$) oraz 42 ($A\beta_{1-42}$) reszt aminokwasowych [2]. β -amyloid jest białkiem amfipatycznym, łączącym w sobie domeny o właściwościach hydrofilowych i hydrofobowych. Powstający z zewnątrzkomórkowego fragmentu APP, N-koniec ma charakter hydrofilowy. Natomiast 12-14 aminokwasów, stanowiących C-koniec, jest silnie hydrofobowe. W warunkach fizjologicznych powstają niewielkie ilości $A\beta_{1-40}$ oraz $A\beta_{1-42}$, przy czym obserwuje się przewagę fragmentów krótszych nad fragmentem 1-42 [28]. Fizjologiczna rola amyloidu β nie została jeszcze w pełni wyjaśniona. Uważa się, że może być on zaangażowany w mechanizmy zapamiętywania i uczenia się [29], pełnić funkcję „zmiatacza” wolnych rodników [30], jak również hamować apoptozę komórek nerwowych [31]. Wydaje się jednak, że wymienione korzystne efekty związane są głównie z niskimi stężeniami (rzędu nanomoli na liter) amyloidu β_{1-40} .

W określonych sytuacjach może dojść do zaburzenia przetwarzania białka APP i zmiany stosunku amyloidu β_{1-40} do β_{1-42} . Związane jest to między innymi z omówionymi w rozdziale 1.3.1 mutacjami genów kodujących enzymy rozkładające białko prekursorowe amyloidu lub mutacjami samego APP [2]. Uważa się, że dla rozwoju choroby Alzheimera największe znaczenie ma $A\beta_{1-42}$, który w warunkach fizjologicznych szybko tworzy agregaty, w skład których wchodzi od dwóch do kilkudziesięciu cząsteczek [32]. Obecnie postuluje się istnienie różnych form $A\beta$ o wyższym stopniu organizacji: od rozpuszczalnych oligomerów, przez protofibryle po fibryle, stanowiące długie, nierozpuszczalne i odporne na proteolizę filamenty, składające się z wielu cząsteczek amyloidu, o średnicy dochodzącej do 10 nm. Struktury te w dużej mierze opisane zostały na podstawie eksperymentów wykorzystujących syntetyczne polipeptydy $A\beta_{1-40}$ oraz $A\beta_{1-42}$. Wymagane więc są dalsze badania, które potwierdzą lub wykluczą obecność form $A\beta$ w ośrodkowym układzie nerwowym pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera [33-35].

W badaniach *in vitro* wykazano różnorodny wpływ poszczególnych struktur na komórki nerwowe, przy czym dominuje obecnie pogląd, iż większą toksycznością charakteryzują się mniejsze, rozpuszczalne oligomery. Fibryle, stanowiące podstawową komponentę amyloidową płytek starczych, w warunkach *in vitro* powstają jedynie w roztworach o dużym, przewyższającym fizjologiczne, stężeniu A β . Wykazują również niższą toksyczność niż mniejsze oligomery. Obserwacje te mogą tłumaczyć fakt, że do tej pory nie wykazano prostej zależności pomiędzy akumulacją β -amyloidu w mózgu a pogarszaniem się zdolności poznawczych pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera, pomimo udowodnionej toksyczności fibrylarnych postaci A β [34, 36, 37].

Jedną z form, których istnienie wykazano w doświadczeniach *in vitro*, są tak zwane rozpuszczalne ligandy pochodzące z β -amyloidu (ang. *Amyloid β -Derived Diffusible Ligands* – ADDL). Tworzą one kuliste struktury o średnicy pomiędzy 4,8 a 5,7 nm, których masa prawdopodobnie mieści się w zakresie od 17 do 42 kDa. Badania przeprowadzone przez zespół Lamberta dowiodły, że struktury te charakteryzują się wysoką neurotoksycznością, którą zachowują nawet w bardzo niskich stężeniach (rzędu 5 nM β -amyloidu). Wykazano również, że hamują one jeden z głównych procesów zaangażowanych w tworzenie pamięci, określane mianem długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (ang. *Long-Term Potentiation* – LTP) [38]. W kolejnych latach potwierdzono ich obecność w mózgach osób dotkniętych chorobą Alzheimera [39].

Oprócz ADDL, za rozpuszczalne oligomery uznawane są także mniejsze struktury o charakterze dimerów oraz trimerów, jak również większe, oznaczane symbolem A β *56, będące najprawdopodobniej dodekamerami o masie 56 kDa. Do grupy tej zaliczane są również pierścieniowe protofibryle, o masie molowej przekraczającej 100 kDa [40]. Badania przeprowadzone przez Shankar i współpracowników [41] dowiodły, że wyizolowane z tkanki mózgowej osób cierpiących na chorobę Alzheimera dimery amyloidu β hamują LTP, jak również nasilają długotrwałe osłabienie synaptyczne (ang. *Long-Term Depression* – LTD), powodują też spadek liczby kolców dendrytycznych. Uważa się, że działanie to wynika z zaburzenia funkcjonowania przekaźnictwa sygnałów w układzie glutaminergicznym. Niewykluczony jest jednak udział innych mechanizmów. A β *56 odkryte zostały w ekstraktach mózgowi myszy Tg2576, które charakteryzują się ekspresją zmutowanego białka APP. Domózgowe podanie oczyszczonych oligomerów A β *56 szczerom

spowodowało przejściowe upośledzenie pamięci długotrwałej, bez wpływu na nabywanie nowych informacji w labiryncie wodnym Morrisa [42].

1.3.3. Hiperfosforylowane białko tau

Białko tau uważane jest za kolejny z głównych czynników odpowiedzialnych za rozwój choroby Alzheimera. W warunkach fizjologicznych jest ono produkowane przez komórki nerwowe, a jego główną rolą jest stabilizowanie mikrotubul, stanowiących element cytoszkieletu neuronu, dzięki czemu możliwe jest zachowanie prawidłowej morfologii komórki i sprawnego transportu organelli komórkowych wzdłuż aksonu. Dzieje się to dzięki obecności domeny wiążącej tubulinę, białka będącego podstawowym budulcem mikrotubul. Dotychczas odkryto sześć izoform białka τ , różniących się nieznacznie budową chemiczną i ilością miejsc wiążących tubulinę. Wszystkie izoformy stanowią produkt jednego genu i powstają w wyniku alternatywnego składowania egzonów. Zdolność białka tau do wiązania się z tubuliną regulowana jest poprzez fosforylację. Uważa się jednak, że inne procesy, jak glikozylacja czy glikacja, również mogą mieć znaczenie. Aktywność kinaz i fosfataz, prowadząca odpowiednio do fosforylacji i defosforylacji białka τ , reguluje dynamiczną równowagę pomiędzy wolnym białkiem tau a związanym z mikrotubulą [43].

W momencie zachwiania równowagi pomiędzy procesami fosforylacji i defosforylacji białka tau dochodzi do upośledzenia wiązania się tego białka z mikrotubulami i gromadzenia w postaci splotów w przestrzeni wewnątrzkomórkowej. Uważa się, że jedną z przyczyn mogą być mutacje genu *MAPT* (ang. *Microtubule Associated Protein Tau* – związane z mikrotubulami białko tau), kodującego białko τ . W wyniku takich mutacji białko tau może stać się podatne na gromadzenie w postaci filamentów i dalszą fibrylizację, może zostać zwiększona jego fosforylacja lub zmniejszona defosforylacja, jak również może dojść do upośledzenia zdolności do wiązania się z mikrotubulami. Kolejną przyczynę może stanowić upośledzona aktywność kinaz lub fosfataz biorących udział w fosforylacji i defosforylacji białka tau. Najprawdopodobniej największe znaczenie mają trzy enzymy: GSK3 (ang. *Glycogen Synthase Kinase 3* – kinaza syntazy glikogenu 3), CDK5 (ang. *Cyclin-Dependent Kinase 5* – kinaza zależna od cykliny 5) oraz MARK (ang. *Microtubule-Affinity-Regulating Kinase* – kinaza regulująca powinowactwo do mikrotubul). Na zaburzenie integracji białka tau i mikrotubul wpływ może mieć również toksyczność

wywołana amyloidem β , stres oksydacyjny lub stany zapalne w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Znaczenie tych czynników jest jednak prawdopodobnie mniejsze, niż mutacji genetycznych czy nieprawidłowej aktywności enzymów [43].

W wyniku opisanych powyżej zaburzeń dochodzi do nadmiernej fosforylacji (hiperfosforylacji) białka tau i upośledzenia jego wiązania się z mikrotubulami. W rezultacie, utracona zostaje stabilność cytoszkieletu, dochodzi do uszkodzenia struktury neuronu, zaburzeń transportu wewnątrzkomórkowego oraz przekazywania sygnałów i śmierci komórki. Hiperfosforylowane białko tau, na skutek zmian konformacyjnych, tworzy początkowo struktury przypominające nici, łączące się w większe sploty. Struktury te, obok nici neuropilowych i zdegenerowanych neurytów wchodzi w skład splotków neurofibrilarnych (ang. *Neurofibrillar Tangles* – NFT), będących jednym z charakterystycznych elementów znajdujących w mózgu osób chorych na chorobę Alzheimera [43, 44].

1.3.4. Wybrane teorie tłumaczące rozwój choroby Alzheimera

Choroba Alzheimera jest skomplikowanym procesem z wciąż nieustalonym początkiem. Liczne próby znalezienia pierwotnej przyczyny powstawania zmian w ośrodkowym układzie nerwowym i postępującego upośledzenia funkcji poznawczych nie doprowadziły do opracowania spójnej teorii tłumaczącej przebieg tego schorzenia. Poniżej przedstawione zostaną niektóre mechanizmy, które mogą odgrywać istotną rolę w patofizjologii choroby Alzheimera.

Rzeczony rozwój objawów AD wiąże się z postępującą degeneracją neuronów w obszarach mózgu odpowiedzialnych za funkcje poznawcze, takich jak kora mózgowa, hipokamp czy ciało migdałowate. Jedną z przyczyn uszkodzenia komórek nerwowych może być rozwijający się w obrębie ośrodkowego układu nerwowego stan zapalny. Uważa się, że odkładający się w postaci blaszek starczych β -amyloid oraz białko τ mogą prowadzić do aktywacji komórek mikrogleju, astrocytów, makrofagów i limfocytów. Aktywacja mikrogleju przez β -amyloid odbywa się najprawdopodobniej poprzez interakcję z receptorami RAGE (ang. *Receptor for Advanced Glycation End Products* – receptory końcowych produktów zaawansowanej glikacji). Skutkiem pobudzenia wspomnianych komórek jest zwiększone wytwarzanie mediatorów stanu zapalnego, między innymi prostaglandyn, interleukin, czynnika martwicy nowotworu α (ang. *Tumor Necrosis Factor α* - TNF- α), reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive*

Oxygen Species – ROS) oraz tlenku azotu (NO). Mediatory te powodują mobilizację monocytów i limfocytów przez barierę krew-mózg, a także dalszą indukcję i proliferację komórek mikrogleju. Ciągła aktywacja mikrogleju powoduje powstanie przewlekłego stanu zapalnego i w rezultacie uszkodzenie komórek nerwowych [45].

Równorzędnie ze stanem zapalnym, kolejnym czynnikiem uszkadzającym komórki nerwowe jest nasilający się stres oksydacyjny. β -amyloid może zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio, poprzez między innymi indukcję syntazy tlenku azotu (ang. *Nitric Oxide Synthase* – NOS), prowadzić do generacji wolnych rodników uszkadzających komórki nerwowe. W tkankach poddanych wpływowi β -amyloidu obserwuje się nasilone utlenianie białek oraz DNA. W procesach tych pośredniczą między innymi 4-hydroksynonenal (HNE) oraz akroleina (prop-2-enal), będące produktami peroksydacji lipidów – procesu, który również ulega intensyfikacji pod wpływem $A\beta$ [46].

Jednym z elementów stresu oksydacyjnego, odpowiedzialnego za degenerację neuronów, jest tak zwany „stres nitroksydacyjny”, czyli uszkodzenie komórek na skutek obecności związków oraz wolnych rodników zawierających azot. Powiązane jest to z nieprawidłową lub nadmiernie nasiloną aktywnością syntazy tlenku azotu. Enzym ten występuje w trzech izoformach, będących produktami ekspresji trzech różnych genów: neuronalnej (nNOS), endotelialnej (eNOS) oraz indukowalnej (iNOS), różniących się między innymi lokalizacją tkankową oraz sposobem ekspresji. Dla prawidłowego funkcjonowania enzymu konieczna jest obecność kofaktorów: (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopteryny (BH_4), dinukleotydu flawinoadeninowego, mononukleotydu flawinowego oraz hemu. Aktywność konstytutywnych form syntazy tlenku azotu (cNOS oraz nNOS) regulowana jest poprzez wiążące jony Ca^{2+} białko kalmodulinę (ang. *Calmodulin* – CaM). W warunkach fizjologicznych enzymy te wytwarzają tlenek azotu z tlenu cząsteczkowego oraz L-argininy [47].

W warunkach niedoboru L-argininy lub jednego z kofaktorów enzymu, NOS może okresowo wytwarzać jon O_2^- . Jon ten reaguje z cząsteczką NO, tworząc anion nadtlenoazotynowy ($ONOO^-$), którego produkty rozpadu stanowią wolne rodniki - NO_2 oraz $OH\cdot$. Rodniki te posiadają bardzo silne właściwości utleniające, przez co mogą prowadzić do uszkodzenia organelli i w rezultacie śmierci całej komórki. Wykazano, że β -amyloid stymuluje ekspresję iNOS w astrocytach i komórkach mikrogleju, co

gwałtownie zwiększa ilość wytwarzanego tlenu azotu, który w opisanej powyżej reakcji może tworzyć neurotoksyczny jon ONOO^- . Amyloid β zwiększa też poziom wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , co poprzez aktywację CaM może stymulować konstytutywne formy syntazy tlenu azotu [48-50].

Zaburzenia poziomu wapnia w neuronach, oprócz aktywacji NOS, mogą również za pośrednictwem innych mechanizmów prowadzić do neurodegeneracji. Wykazano, że w komórkach, w których dochodzi do ekspresji zmutowanego genu *PSEN1*, nasilone zostają procesy apoptozy powiązane ze wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} w sposób niezależny od obecności β -amyloidu, poprzez zwiększenie uwalniania wapnia z siateczki endoplazmatycznej [51, 52]. Zwiększenie wewnątrzkomórkowej puli wapnia może również prowadzić do nasilonego wychwytu Ca^{2+} przez mitochondria. Sytuacja taka prowadzi do aktywacji procesu apoptozy mitochondriów i w rezultacie śmierci neuronu [51]. Jony Ca^{2+} odgrywają również istotną rolę w procesach fosforylacji i defosforylacji białka τ , które zostały opisane w rozdziale 1.3.3. Niektóre z enzymów biorących udział we wspomnianych procesach zależne są od obecności wapnia, jak na przykład CaMKII (ang. *Calmodulin-Dependent Protein Kinase II* – zależna od kalmoduliny kinaza białkowa II) czy kalcyneuryna (zależna od kalmoduliny fosfataza białkowa). Zachwianie homeostazy wapnia może prowadzić do zaburzeń aktywności wspomnianych enzymów, co z kolei prowadzi może do nadmiernej fosforylacji białka τ [51].

Obok prób wyjaśnienia mechanizmów postępującej neurodegeneracji, prowadzone są również badania, których celem jest wykrycie procesu, odpowiadającego za rozpoczęcie choroby. O ile w przypadku rodzinnej postaci choroby Alzheimera można mówić o pewnym sukcesie w postaci identyfikacji mutacji genetycznych prowadzących do nadmiernej produkcji β -amyloidu, o tyle sporadyczne przypadki tego schorzenia wciąż nie zostały w pełni wyjaśnione. Uważa się, że istotną rolę mogą odgrywać schorzenia układu krążenia, w szczególności mózgowych naczyń krwionośnych [53, 54]. Choroby, takie jak miażdżyca, mogą prowadzić do zmniejszenia ukrwienia mózgu i w rezultacie hipoksji oraz niedostatecznego dopływu substancji odżywczych. Inne schorzenia, jak nadciśnienie tętnicze, mogą zwiększać ryzyko udaru krwotocznego. Dodatkowo, uszkodzenie lub częściowe upośledzenie funkcji bariery krew-mózg sprawia, że do tkanki mózgowej mogą trafić liczne białka krwi, w tym hemoglobina (Hb), dla której wykazano działanie neurotoksyczne [55]. Obecność

hemoglobiny w tkance mózgu może również stymulować produkcję β -amyloidu, który wiążąc się z Hb ogranicza jej toksyczność. W warunkach fizjologicznych, A β może więc pełnić rolę środka uszczelniającego naczyń krwionośnych i zabezpieczającego komórki nerwowe przed szkodliwym wpływem hemoglobiny. W sytuacji nasilonego dopływu Hb do tkanki mózgowej, może dojść do nadmiernego wytwarzania amyloidu β i początku formowania się blaszki starczej. Potwierdzeniem tej teorii może być wykrycie hemoglobiny w złogach amyloidowych, wyizolowanych z mózgow pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera [56]. Teorii naczyniowego początku choroby Alzheimera sprzyjają również wyniki innych badań, które wiążą między innymi miażdżycę tętnic w obrębie koła tętniczego Willisa z rozwojem AD [57]. Liczne zmiany w mikrokrażeniu mózgowym, jak atrofia naczyń kapilarnych, zwiększona ilość pęcherzyków pinocytarnych w komórkach śródbłonna czy uszkodzenia błony podstawnej naczyń krwionośnych, znajdowane są w mózgach osób chorych na chorobę Alzheimera [58]. Obserwuje się również podniesiony poziom czynników proangiogennych, jak trombina, VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor* – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego), angiopoetyna 2, integryny oraz HIF-1 α (ang. *Hypoxia Inducible Factor 1 α* – czynnik indukowany hipoksją 1 α), przy czym nie towarzyszy temu istotny przyrost liczby naczyń krwionośnych, a wręcz proces ten jest upośledzony. Wynikać to może z antyangiogennych właściwości β -amyloidu. W warunkach *in vitro* wykazano, że wokół komórek HBMEC (ang. *Human Brain Microvascular Endothelial Cells* – ludzkie komórki śródbłonna mikrokrażenia mózgowego) występuje nasilone powstawanie rozpuszczalnych oligomerów β -amyloidu. Łącząc ze sobą antyangiogenne właściwości A β z aktywacją śródbłonna Grammas i wsp. opracowali teorię, według której w przebiegu choroby Alzheimera dochodzi do nadmiernej i ciągłej produkcji cytokin proangiogennych, co może prowadzić do uszkodzenia neuronów i postępującej neurodegeneracji [58-60].

Kolejną próbą wytłumaczenia etiologii i rozwoju choroby Alzheimera jest teoria „dwóch uderzeń” (ang. „*Two-hit Hypothesis*”), zakładająca, iż konieczne jest wystąpienie dwóch zdarzeń, które w rezultacie doprowadzą do postępującego uszkodzenia neuronów. Według niektórych autorów takim pierwszym czynnikiem wyzwalającym AD jest stres oksydacyjny lub zaburzenia cyklu komórkowego. Wykazano, że neurony w trakcie choroby Alzheimera wykazują fenotyp typowy dla komórek w aktywnym cyklu komórkowym, co – jak uważano wcześniej – jest

niemożliwe w przypadku komórek nerwowych. Wykryto obecność licznych markerów cyklu komórkowego, takich jak cykliny, CDK4 (ang. *Cyclin-Dependent Kinase 4* – zależna od cykliny kinaza 4) oraz p16 (zależny od cykliny inhibitor kinaz 2A) [61, 62]. Pomimo tego, nie wykryto komórek, u których doszło do podziału, co może świadczyć o poważnym zaburzeniu cyklu komórkowego w neuronach.

W myśl teorii „dwóch uderzeń”, zarówno opisane zaburzenia cyklu komórkowego, jak i stres oksydacyjny mogą niezależnie od siebie stać się pierwotną przyczyną choroby Alzheimera. Sprawne mechanizmy kompensacyjne sprawiają, że komórka może przejść w swego rodzaju „stan stacjonarny”, w którym będzie mogła funkcjonować przez dłuższy czas pomimo wstępnego uszkodzenia. Znaczne zaangażowanie tych mechanizmów sprawia jednak, że komórka staje się bardziej podatna na kolejne uszkadzające bodźce, które jako „drugie uderzenie”, mogą doprowadzić do zapoczątkowania neurodegeneracji [63].

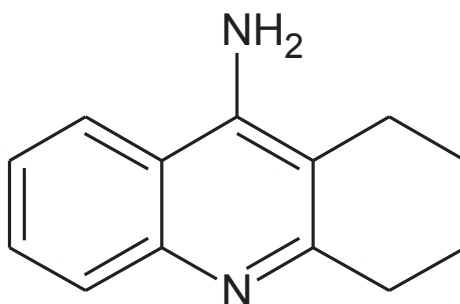
1.4. Farmakoterapia choroby Alzheimera

1.4.1. Obecnie stosowane leki spowalniające rozwój choroby Alzheimera

Dostępne obecnie leki nie pozwalają na zatrzymanie postępu ani odwrócenie zmian powstałych w mózgu w trakcie choroby. Wprowadzenie farmakoterapii ma na celu zmniejszenie i złagodzenie objawów neurologicznych, jak również poprawę ogólnego stanu pacjenta. Leczenie takie może prowadzić zarówno do przedłużenia okresu względnie samodzielnego funkcjonowania pacjenta, jak również poprawić komfort jego życia. Oprócz leków wpływających na pamięć i funkcje poznawcze, które zostaną szczegółowo omówione poniżej, w ramach terapii wspomagającej stosowane są również inne leki, których głównym zadaniem jest opanowanie problemów psychicznych i behawioralnych towarzyszących rozwijającej się chorobie Alzheimera. U chorych często obserwuje się zaburzenia psychiatryczne, emocjonalne, problemy ze snem, problemy z osobowością czy nadmiernym pobudzeniem i agresją [64]. W celu opanowania objawów psychiatrycznych stosuje się najczęściej leki z grupy neuroleptyków o niewielkim działaniu antycholinergicznym, jak haloperidol, perazyna czy promazyna. Skuteczne mogą być również nowsze, „atypowe” leki neuroleptyczne, jak risperidon, olanzapina czy kłozapina. Zaburzenia nastroju u osób cierpiących na

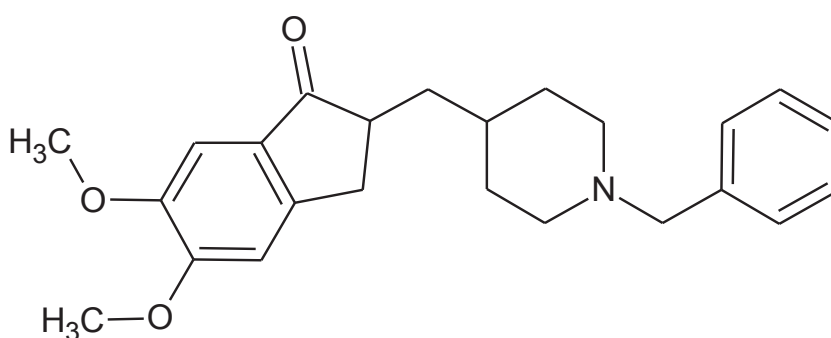
chorobę Alzheimera powinno leczyć się nowymi lekami przeciwdepresyjnymi, takimi jak fluwoksamina, citalopram, moklobemid czy mianseryna, które również będą wywierały mniejszy wpływ na układ cholinergiczny. Oprócz tego, w zaburzeniach zachowania zaleca się stosowanie hydroksyzyny, karbamazepiny czy pochodnych kwasu walproinowego. Jeśli u pacjenta występują zaburzenia snu, lekarz może rozważyć ich leczenie za pomocą takich leków, jak estazolam, zopiklon czy zolpidem [65].

Leczenie zaburzeń poznawczych w przebiegu choroby Alzheimera opiera się na wzmacnianiu przekaźnictwa cholinergicznego w ośrodkowym układzie nerwowym. Pierwsze próby obejmowały stosowanie substancji zwiększających poziom acetylocholino (ACh), takich jak chlorek choliny i fosfatydylocholina. Nie wykazano jednak istotnej skuteczności tych leków. Kolejną próbą było zastosowanie inhibitorów enzymów rozkładających ACh. W organizmie człowieka występują dwa takie enzymy: zlokalizowana w ośrodkowym układzie nerwowym oraz połączeniach nerwowo-mięśniowych acetylocholinesteraza (AChE) oraz występująca w osoczu butyrylocholinesteraza (BuChE). W terapii choroby Alzheimera największe znaczenie ma AChE. Hamowanie enzymu osocznego jest odpowiedzialne za obwodowe działania niepożądane stosowanych leków. Historycznie pierwszym zarejestrowanym lekiem w terapii AD była takryna (rys. 1), pochodna akrydyny – (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakrydyna). W badaniach klinicznych dowiedziono jej skuteczności w leczeniu łagodnej i umiarkowanej postaci choroby Alzheimera, jakkolwiek nie była ona wysoka. Stosowanie takryny wiązało się również z nasilonymi działaniami niepożądanymi, takimi jak nudności, wymioty, biegunka, utrata apetytu, oraz wzrostem poziomu aminotransferaz w surowicy, co z kolei świadczy o działaniu hepatotoksycznym. Obecnie nie jest stosowana [66-68].



Rysunek 1. Struktura chemiczna takryny.

W 1996 roku amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration* – FDA) dopuściła do obrotu kolejny inhibitor acetylocholinesterazy – donepezyl (rys. 2). Lek ten strukturalnie różni się od takryny i jest pochodną piperydyny – ((*R,S*)-2-[(1-benzylpiperidyn-4-yl)metylo]-5,6-dimetoksy-2,3-dihydroinden-1-on). Lek charakteryzuje się dużą wybiórczością w stosunku do AChE, przy bardzo małym hamowaniu aktywności osoczowej BuChE. W badaniach klinicznych I i II fazy nie wykazano istotnej hepatotoksyczności tego związku. Donepezyl ma również dłuższy czas działania (biologiczny okres półtrwania wynosi około 70 godzin), w związku z czym stosowany jest w jednorazowej dawce dobowej wynoszącej 5 lub 10 mg. Lek wchłania się z przewodu pokarmowego i osiąga maksymalne stężenie we krwi po około 3 - 4 godzinach. W 95% wiąże się z białkami osocza. Wydalany jest zarówno w postaci niezmienionej z moczem, jak również ulega biotransformacji w wątrobie przy udziale izoenzymów CYP3A4 oraz CYP2D6 z rodziny cytochromu P450, co zwiększa ryzyko interakcji z innymi lekami metabolizowanymi za pośrednictwem tego enzymu. Inhibitory wspomnianych izoenzymów, jak ketokonazol, erytromycyna czy fluoksetyna, mogą zwiększać stężenie donepezylu w osoczu, natomiast induktory enzymatyczne, do których należy między innymi fenytoina, karbamazepina oraz alkohol, mogą prowadzić do zmniejszenia stężenia leku w osoczu. Ograniczeniem skuteczności donepezylu jest tolerancja, która rozwija się w ciągu roku podawania leku i związana jest z wykształceniem mechanizmów adaptacyjnych przez organizm pacjenta [69-72].

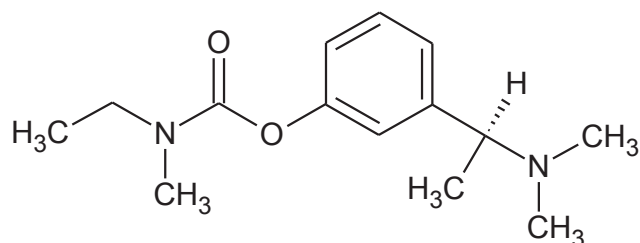


Rysunek 2. Struktura chemiczna donepezylu.

Cząsteczka donepezylu opracowana została na podstawie badań z wykorzystaniem techniki QSAR (ang. *quantitative structure – activity relationships* – ilościowe zależności struktura – aktywność). Opierając się na bazowym związku

chemicznym, którym była pochodna benzylopiperazyny, przeprowadzono optymalizację rodzaju podstawników oraz ich konfiguracji. Donepezyl, początkowo obdarzony symbolem E2020, był jednym z badanych związków. Badania aktywności nowej cząsteczki wykazały, iż wartość IC_{50} dla acetylocholinesterazy wynosi 5,7 nM, natomiast dla butyrylocholinesterazy około 7000 nM, co świadczy o bardzo dużej selektywności w stosunku do AChE [69, 73].

Kolejnym lekiem zwiększającym przeżywalność cholinergiczną jest rywastygmina (rys. 3). Jest to lek z grupy karbaminianów, N-etylo-N-metylokarbaminian (S)-3-(1-(dimetylo-amino)etylo)fenylu. W przeciwieństwie do donepezylu, nie jest ona wybiórczym inhibitorem AChE i posiada również zdolność hamowania butyrylocholinesterazy w ośrodkowym układzie nerwowym. Ze względu na krótszy niż donepezyl biologiczny okres półtrwania w osoczu – 1,5 godziny – stosowana jest dwa razy na dobę. Podczas leczenia zaleca się stopniowe zwiększanie dawki w zakresie od 3 do 12 mg na dobę, do osiągnięcia maksymalnej dawki tolerowanej. Do najczęściej występujących działań niepożądanych należą zaburzenia żołądkowo-jelitowe, które często ustępują po okresowym zmniejszeniu dawki. Podczas badań klinicznych nie wykryto żadnych poważnych efektów ubocznych, stwarzających zagrożenie dla pacjenta. Lek ten tylko w niewielkim stopniu metabolizowany jest w wątrobie, co istotnie zmniejsza jego potencjał wchodzenia w interakcje z innymi lekami. Za biotransformację rywastygminy odpowiada przede wszystkim cholinesteraza, a główny dekarbamylowany metabolit wykazuje tylko nieznaczną aktywność biologiczną i niemal całkowicie wydalany jest z moczem w ciągu 24 godzin od podania leku [74-76].

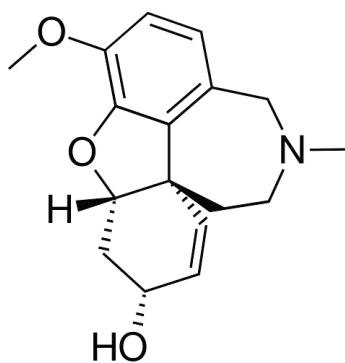


Rysunek 3. Struktura chemiczna rywastygminy.

Rywastygmina jest pierwszym lekiem stosowanym w chorobie Alzheimera, który może być podawany za pomocą systemu transdermalnego. Powolne i jednostajne

uwalnianie substancji leczniczej sprawia, że różnice pomiędzy stężeniem maksymalnym i minimalnym w surowicy są mniejsze niż w przypadku stosowania postaci doustnych. Odpowiada to również za mniejsze nasilenie działań niepożądanych [77, 78].

Galantamina (rys. 4), kolejny z zarejestrowanych leków w terapii choroby Alzheimera, wywodzi się z tradycyjnego stosowania roślin z rodziny amarylkowatych (*Amaryllidaceae*), w szczególności z rodzaju *Galanthus spp.*, *Narcissus spp.* oraz *Leucoium spp.*, w rejonie południowo-wschodniej Europy i gór Kaukazu. Pierwsze prace dowodzące hamowania AChE przez galantaminę prowadzili rosyjscy uczeni, Mashkovsky i Kruglikova-Lvova we wczesnych latach pięćdziesiątych XX wieku. Po raz pierwszy wyizolowano ją z gatunku *Galanthus woronowii* w 1952 roku. W późnych latach pięćdziesiątych w Bułgarii pojawił się pierwszy lek zawierający galantaminę, sprzedawany pod nazwą handlową Nivalin. W latach tysiąc dziewięćset osiemdziesiątych rozpoczęły się badania nad zastosowaniem galantaminy w terapii choroby Alzheimera. W 2000 roku Islandia, Irlandia, Szwecja i Wielka Brytania, jako pierwsze kraje zachodnie, zezwoliły na stosowanie tego leku w otępieniu typu alzheimerowskiego [79].



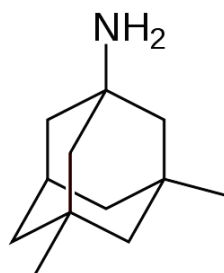
Rysunek 4. Struktura chemiczna galantaminy.

Pod względem chemicznym galantamina jest alkaloidem izochinolinowym i jest odwracalnym, kompetycyjnym inhibitorem acetylocholinesterazy oraz allosterycznym aktywatorem receptora nikotynowego (nAChR). Wiążąc się z podjednostką α receptora w innym miejscu niż ACh, nasila efekt jednocześnie związanej acetylocholino, najprawdopodobniej poprzez wpływ na otwieranie się kanału jonowego receptora. Taki mechanizm działania nie prowadzi do desensytyzacji receptora, dzięki czemu na działanie galantaminy nie rozwija się tolerancja. W przypadku presynaptycznych

receptorów nikotynowych, ich uwrażliwienie może prowadzić również do zwiększenia uwalniania ACh z zakończeń nerwowych. Galantamina stosowana w dawce dobowej 16 lub 24 mg spowalnia upośledzenie procesów poznawczych w łagodnej lub umiarkowanej postaci choroby Alzheimera. Nasilenie i rodzaj działań niepożądanych nie odbiega od tych, które można zaobserwować po stosowaniu donepezylu lub rywastygminy. Po podaniu doustnym szybko (około 15 minut) i w dużym stopniu (biodostępność bezwzględna około 88,5%) wchłania się do krwiobiegu. W około 18% wiąże się z białkami osocza. Wydalana jest głównie w postaci zmetabolizowanej. Biotransformacja odbywa się za pośrednictwem izoenzymów CYP2D6 i CYP3A4 cytochromu P450. Podobnie jak w przypadku donepezylu, może mieć to wpływ na wystąpienie potencjalnych interakcji ze stosowanymi równolegle lekami. Eliminacja galantaminy następuje zgodnie z modelem dwukompartamentowym i końcowy okres półtrwania wynosi od 8 do 10 godzin. Lek ten powinien być stosowany w dwóch dawkach podzielonych w przypadku tabletek o natychmiastowym uwalnianiu. Stosowanie dostępnych preparatów o przedłużonym uwalnianiu pozwala na podawanie leku raz na dobę, co zwiększa komfort zarówno osoby chorej, jak i opiekuna [79-82].

Najnowszym lekiem stosowanym w leczeniu choroby Alzheimera jest memantyna (rys. 5). Lek ten różni się od poprzednich mechanizmem działania – jest antagonistą receptora glutaminowego NMDA. Podstawową koncepcją, która doprowadziła do wprowadzenia tego leku w terapii AD jest założenie, że nadmierna aktywacja receptorów dla pobudzającego kwasu glutaminowego może prowadzić do degeneracji i śmierci neuronów (ekscytotoksyczność). W warunkach fizjologicznych, glutaminian, uwolniony z zakończeń presynaptycznych, powoduje pobudzenie zarówno receptorów NMDA, jak i zlokalizowanych na tym samym zakończeniu postsynaptycznym receptorów AMPA, które są bramkowanymi ligandem kanałami dla jonów jednowartościowych, przede wszystkim Na^+ i K^+ . Aktywacja tych receptorów przez glutaminian powoduje zwiększony napływ jonów sodowych do wnętrza komórki i w rezultacie częściową depolaryzację błony komórkowej. W wyniku zmiany potencjału, otwiera się kanał jonowy receptora NMDA, blokowany dotychczas przez jon Mg^{2+} i umożliwiony zostaje napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki. Jony wapniowe biorą udział w licznych procesach enzymatycznych, zaangażowanych w procesy pamięciowe. W chorobie Alzheimera proces ten jest zaburzony przez nadmierną i ciągłą stymulację zakończeń postsynaptycznych przez glutaminian.

Powstały w rezultacie „szum” jest na tyle silny, że komórka nie jest w stanie zareagować na rzeczywisty sygnał. Dochodzi do upośledzenia procesu powstawania pamięci i, w dłuższej perspektywie czasu, do degeneracji neuronu. Memantyna, odwracalnie blokując kanał receptora NMDA, zmniejsza wrażliwość komórki na „szum” i umożliwia prawidłowe przekazywanie sygnału [83].



Rysunek 5. Struktura chemiczna memantyny.

Chemicznie, memantyna (3,5-dimetyloadamantano-1-amina) jest pochodną adamantanu. Jako jedyny z dostępnych leków, wskazana jest w terapii umiarkowanej i ciężkiej postaci choroby Alzheimera. Lek ten, oprócz łagodzenia objawów, może również wykazywać pewne działanie neuroprotektcyjne. Nie wykazano natomiast skuteczności memantyny w okresie łagodnego nasilenia objawów choroby. Lek praktycznie całkowicie wchłania się z przewodu pokarmowego i maksymalne stężenie w surowicy osiąga po 3 do 8 godzinach. W stosunkowo niewielkim stopniu podlega biotransformacji (jedynie około 20% podanej dawki). Nie stwierdzono udziału cytochromu P450 w tym procesie. Metabolity memantyny nie wykazują zdolności do blokowania receptorów NMDA. Wydalanie zachodzi przede wszystkim przez nerki. Biologiczny okres półtrwania wynosi od 60 do 100 godzin, w związku z czym lek ten podawany może być raz na dobę. Podobnie jak w przypadku pozostałych leków, stosuje się stopniowe zwiększanie dawki w zakresie od 5 do 20 mg na dobę, przy czym ta ostatnia jest dawką podtrzymującą. Działania niepożądane są słabo zaznaczone i z reguły nie powinny prowadzić do przerwania leczenia [83-85].

1.4.2. Eksperymentalne strategie leczenia choroby Alzheimera

Jak wykazano w poprzednim rozdziale, istniejące terapie choroby Alzheimera nie powstrzymują rozwoju choroby. W związku z tym istnieje silna potrzeba poszukiwania nowych leków, które umożliwią zahamowanie lub odwrócenie zmian

neurodegeneracyjnych. Poniżej przedstawione zostały najważniejsze eksperymentalne strategie leczenia choroby Alzheimera wraz z przykładami badanych substancji.

Najważniejszym punktem uchwytu dla proponowanych terapii pozostaje β -amyloid, jego powstawanie oraz usuwanie z ośrodkowego układu nerwowego. Jedną ze starszych koncepcji wywodzi się z odkrycia, że metale, takie jak żelazo i miedź, uczestniczą w procesie agregacji β -amyloidu. Próba przeciwdziałania temu było zastosowanie związków chelatujących, wiążących jony metali. W badaniach stosowano między innymi kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA), deferoksaminy czy kliochole. Zastosowanie tych preparatów w terapii choroby Alzheimera ograniczone jest jednak brakiem penetracji bariery krew-mózg. Nowsze badania wskazują na możliwość zastosowania połączeń z nanocząstkami, co miałyby umożliwić transport leku do ośrodkowego układu nerwowego [86].

Kolejna strategia wiąże się z odkryciem, iż w powstawaniu $A\beta_{1-42}$ biorą udział proteazy aspartylowe: β - i γ -sekretaza. Z założenia, zahamowanie aktywności tych enzymów powinno doprowadzić do zmniejszenia stężenia fragmentu 1-42 amyloidu. Niestety, γ -sekretaza, oprócz udziału w przetwarzaniu APP, bierze również udział w międzykomórkowym przekazywaniu sygnału za pośrednictwem receptorów *Notch*. Zahamowanie jej aktywności prowadzi do wystąpienia poważnych efektów ubocznych, między innymi ze strony przewodu pokarmowego oraz śledziony. Prowadzone były badania nad lekami, które mogłyby modulować aktywność γ -sekretazy bez wywoływania objawów toksyczności. Przykładem takiego leku był (R)-flurbiprofen, który jednak nie przeszedł badań klinicznych ze względu na niski potencjał leczniczy oraz niezadowalającą penetrację do ośrodkowego układu nerwowego [87, 88].

Kolejnym enzymem stanowiącym potencjalny punkt uchwytu dla nowych leków jest β -sekretaza, BACE1. Początkowo była uznawana za bezpieczny cel, ponieważ wstępne testy z wykorzystaniem myszy pozbawionych genu kodującego ten enzym nie wykazały żadnych poważnych nieprawidłowości. Dalsze badania ujawniły jednak zaburzenia poznawcze, hipomielinizację neuronów, a w niektórych przypadkach także przedwczesną śmierć zwierząt. Problemem okazało się również silne usuwanie z komórek związków hamujących ten enzym przez glikoproteinę P oraz utrudniona penetracja do OUN ze względu na dużą masę cząsteczkową (powyżej 500 D), konieczną z kolei ze względu na rozmiar miejsca aktywnego β -sekretazy. Pomimo tych

problemów, opracowywane są nowe związki chemiczne, które trafiają do badań klinicznych. Inhibitorami BACE1 są również niektóre substancje pochodzenia roślinnego, jak flawonole (myricetyna, kwercetyna), czy alkaloidy wyizolowane z organizmów morskich [86, 87, 89].

W warunkach prawidłowych, powstający z APP β -amyloid usuwany jest przez barierę krew mózg do krwiobiegu. Pośredniczy w tym receptor LRP (ang. *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein* – białko związane z receptorem lipoprotein o niskiej gęstości). Po związaniu się z tym receptorem, cząsteczka amyloidu transportowana jest do krwiobiegu, gdzie, po związaniu się między innymi z rozpuszczalną formą receptora RAGE (sRAGE) lub specyficznymi przeciwciałami, ulega degradacji. Błonowa forma receptora RAGE uczestniczy z kolei w procesie przenikania rozpuszczalnego $A\beta$ z krwiobiegu do ośrodkowego układu nerwowego i może również odgrywać rolę w patologicznym gromadzeniu się tego białka w mózgu. Postuluje się również usuwanie $A\beta$ w obrębie samego ośrodkowego układu nerwowego, w czym pośredniczyć mogą takie enzymy jak neprilizyna, insulizyna (enzym degradujący insulinę), plazmina, tkankowy aktywator plazminogenu, enzym konwertujący endotelinę czy metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej 9. Opierając się na wymienionych mechanizmach, prowadzone są prace nad związkami, które mogłyby modyfikować transport i klirens amyloidu. Pod uwagę brane są między innymi związki chemiczne, które nie przenikają przez barierę krew-mózg, ale mają zdolność wiązania $A\beta$, dzięki czemu równowaga stężeń pomiędzy OUN a krwiobiegiem zostałaby przesunięta w stronę krwi obwodowej. Do tej pory prowadzone były prace nad między innymi: specyficznymi przeciwciałami, białkiem wiążącym aktyne – gelsoliną oraz gangliozydem M1. Badano także substancje mogące modyfikować klirens $A\beta$, takie jak insulinopodobny czynnik wzrostu. Wykazano też, że modulacja aktywności neprilizyny za pośrednictwem somatostatyny lub aneksyny A1 również może prowadzić do nasilenia degradacji β -amyloidu w obrębie ośrodkowego układu nerwowego [90-94].

Interesującym sposobem ograniczania odkładania się β -amyloidu w mózgu jest immunizacja za pomocą niewielkich dawek fragmentu 1-42, dzięki czemu powstałe w organizmie przeciwciała mogą wiązać powstający $A\beta$, nasilać jego klirens lub hamować agregację i odkładanie się w postaci płytek starczych. Wstępne badania z wykorzystaniem myszy szczepu PDAPP, charakteryzujących się nasilonym

odkładaniem się β -amyloidu w mózgu, wykazały zahamowanie tego procesu wskutek szczepienia, przy czym zastosowanie terapii u młodszych zwierząt zapobiegło powstawaniu płytek amyloidowych, natomiast w przypadku starszych, u których złogi zaczęły się już odkładać, zostało ono ograniczone. Dalsze badania potwierdzały skuteczność takiego podejścia, co zaowocowało wprowadzeniem do badań klinicznych syntetycznej, agregowanej formy $A\beta_{1-42}$ pod nazwą AN-1792. Niestety, badanie zostało przerwane ze względu na zaobserwowane przypadki zapalenia opon mózgowych i mózgu, wywołane nadmierną aktywacją limfocytów T. Z drugiej strony, osoby które prawidłowo zareagowały na szczepienie, wykazywały pewną poprawę funkcji poznawczych oraz ślady eliminacji płytek. Co ciekawe, u tych osób stwierdzono większy ubytek objętości mózgu w porównaniu z osobami, które nie zareagowały na leczenie [4, 86, 87, 95].

Oprócz immunizacji aktywnej, prowadzone są również badania nad jej formą pasywną, polegające na podawaniu przeciwciał monoklonalnych przeciwko $A\beta$. Strategia ta wydaje się bezpieczniejsza, pomimo doniesień o mikrokrwotokach oraz podwyższonym poziomie naczyniowego β -amyloidu, obserwowanych u myszy. Przeciwciała mogą rozpoznawać zarówno monomeryczne formy $A\beta$, jak również oligomery oraz większe połączenia, łącznie z fibrylami. Uważa się, że ich skuteczność może się opierać na hamowaniu agregacji monomerów, zwiększaniu klirensu form oligomerycznych, aktywowaniu odpowiedzi immunologicznej przeciwko fibrylarnym postaciom $A\beta$ lub nasilaniu usuwania amyloidu z ośrodkowego układu nerwowego za pomocą mechanizmów opisanych powyżej. Prowadzone badania kliniczne z wykorzystaniem, między innymi, solanezumabu, crenezumabu oraz gantenerumabu nie wykazały jednak ich skuteczności. Obiecujące wydaje się za to kolejne przeciwciało monoklonalne – aducanumab, skierowane przeciwko agregatom β -amyloidu, bez wpływu na monomery. Przedkliniczne badania farmakokinetyczne na myszach wykazały jego zdolność do przenikania bariery krew-mózg i akumulowania się w tkance mózgowej. W randomizowanym badaniu klinicznym PRIME, wykazano zależną od dawki oraz czasu podawania leku redukcję złogów $A\beta$, zarówno płytek starczych, jak i rozpuszczalnych oligomerów. Uważa się, że za ten korzystny efekt może odpowiadać nasilenie fagocytozy płytek przez komórki mikrogleju, co dodatkowo ogranicza możliwość uwalniania się neurotoksycznych rozpuszczalnych oligomerów amyloidu β z ich powierzchni [86, 87, 96, 97].

Poza immunizacją, prowadzi się również próby zatrzymania tworzenia większych struktur przez amyloid za pomocą niewielkich peptydów lub związków małowcząsteczkowych. Peptydy, stanowiące syntetyczne, modyfikowane analogi fragmentów amyloidu β , charakteryzują się dobrą skutecznością. Ich zastosowanie jest jednak ograniczone przez bardzo słabą penetrację do OUN. Inne związki o dużej masie cząsteczkowej, jak występująca naturalnie w mózgu glikoproteina laminina czy antybiotyk przeciwgruźliczy ryfampicyna, również były brane pod uwagę jako inhibitory powstawania fibryli amyloidowych. Prowadzone były też próby zastosowania kolostryniny, mieszaniny polipeptydów bogatych w prolinę, wyizolowanej po raz pierwszy z owczej siary przez naukowców z Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk. Wykazano, że składniki kolostryniny hamują agregację β -amyloidu, jak również rozkładają istniejące już złogi. Badania kliniczne wykazały pewną poprawę zdolności poznawczych i obecnie kolostrynina jest stosowana w niektórych krajach jako nutraceutyk [4, 89, 90, 98].

Alternatywą dla peptydów są małowcząsteczkowe związki chemiczne zdolne do hamowania agregacji amyloidu. Tramiprozat (homotauryna) był jednym z pierwszych związków pochodzenia naturalnego badanych pod tym kątem. Blokuje on miejsca wiążące w rozpuszczalnym amyloidzie i uniemożliwia tworzenie fibryli. W badaniach z wykorzystaniem transgenicznych myszy TgCRND8 wykazano spadek ilości płytek starczych oraz innych rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych form $A\beta_{1-40}$ i $A\beta_{1-42}$. Badania kliniczne nie potwierdziły jednak korzyści płynących ze stosowania homotauryny w terapii choroby Alzheimera. Dodatkowo, testy przeprowadzone przez różnych badaczy sugerują, iż tramiprozat może zwiększać agregację białka τ . Co istotne, substancja ta jest składnikiem suplementów diety jakoby spowalniających utratę pamięci, dostępnych na rynku europejskim [89, 90, 99-101].

Przykładem innej cząsteczki, również pochodzenia naturalnego, jest *scyllo*-cykloheksanoheksaol (*scyllo*-inozytol). Związek ten obniża stężenie nierozpuszczalnego amyloidu, jak też rozpuszczalnych oligomerów. W teście labiryntu wodnego wykazano, iż myszy leczone *scyllo*-inozytolem zachowują się tak samo jak zwierzęta z grupy kontrolnej. Lek trafił do II fazy badań klinicznych, których wyniki uznano jednak za niewystarczające dla potwierdzenia bezpieczeństwa i skuteczności terapii w chorobie Alzheimera [86, 89, 90, 102].

Właściwości hamujące agregację amyloidu posiada melatonina, hormon regulujący procesy snu i czuwania u ludzi. Uszkadzając mostki solne pomiędzy resztami histydyny i asparaginy, melatonina uniemożliwia powstanie struktury β -harmonijki, niezbędnej do utworzenia większych struktur, w tym fibryli. Związek charakteryzuje się dobrym przenikaniem przez barierę krew-mózg, co często jest czynnikiem determinującym zastosowanie. Dodatkowo, melatonina wykazuje właściwości antyoksydacyjne. Do tej pory nie przeprowadzono jednak kontrolowanych badań klinicznych, które uzasadniłyby jej stosowanie w terapii choroby Alzheimera [86, 89, 103].

Kurkumina, polifenolowy związek wyizolowany z kłącza ostryżu długiego (*Curcuma longa* L.), hamuje powstawanie oligomerów β -amyloidu, wiąże się z powstałymi już płytkami starczymi, posiada też właściwości przeciwzapalne i przeciwutleniające. Oprócz kurkuminy, także niektóre flawonoidy były badane pod kątem właściwości antyagregacyjnych. Pozytywne rezultaty otrzymano jednak tylko dla mirycetyny. Pozostałe z testowanych związków, jak chryzyna czy 5-deoksykemferol, wręcz nasilały tworzenie fibryli. Spośród innych związków polifenolowych, na uwagę zasługuje kwas rozmarynowy, który oprócz hamowania powstawania fibryli, zapobiega również powstawaniu ROS, peroksydacji lipidów, uszkodzeniom DNA oraz hiperfosforylacji białka τ . Właściwości antyagregacyjne wykazano także dla niektórych alkaloidów pirydynowych oraz piperidynowych. Ich rola w terapii choroby Alzheimera zostanie dokładniej omówiona w rozdziale 1.4.2 [89].

Kolejnym ważnym punktem uchwytu dla potencjalnych terapii antyalzheimerowych jest białko τ . Strategie nakierowane na to białko rozwijają się wolniej niż te skierowane przeciwko β -amyloidowi. Wynika to między innymi z wewnątrzneuronalnego występowania białka τ , co czyni je trudniej dostępnym. Mimo to, od końca pierwszej dekady XXI wieku prowadzone są badania nad lekami wpływającymi na białko τ . Pierwszym etapem powstawania jego nieprawidłowej formy jest nadmierna fosforylacja. Jako potencjalny punkt uchwytu działania leków jest to trudny proces, ze względu na liczne miejsca fosforylacji w obrębie białka, brak wystarczającej wiedzy na temat znaczenia poszczególnych epitopów, jak również możliwość fosforylowania danego regionu przez różne kinazy. Pomimo tych komplikacji, prowadzone są badania nad lekami mogącymi hamować proces fosforylacji, między innymi nad lekami zmniejszającymi aktywność GSK3, jednego

z głównych enzymów odpowiedzialnych za fosforylację białka τ . Silnym inhibitorem GSK3 okazał się chlorek litu, LiCl, środek stosowany między innymi w leczeniu choroby afektywnej dwubiegunowej. Badania z wykorzystaniem neuronalnych linii komórkowych wykazały zdolność litu do hamowania nadmiernej fosforylacji białka tau. Obserwowano nasilenie jego wiązania z mikrotubulami i korzystny wpływ na formowanie cytoszkieletu. Zostało to potwierdzone w badaniach na modyfikowanych genetycznie myszach szczepu JNPL3, wytwarzających nadmierne ilości ludzkiego białka τ . Dodatkową zaletą litu jest zdolność do zmniejszania odkładania się A β , najprawdopodobniej również poprzez mechanizm związany z GSK3. Krótkie, dziesięciodniowe badanie kliniczne jednakże nie potwierdziło hamowania hiperfosforylacji u pacjentów z chorobą Alzheimera [86, 87, 104, 105].

Kolejnym procesem, którego zahamowanie może być korzystne w terapii choroby Alzheimera, jest agregacja hiperfosforylowanego białka tau. W badaniach *in vitro* aktywność taką wykazał błękit metylenowy, lek stosowany do tej pory głównie ze względu na swoje właściwości antyseptyczne, jak również wykorzystywany jako barwnik w histologii. Mechanizm działania błękitu metylenowego na białko τ nie jest w pełni poznany, ale sugeruje się zakłócanie wiązania się monomerów tego białka, wpływ na degradację z udziałem proteazomów lub stymulowanie usuwania za pośrednictwem autofagii. Wciąż brak jednak badań klinicznych z udziałem pacjentów, które dałyby jednoznaczną odpowiedź na pytanie o skuteczność terapii błękitem metylenowym [86, 106].

Białka szoku termicznego (ang. *Heat Shock Protein* – Hsp), w szczególności Hsp90, odgrywają istotną rolę w zapobieganiu degradacji powstałego hiperfosforylowanego białka τ . Poprzez swoje właściwości, Hsp90 stabilizuje strukturę białka τ i chroni je przed zniszczeniem. Innym ligandem Hsp90 jest białko p35, aktywator kinazy Cdk5, uczestniczącej w nadmiernej fosforylacji białka τ . Zastosowanie inhibitorów Hsp90 znosi jego ochronne działanie, w związku z czym inhibitory te prowadzą zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio do nasilonego usuwania białka τ . W badaniach na myszach transgenicznym wykazano, że inhibitor Hsp90, EC102, istotnie obniża poziom fosforylowanego białka τ w mózgu. Efekt taki wykazuje również omawiana już wcześniej kurkumina [86, 87, 90, 107].

Najważniejszym niekorzystnym efektem hiperfosforylacji białka τ jest zmniejszenie jego wiązania z mikrotubulami – elementami cytoszkieletu neuronu – i w rezultacie, upośledzenie ich funkcji oraz degeneracja. W związku z powyższym, warte uwagi mogą być substancje zdolne do złagodzenia tego działania. Przykładem takiego leku jest przeciwnowotworowy paklitaksel, dla którego wykazano zdolność do stabilizowania mikrotubul, bez wpływu na hiperfosforylowane białko τ . O ile sam paklitaksel charakteryzuje się niewielkim przenikaniem przez barierę krew-mózg, to może być on punktem wyjścia do prac nad innymi lekami o tym samym mechanizmie działania, ale o lepszych właściwościach farmakokinetycznych [87, 90, 108].

Jak zostało to opisane w części 1.3.4, ważnym elementem patofizjologii choroby Alzheimera jest rozwijający się w mózgu stan zapalny. Przeprowadzone badania epidemiologiczne wskazują, że długotrwałe przyjmowanie leków przeciwzapalnych powoduje zmniejszenie ryzyka rozwoju demencji typu alzheimerowskiego. Spostrzeżenia te stanowią podstawę do stosowania terapii przeciwzapalnej w chorobie Alzheimera. Podjęto próby stosowania niesteroidowych leków przeciwzapalnych, takich jak ibuprofen czy naproksen. Leki te, hamując obie izoformy cyklooksygenazy (COX) – konstytucyjną COX-1 oraz indukowalną COX-2, wykazują silne działanie przeciwzapalne, połączone jednak z niekorzystnym wpływem na błonę śluzową przewodu pokarmowego i zwiększonym ryzykiem rozwoju choroby wrzodowej. Próbą ominięcia tego problemu było zastosowanie nowszych, selektywnych inhibitorów COX-2, jak celekoksyb [4, 87, 109].

Podjęmowane były również próby stosowania leków przeciwzapalnych o innym mechanizmie działania. Przykładem może być prednizon, syntetyczny glikokortykosteroid o działaniu przeciwzapalnym. W 2000 roku opublikowano wyniki badania klinicznego z wykorzystaniem niskich dawek leku, które nie wykazało różnic w utracie zdolności poznawczych pomiędzy grupą leczoną prednizonem oraz placebo. Opublikowane rok później wyniki badania dotyczącego hydroksychlorochiny, kolejnego związku o działaniu przeciwzapalnym, również nie wykazały poprawy w grupie pacjentów przyjmujących lek [4, 110, 111].

Pomimo opisanych powyżej niepowodzeń, leki przeciwzapalne wciąż są traktowane jako obiecujący obiekt badań. Wynika to między innymi z faktu, że przebieg procesu zapalnego w chorobie Alzheimera różni się od tego występującego

w tkankach obwodowych, a który był celem działania tradycyjnych leków. Obiecujące wydają się próby przeprowadzane z lekami wpływającymi na poziom cytokin prozapalnych, takimi jak VP-025 (fosfolipidowe nanocząstki zawierające fosfatydyloglicerol). Przeprowadzone do tej pory badania wykazały między innymi zdolność do obniżania poziomu wytwarzania prozapalnej cytokiny – interleukiny 8. Leki te mogą również modulować aktywność makrofagów i ograniczać ich odpowiedź na czynniki indukujące stan zapalny [87, 112].

Właściwości przeciwzapalne posiadają znane często leki, których stosowanie może okazać się korzystne w chorobie Alzheimera. Dotyczy to przede wszystkim statyn – leków obniżających poziom cholesterolu we krwi, inhibitorów reduktazy HMG-CoA (3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A), jak również doustnych leków przeciwcukrzycowych – agonistów receptora PPAR γ (ang. *Peroxisome Proliferators-Activated Receptors* – receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów). Zastosowanie statyn opiera się na pozytywnej korelacji pomiędzy występowaniem hipercholesterolemii a rozwojem choroby Alzheimera. Pod uwagę brany jest fakt, iż mutacja genu kodującego APOE, uczestniczącą w transporcie lipidów, jest istotnym czynnikiem ryzyka dla AD. Dodatkowo, na przełomie XX i XXI wieku przeprowadzono liczne badania obserwacyjne, z których większość dowodzi związku pomiędzy stosowaniem statyn a obniżonym ryzykiem wystąpienia demencji, w tym choroby Alzheimera. Z drugiej strony, przeprowadzone kontrolowane badania kliniczne z udziałem między innymi osób w wieku podeszłym lub cierpiących na chorobę Alzheimera, nie dały jednoznacznych rezultatów i tylko część z nich wykazała korzystny wpływ statyn na zdolności poznawcze. W 2012 roku pojawiło się również ostrzeżenie ze strony amerykańskiej agencji FDA o możliwym negatywnym wpływie statyn na procesy poznawcze. Metaanaliza badań klinicznych nie potwierdziła jednak takiego niebezpieczeństwa [113, 114].

Do tej pory nie został w pełni wyjaśniony mechanizm działania neuroprotekcynowego statyn. Początkowo zakładano, że jest on związany z obniżeniem poziomu cholesterolu i zmniejszeniem ryzyka zaburzeń naczyniowych w mózgu. Obecnie uważa się, że istotną rolę odgrywa też ich aktywność antyoksydacyjna i przeciwzapalna. Wykazano, że leki te zmniejszają wytwarzanie ROS w komórkach śródbłonna, zwiększają aktywność dysmutazy ponadtlenkowej oraz eNOS, jednocześnie hamując formę indukowalną syntazy tlenku azotu. Dzięki temu mogą ograniczać skutki

indukowanego amyloidem β stresu oksydacyjnego. Zmniejszają również aktywność komórek mikrogleju, przez co ograniczają syntezę mediatorów stanu zapalnego, takich jak interleukina 1β . Statyny mogą również modulować proces powstawania β -amyloidu, poprzez pośredni wpływ na zależne od cholesterolu sekretazy błonowe [113, 115].

Leki będące agonistami receptora PPAR γ są również traktowane jako potencjalnie skuteczne w chorobie Alzheimera, w dużej mierze dzięki swoim właściwościom przeciwzapalnym. Wynika to z roli receptorów PPAR γ – hamują one wytwarzanie cytokin prozapalnych, takich jak interleukina 1β , interleukina 6 oraz TNF α , jak również hamują aktywność komórek mikrogleju, co także wiąże się ze spadkiem wytwarzania mediatorów stanu zapalnego. Agonisty tego receptora, do których zaliczane są niektóre niesteroidowe leki przeciwzapalne, oraz doustne leki przeciwcukrzycowe, pochodne tiazolidynodionu, są badane pod kątem użyteczności w leczeniu choroby Alzheimera. Przeprowadzone na transgenicznym szczepie myszy APPV717I badania z wykorzystaniem pioglitazonu wykazały spadek aktywności mikrogleju oraz astrocytów w hipokampie i korze mózgu. Dodatkowo, stwierdzono spadek ekspresji indukowalnych enzymów związanych ze stanem zapalnym i stresem oksydacyjnym – COX-2 oraz iNOS oraz zmniejszenie ilości sekretazy BACE1. Niestety, podobnie jak przy wielu innych proponowanych terapiach, badania kliniczne nad monoterapią rozyglitazonem nie przyniosły zadowalających rezultatów [87, 116-118].

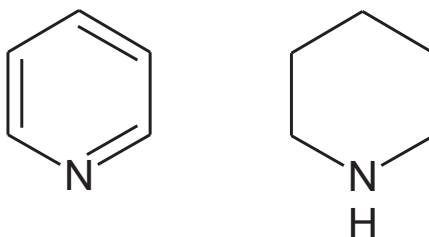
Agonisty receptora PPAR γ wywierają swoje korzystne działanie między innymi poprzez zmniejszanie stresu oksydacyjnego w komórkach ośrodkowego układu nerwowego. Inne substancje o takim działaniu również są intensywnie badane pod kątem przydatności w terapii lub prewencji choroby Alzheimera. Jednym z najczęściej przywoływanych w tym kontekście przeciwutleniaczy jest α -tokoferol, najważniejszy z grupy związków wchodzących w skład witaminy E. Zmniejszając ilość wolnych rodników, redukuje uszkodzenia wywołane przez ROS na skutek aktywacji mikrogleju, zaburzeń funkcjonowania mitochondriów lub innych przyczyn, opisanych w rozdziale 1.3.4. Witamina E była testowana w licznych badaniach klinicznych, zarówno jako samodzielny lek jak i w połączeniu z innymi przeciwutleniaczami czy lekami stosowanymi już w terapii choroby Alzheimera. Uzyskane wyniki są jednak niejednoznaczne i potrzeba większej ilości dobrze zaplanowanych badań, aby ewentualnie potwierdzić pozycję witaminy E w farmakoterapii AD [4, 119-121].

W związku z brakiem istotnej skuteczności opisanych powyżej strategii, prowadzi się również badania nad substancjami mogącymi wpływać i regulować inne mechanizmy zaangażowane w rozwój objawów choroby Alzheimera. Potencjalnym źródłem ROS i innych czynników uszkadzających komórki są mitochondria, które ulegają zniszczeniu w trakcie rozwoju choroby. Przyczyną jest prawdopodobnie powstanie dysfunkcyjnych kanałów – MPTP (ang. *Mitochondrial Permeability Transition Pore* – pory mitochondrialne), przez które może dochodzić do nadmiernego zwiększenia przepuszczalności błony mitochondrialnej. Lekiem blokującym takie kanały okazał się dimebon, którego skuteczność nie została jednak potwierdzona w badaniach klinicznych. Rozważana jest także terapia z wykorzystaniem hormonów płciowych – testosteronu i estrogenów, dla których wykazano działanie neuroprotektyjne. U kobiet stosujących hormonalną terapię zastępczą obserwowano spadek ryzyka wystąpienia AD. Próbuje się także wpłynąć na żywotność komórek nerwowych za pośrednictwem czynników wzrostu, takich jak NGF (ang. *Nerve Growth Factor* – czynnik wzrostu nerwów). Obecnie w leczeniu, jako środek wspomagający terapię choroby Alzheimera, stosowana jest cerebrolizyna, mieszanina peptydów uzyskana z mózgow świń, pobudzająca różnicowanie i aktywność komórek nerwowych [4, 86, 90].

Powyższy przegląd nie wyczerpuje wszystkich potencjalnych sposobów walki z chorobą Alzheimera. Wymienione zostały tylko przykłady kilkunastu potencjalnych leków, które obecnie znajdują się w trakcie lub dla których już zakończyły się badania kliniczne. Dotychczasowe wysiłki nie przyniosły zadowalających rezultatów i od czasu dopuszczenia do obrotu memantyny żaden nowy lek nie został zarejestrowany w leczeniu AD.

1.4.3. Znaczenie alkaloidów pirydynowych oraz piperydynowych w leczeniu choroby Alzheimera

Alkaloidy pirydynowe oraz piperydynowe, to grupa biologicznie aktywnych związków chemicznych występujących obficie w królestwie roślin. Pod względem chemicznym stanowią one zróżnicowaną grupę pochodnych pirydyny lub piperydyny, różniących się stopniem nasycenia sześciowęglowego pierścienia (rys. 6).



Rysunek 6. Struktury chemiczne pirydyny (po lewej) i piperydyny (po prawej).

Najbardziej znanym i rozpowszechnionym przedstawicielem tej grupy związków jest nikotyna, (S)-3-[2-(N-metylopirolidyno)]pirydyna, występująca w liściach i korzeniach tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum* L.). Oprócz dobrze poznanych negatywnych skutków palenia tytoniu, intensywnie badane są również zależności pomiędzy stosowaniem tytoniu a występowaniem chorób degeneracyjnych ośrodkowego układu nerwowego, między innymi choroby Alzheimera. Początkowe odkrycie negatywnej korelacji między paleniem tytoniu a zachorowalnością na AD obecnie wydaje się być mniej oczywiste i wymagające dalszych badań. Część kontrowersji dotyczy między innymi składu dymu tytoniowego, który zawiera około 4700 substancji chemicznych, z których liczne to związki o udowodnionym szkodliwym wpływie na OUN. Z drugiej strony, wykazano korzystny wpływ nikotyny na zdolności poznawcze – między innymi poprzez zwiększenie uwagi, lepszą zdolność do rozpoznawania przedmiotów czy pamięć krótkotrwałą. Uważa się, że stać za tym może stymulacja wytwarzania czynnika wzrostu nerwów oraz jego receptorów przez nikotynę. Innym wyjaśnieniem może być nasilenie przekaźnictwa cholinergicznego poprzez zwiększenie ilości receptorów nikotynowych oraz nasilenie uwalniania acetylocholino z zakończeń nerwowych [122-125].

Uważa się również, że nikotyna może chronić przed neurotoksycznością związaną z β -amyloidem. Badania Wang i wsp. [126] dowodzą niekorzystnego wpływu A β na receptor nikotynowy $\alpha 7$. Amyloid blokuje przepływ jonów Ca^{2+} przez kanał tego receptora i uwalnianie acetylocholino. Nikotyna, uniemożliwiając oddziaływanie pomiędzy amyloidem i receptorem nikotynowym, wykazuje działanie neuroprotektcyjne. Postuluje się również bezpośrednie wiązanie się nikotyny z A β . Za pomocą takich technik jak elektrochemiczna spektroskopia impedancyjna, dichroizm kołowy czy jądrowy rezonans magnetyczny ustalono, że nikotyna wiąże się z rozpuszczalnymi α -helisami i uniemożliwia ich przekształcenie w nierozpuszczalne

struktury β -harmonijki. Określono również stałą wiązania pomiędzy alkaloidem a cząsteczką $A\beta_{1-40}$ ($K_a = 0,8 \pm 0,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) [122, 127, 128]. Nikotyna wiąże się w rejonie pierwszych dwudziestu ośmiu aminokwasów peptydu, angażując reszty histydynowe i stabilizując konformację α -helisy. Nordberg i wsp. [129] w swoich badaniach z wykorzystaniem modyfikowanych genetycznie myszy, wykazali mniejsze odkładanie się płytek amyloidowych w grupie leczonej nikotyną w porównaniu do grupy kontrolnej, jak również spadek stężenia nierozpuszczalnego β -amyloidu, jednak bez wpływu na frakcję rozpuszczalną.

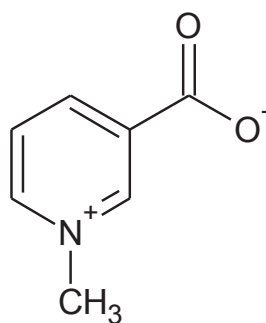
Pomimo wskazanych korzystnych cech, obserwuje się również inne efekty, które negatywnie wpływają na rolę nikotyny jako potencjalnego leku. Jednym z najważniejszych jest odkrycie, że stosowanie tego alkaloidu zwiększa ilość hiperfosforylowanego białka τ . Wiąże się to najprawdopodobniej ze zwiększeniem ilości zależnej od Ca^{2+} kinazy p38, która uczestniczy w fosforylacji białka τ . Przewlekłe stosowanie nikotyny może więc z jednej strony prowadzić do zmniejszenia ilości płytek starczych, jednocześnie jednak zwiększając ilość splątków neurofibrilarnych [122, 130].

Nikotyna jest dobrym przykładem kontrowersji, jakie towarzyszą również innym alkaloidom pirydynowym i piperydynowym. Arekolina, to główny składnik alkaloidowy orzechów palmy arekowej (*Areca catechu* L.) oraz popularnej w krajach azjatyckich używki – betelu. Alkaloid ten poprawia pamięć u chorych na chorobę Alzheimera poprzez wpływ na mózgowo receptory muskarynowe M1 oraz M2. Rzekomo w populacji konsumentów betelu jest mniejsza zachorowalność na chorobę Alzheimera. Z drugiej strony, żucie betelu zostało powiązane ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na nowotwory jamy ustnej. Sama arekolina z kolei posiada właściwości neurotoksyczne, wynikające przede wszystkim z indukowania stresu oksydacyjnego i hamowania aktywności endogennych mechanizmów chroniących przed reaktywnymi postaciami tlenu [131, 132].

Wspólną cechą wielu alkaloidów pirydynowych i piperydynowych jest zdolność do wiązania się z cząsteczką β -amyloidu. Grabowska i wsp. [133], za pomocą elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej, wyznaczyli stałe wiązania dla ośmiu naturalnie występujących alkaloidów z tej grupy: anabazyny, koniiny, arekoliny, α -lobeliny, pseudopelletieryny, trygoneliny, kotyniny oraz nikotyny. Niektóre z wymienionych związków, jak opisane już wcześniej nikotyna i arekolina, były brane

pod uwagę jako potencjalne leki w chorobie Alzheimera. Kotynina jest metabolitem nikotyny o dłuższym biologicznym okresie półtrwania (19 - 24 godziny, przy 2 - 3 godzinach dla nikotyny), jednak z dużo mniejszym powinowactwem do receptorów nikotynowych. Interakcje tego alkaloidu z β -amyloidem, wpływ na powstawanie płytek starczych oraz pamięć, a także na aktywność kinazy białkowej B, był badany przez Echeverria i wsp. [134]. Wyniki tych autorów wskazują na poprawę pamięci, zahamowanie agregacji β -amyloidu i powstawania płytek starczych, jak również, poprzez fosforylację z udziałem kinazy Akt, na hamowanie aktywności GSK3 β , biorącej udział w fosforylacji białka τ .

Trygonelina (TRG), alkaloid występujący obficie w nasionach kozieradki pospolitej (*Trigonella foenum-graecum* L.) oraz ziarnach kawy (*Coffea arabica* L.), to kolejny przedstawiciel tych naturalnych pochodnych pirydyny, którego właściwości mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii lub zapobieganiu chorobie Alzheimera. Trygonelina wyróżnia się unikatową strukturą chemiczną. Jest to jon obojnaczy, pochodna pirydyniowa, czwartorzędowa sól amoniowa. Zawiera elementy struktury charakterystyczne dla witaminy B₃ – niacyny (rys. 7). Szczególne zainteresowanie tym związkiem wynika też z faktu, że będąc składnikiem kawy jest jednym z najczęściej spożywanych alkaloidów. Dla trygoneliny wykazano również aktywność przeciwcukrzycową oraz obniżającą poziom lipidów we krwi [135, 136]. Istotne jest także to, że w badaniach z wykorzystaniem linii komórkowej SK-N-SH wykazano zdolność tego alkaloidu do regenerowania sieci neuronalnej poprzez stymulację rozwoju wypustek komórek nerwowych (neurytów) jak również poprawę zdolności poznawczych w mysim modelu choroby Alzheimera [137, 138]. Przeprowadzone uprzednio w Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego badania [133] wykazały stałą wiązania trygoneliny z β -amyloidem na poziomie $0,28 \pm 0,45 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Jest to wartość porównywalna z uzyskanymi dla innych alkaloidów pirydynowych i piperidynowych oraz związku referencyjnego czerwieni Kongo. Ten fakt oraz szczególna budowa chemiczna trygoneliny były podstawą do wyboru alkaloidu i pochodnych pirydyniowych do badań pod kątem możliwości zastosowania w chorobie Alzheimera.



Rysunek 7. Struktura chemiczna trygoneliny.

1.5. Przykładowe sposoby oceny potencjalnych leków przeciwko chorobie Alzheimera

Jak wykazano powyżej, leczenie oraz zapobieganie chorobie Alzheimera jest zagadnieniem trudnym. Pomimo znacznego rozwoju wiedzy na temat przyczyn i narastania objawów tej wyniszczającej choroby, wciąż nie poznano odpowiedzi na zasadnicze pytania: co jest czynnikiem inicjującym schorzenie i co odgrywa najważniejszą rolę w narastającej neurodegeneracji? Mimo wszystko, prace nad poszukiwaniem nowego leku trwają – równocześnie z próbami dokładniejszego poznania patomechanizmów choroby. Każdy z dotychczas poznanych elementów patofizjologii choroby Alzheimera jest punktem uchwytu dla potencjalnych terapii. Próbuje się również poszukiwać leków o wielokierunkowym działaniu, które mogłyby wpływać jednocześnie na kilka procesów, a w konsekwencji charakteryzować się większą skutecznością przeprowadzanej terapii [139].

Jednym z pierwszych etapów poszukiwania cząsteczek o potencjalnych korzystnych właściwościach w terapii danego schorzenia jest przeprowadzenie przesiewowych badań *in silico*, a więc z wykorzystaniem programów komputerowych. Badania takie obejmują między innymi modelowanie molekularne. Jest to szerokie pojęcie, obejmujące zarówno komputerowe metody wyznaczania parametrów fizykochemicznych związków chemicznych, jak i symulowanie interakcji pomiędzy cząsteczką leku a związkiem wielkocząsteczkowym, jak chociażby białkiem receptora [140]. Z punktu widzenia niniejszej pracy istotne jest modelowanie wiązania się wybranych alkaloidów i ich pochodnych do cząsteczki β -amyloidu, czyli tak zwane dokowanie molekularne. Jak opisano to w poprzednich rozdziałach, agregacja i tworzenie oligomerów oraz fibryli przez $A\beta$ stanowi jeden z ważniejszych elementów

patofizjologii choroby Alzheimera. Substancje, które mogłyby wiązać się z amyloidem i blokować tworzenie przez monomery większych struktur, są potencjalnymi lekami lub środkami zabezpieczającymi przed rozwojem choroby. Dokowanie molekularne jest techniką, którą można wykorzystać do oceny możliwości wiązania się substancji małocząsteczkowej z białkiem. Jest to metoda obliczeniowa pozwalająca na określenie parametrów struktury liganda, koniecznych do interakcji z receptorem lub określonym miejscem w strukturze białka, czy też na przewidywanie miejsc, w których ligand będzie oddziaływał z makromolekułą [141].

Obecnie dostępnych jest kilkadziesiąt programów komputerowych służących do przeprowadzania dokowania molekularnego. Wśród nich są zarówno komercyjne programy, jak przykładowo Scigress (Fujitsu) czy FlexX (BioSolveIT), jak również programy dostępne nieodpłatnie, do których należą jedne z najpopularniejszych programów: AutoDock i AutoDock Vina (The Scripps Research Institute). Program AutoDock do symulacji wiązania liganda wykorzystuje odpowiednią siatkę, w którą wbudowane jest badane białko, a której parametry wyznaczone są podczas opracowywania metody analizy. Dla przeprowadzenia dokowania niezbędna jest znajomość struktury badanej makromolekuły. Może być ona często pozyskana z ogólnodostępnych baz, takich jak *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Po optymalizacji geometrii cząsteczki liganda i ustaleniu prawdopodobnego miejsca wiążącego w strukturze białka, przeprowadza się właściwą procedurę dokowania.

Chemia obliczeniowa może dostarczyć cennych informacji o strukturze chemicznej i właściwościach fizykochemicznych potencjalnych leków. Zanim jednak konkretna cząsteczka trafi do dalszych badań, należy oszacować jej bezpieczeństwo. W tym celu wykorzystuje się między innymi testy cytotoksyczności *in vitro*, z wykorzystaniem określonych linii komórkowych. Współcześnie testy te przeprowadza się w zminiaturyzowanych systemach umożliwiającym analizę wielu związków w tym samym czasie, połączonych z automatycznym odczytywaniem wyników przez odpowiedni spektrofotometr. W zależności od wybranego testu, oceniać można ilość żywych komórek lub takich, w których doszło do nieodwracalnych zmian i śmierci. Jednym z podstawowych badań jest pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (ang. *Lactate Dehydrogenase* - LDH) w pożywce hodowlanej. LDH jest cytozolowym enzymem, który w momencie uszkodzenia błony komórkowej szybko przechodzi do

środowiska zewnątrzkomórkowego. W pomiarze aktywności wykorzystuje się dwuetapowy test enzymatyczny, w którym najpierw mleczan przekształcany jest w pirogronian przy udziale LDH, z jednoczesnym przeniesieniem H^+ na dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD^+), a następnie kolejny enzym, diaforaza, katalizuje redukcję chlorku 2-(4-jodofenylo)-3-(4-nitrofenylo)-5-fenylotetrazolu przez powstały $NADH/H^+$ do czerwonego formazanu, który jest oznaczany spektrofotometrycznie.

Pomiaru ilości żywych komórek można dokonać za pomocą takich testów, jak próba z MTT, czerwień obojętną lub lucyferazą. MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu) jest rozpuszczalną w wodzie solą, która przy udziale mitochondrialnej dehydrogenazy bursztynianowej przekształcana jest do nierozpuszczalnego w wodzie, ciemnoniebieskiego formazanu. Po rozpuszczeniu kryształków formazanu w rozpuszczalniku organicznym, na przykład DMSO, jego stężenie oznaczane jest kolorymetrycznie. Czerwień obojętna jest z kolei odczynnikiem, który przenika do wnętrza funkcjonujących komórek i gromadzi się w lizosomach. Po przeprowadzeniu lizy komórek stężenie barwnika oznaczane jest analogicznie do poprzednich testów. Do oceny ilości ATP w żywej, metabolizującej komórce zastosować można test z lucyferazą, opierający się na pomiarze intensywności światła emitowanego w wyniku reakcji ATP i lucefiryryny, katalizowanej przez lucyferazę [142-144].

Zaprojektowanie cząsteczki o pożądanym właściwościach oraz potwierdzenie bezpieczeństwa stosowania nie gwarantuje jeszcze możliwości zastosowania odpowiedniej substancji jako leku. Substancja taka musi posiadać również odpowiednie właściwości farmakokinetyczne, aby zapewniona została dystrybucja do miejsca działania leku w organizmie. Badania farmakokinetyczne w fazie przedklinicznej prowadzi się podając lek zwierzętom laboratoryjnym, najczęściej gryzoniom lub królikom, a następnie w określonych punktach czasowych pobiera się próbki krwi, w których stężenie leku oznaczane jest za pomocą odpowiedniej techniki analitycznej.

Poznanie właściwości farmakokinetycznych jest niezbędne z punktu widzenia pracy nad nowym lekiem. Określenie sposobu, w jaki substancja lecznicza ulega dystrybucji, metabolizmowi oraz eliminacji w organizmie pozwoli dobrać odpowiednią dawkę i przedział dawkowania, jak również dostarczy kolejnych informacji ma temat bezpieczeństwa – związanych przykładowo z możliwością występowania interakcji

z innymi lekami, które mogą być stosowane przez pacjenta. Do podstawowych parametrów farmakokinetycznych można zaliczyć klirens (CL), objętość dystrybucji (V_D) oraz biologiczny okres półtrwania ($t_{0,5}$). Klirens stanowi ułamek dawki leku, jaki zostaje usunięty z krwi w jednostce czasu. Parametr ten ma bardzo duże znaczenie kliniczne, pozwala między innymi ustalić dawkę, jaką powinien przyjmować pacjent, aby stężenie leku we krwi mieściło się w tak zwanym oknie terapeutycznym, a więc w przedziale stężeń pomiędzy minimalnym toksycznym a maksymalnym terapeutycznym. Wartość objętości dystrybucji dostarcza z kolei informacji na temat ilości leku znajdującej się poza układem krążenia. Wyrażana jest ona objętością, jaką zająłby roztwór danej substancji, gdyby miał takie stężenie jak mierzone we krwi, po podaniu określonej ilości leku. Im wyższa wartość V_D , tym większa ilość leku rozmieszcza się w przestrzeni pozanaczyniowej i tkankach. Biologiczny okres półtrwania to czas, w którym stężenie leku we krwi spada o 50% wyjściowej wartości. Parametr ten, podobnie jak klirens, charakteryzuje eliminację leku z organizmu, w przeciwieństwie jednak do niego nie może być wprost przełożony na dawkę. Pozwala jednak wyznaczyć czas, który przy wielokrotnym podaniu leku będzie potrzebny do osiągnięcia stanu stacjonarnego [145].

W przypadku leków stosowanych w chorobie Alzheimera szczególnie istotne jest wykazanie ich zdolności do przechodzenia przez barierę krew-mózg. Bariera ta tworzona jest przez ściśle przylegające do siebie komórki śródbłonna naczyń włosowatych w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Dodatkowo, wewnątrz komórek znajdują się liczne enzymy degradujące niepożądane substancje, jak również glikoproteina P – białko odpowiadające za aktywne usuwanie ksenobiotyków. Substancje znajdujące się w osoczu mogą trafiać do OUN jedynie na zasadzie transportu przezkomórkowego. Ogranicza to pulę związków zdolnych do przenikania bariery krew-mózg do substancji lipofilowych, które mogą przechodzić przez błony komórkowe na zasadzie dyfuzji. Pozostałe związki (substancje zużytkowalne: „nutriens”) wymagają odpowiednich transporterów lub innych niż dyfuzja mechanizmów transportu. Tak przenoszone do mózgu są aminokwasy, proste cukry czy witaminy. Podobieństwo strukturalne trygoneliny do aminokwasów oraz witaminy B₃ uzasadniało możliwość aktywnego transportu do mózgu. Celowym wydawało się zatem oznaczenie stężenia tego związku w preparatach tkanki mózgowej po podaniu dożylnym. Do oceny przenikania leków przez barierę krew-mózg opracowane zostały

liczne strategie, obejmujące między innymi wykorzystanie sztucznych błon w warunkach *in vitro*, jak również badania *in vivo*: mikrodializę czy perfuzję mózgu z wykorzystaniem roztworu badanego leku [146].

W wyniku odpowiednio zaplanowanego i przeprowadzonego eksperymentu farmakokinetycznego w różnych punktach czasowych pobierane są próbki krwi, w których należy oznaczyć poziom badanego leku. Często wykorzystywane są w tym celu techniki chromatograficzne, takie jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High-Performance Liquid Chromatography* – HPLC) czy chromatografia gazowa (ang. *Gas Chromatography* – GC). Obecnie za standard można uznać zastosowanie technik chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią mas (ang. *Mass Spectrometry* – MS), co umożliwia oznaczanie związków na wielokrotnie niższych poziomach stężeń niż przy zastosowaniu tradycyjnych detektorów, takich jak np. detekcja UV.

Chromatografia cieczowa, to technika analityczna opierająca się na podziale analitu pomiędzy dwie fazy – fazę stacjonarną oraz przepływającą przez kolumnę fazę ruchomą. Współczynnik podziału pomiędzy fazami zależy od właściwości fizykochemicznych analizowanej substancji. Jest on parametrem warunkującym czas retencji, a więc to jak długo dany analit będzie przechodził przez kolumnę chromatograficzną. W zależności od właściwości fazy stacjonarnej i ruchomej wyróżnia się kilka rodzajów chromatografii cieczowej: chromatografię w normalnym (ang. *Normal-Phase* – NP) i odwróconym (ang. *Reversed-Phase* – RP) układzie faz, chromatografię jonowymienną (ang. *Ion-Exchange Chromatography* – IEC) oraz chromatografię cieczową oddziaływań hydrofilowych (ang. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC). W chromatografii w normalnym układzie faz eluent (faza ruchoma) jest mniej polarny od fazy stacjonarnej. O podziale analitu pomiędzy obie fazy decyduje przede wszystkim adsorpcja na powierzchni wypełnienia kolumny, które stanowi najczęściej modyfikowany żel krzemionkowy. Fazę ruchomą stanowią niepolarne rozpuszczalniki organiczne, takie jak heksan, chlorek metylenu czy chloroform. NP-HPLC najczęściej wykorzystywana jest do analizy niejonowych związków organicznych o małej polarności [147].

Chromatografia w odwróconym układzie faz należy do najpowszechniej stosowanych technik chromatograficznych. W układzie tym faza stacjonarna

charakteryzuje się mniejszą polarnością niż faza ruchoma, którą najczęściej stanowi mieszanina wody lub wodnego roztworu buforu i rozpuszczalnika organicznego, takiego jak metanol czy acetonitryl. Wypełnienia kolumn chromatograficznych stanowią liczne modyfikacje żelu krzemionkowego, przy czym najczęściej używane są kolumny C18 z powierzchnią krzemionki modyfikowaną grupami oktadecylosilanowymi. Kolejność elucji zależy od polarności analitów – im mniejsza, tym dłuższy będzie czas retencji w danych warunkach [148].

Chromatografia jonowymienna opiera się na stosowaniu wypełnień kolumn o charakterze „wymieniaczy jonowych”, które mają zdolność wiązania obecnych w fazie ruchomej zjonizowanych analitów, wymieniając je na jony znajdujące się w fazie stacjonarnej. Technika ta nadaje się do oznaczania trwale lub przejściowo zjonizowanych związków, takich jak aminokwasy czy peptydy [148].

Techniką łączącą zalety wyżej wymienionych technik chromatograficznych jest chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Fazę stacjonarną stanowi krzemionka modyfikowana między innymi grupami aminowymi. Fazę ruchomą natomiast woda lub wodny bufor zmieszany z rozpuszczalnikiem organicznym, najczęściej acetonitrylem. Zatrzymywanie analitów zachodzi głównie w cienkiej zaadsorbowanej warstwie wodnej tworzącej się na granicy faz. Technika HILIC bardzo dobrze nadaje się do oznaczania małych, polarnych oraz zjonizowanych związków chemicznych [149].

Obecnie stosowane są dwie procedury prowadzenia rozdzielania chromatograficznego składników mieszaniny: elucja izokratyczna oraz gradientowa. Pierwsza z nich polega na prowadzeniu całego rozdziału w stałych warunkach, a więc przy ustalonym przepływie oraz składzie fazy ruchomej, temperaturze kolumny i tym podobnych. Metoda ta pozwala na szybką analizę, konieczna jest jednak dobra znajomość właściwości fizykochemicznych składników badanej mieszaniny. W przypadku mieszanin o nieznanym składzie lepiej sprawdza się elucja gradientowa, w której warunki analizy zmieniają się w czasie. Jednym z powszechniej stosowanych jest gradient składu fazy ruchomej. W przypadku RP-HPLC, gradient rozpoczyna się od małej zawartości modyfikatora organicznego i stopniowo lub skokowo się ją zwiększa. W technice HILIC stosuje się odwrotny gradient, z początkową dużą zawartością rozpuszczalnika organicznego. Zaletą takiego podejścia jest możliwość elucji

składników o różnych właściwościach. Wadą natomiast jest długi czas analizy – pomiędzy kolejnymi nasytzeniami konieczne jest kondycjonowanie kolumny, podczas którego przywracane są początkowe warunki analizy. Czas trwania kondycjonowania zależy od właściwości kolumny i samego gradientu. Przyjmuje się jednak, że im dłuższy gradient, tym dłuższy powinien być czas ekwilibracji [150].

Zastosowanie metody analitycznej do ilościowej oceny zawartości leku w próbce wymaga potwierdzenia wiarygodności tej metody. W tym celu przeprowadza się walidację metody analitycznej. Jest to zespół testów, do których należy między innymi określenie precyzji, dokładności, granicy wykrywalności i granicy oznaczalności, selektywności i liniowości. Precyzja (ang. *precision*) charakteryzuje rozrzut uzyskanych wyników wokół wartości średniej, natomiast dokładność (ang. *accuracy*) odnosi się do zgodności wyniku pojedynczego pomiaru (np. stężenia) z wartością rzeczywistą. Granice wykrywalności i oznaczalności, to parametry powiązane z pojęciem stosunku sygnału do szumu (ang. *Signal to Noise ratio* – S/N). S/N oznacza stosunek sygnału analitycznego do średniej wartości szumu (sygnału nie pochodzącego od analitów) dla danej próbki. Przyjmuje się, że trzykrotna wartość S/N definiuje granicę wykrywalności (ang. *Limit Of Detection* – LOD), czyli najniższe stężenie lub ilość analitu, którą można wykryć za pomocą danej procedury analitycznej z określonym prawdopodobieństwem. Dolna granica oznaczalności (ang. *Lower Limit Of Quantification* – LLOQ) jest z kolei najniższym stężeniem możliwym do ilościowego oznaczenia daną metodą z określoną dokładnością i precyzją. W zależności od definicji, przyjmuje się, że LLOQ jest równe dwóm, trzem lub sześciu LOD. Selektywność (ang. *selectivity*) i specyficzność (ang. *specificity*) definiowane są jako możliwość oznaczenia z odpowiednią precyzją i dokładnością analitu w obecności innych składników próbki w danych warunkach. Ostatni z wymienionych parametrów, liniowość (ang. *linearity*), jest zakresem stężeń lub zawartości analitu w próbce, dla których sygnał urządzenia pomiarowego jest proporcjonalny do badanej wartości.

Podczas walidacji ocenie podlega także stabilność przygotowanych roztworów oraz próbek. Pozwala to potwierdzić, że w warunkach prowadzenia analizy, analit nie ulega rozkładowi, zarówno w roztworach wzorcowych jak i w matrycy próbki. Na podstawie wytycznych FDA, pełna ocena stabilności powinna obejmować zarówno trwałość podczas pobierania i przechowywania materiału, trwałość po długotrwałym przechowywaniu

w zamierzonej temperaturze, jak również po przechowywaniu krótkotrwałym w temperaturze pokojowej (ang. *bench top stability*). Wymagane jest również przeprowadzenie testu stabilności w warunkach analizy oraz wrażliwość analitu na wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie [151].

Sam proces walidacji wykonuje się najczęściej w ciągu kilku kolejnych dni przeprowadzając serię analiz, na podstawie których wyznacza się wartości poszczególnych parametrów walidacyjnych i ich odchyłeń. Wartości te powinny mieścić się w normach opracowanych przez takie instytucje jak Międzynarodowa Konferencja ds. Harmonizacji (obecnie Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi, ang. *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* – ICH) czy amerykańska FDA [152].

2. CEL PRACY

Poszukiwanie skutecznych metod zapobiegania lub leczenia choroby Alzheimera jest jednym z ważniejszych zadań, przed jakimi stoi obecnie nauka. Stymulują do tego również przewidywane ogromne koszty społeczne i ekonomiczne, jakie będą poniesione w najbliższej przyszłości, o ile nie zostanie odkryty sposób zahamowania rozwoju tej choroby. Istotnym problemem jest wciąż brak znajomości dokładnej etiologii i patofizjologii AD. Wszystkie badania mające na celu zrozumienie i znalezienie sposobów walki z chorobą są szczególnie istotne.

Celem pracy było poznanie właściwości trygoneliny oraz jej analogów strukturalnych, istotnych z punktu widzenia zapobiegania lub leczenia choroby Alzheimera. Dotychczasowe badania wykazały korzystny wpływ trygoneliny na pamięć oraz regenerację tkanki nerwowej [137, 138], jak również wskazują na zdolność jej wiązania z β -amyloidem [133]. Podobne właściwości wykazują również inne alkaloidy pirydynowe czy piperidynowe, jak nikotyna czy arekolina. Cechą szczególną trygoneliny jest jednak jej charakter chemiczny pirydyniowego jonu obojnaczego. Struktura chemiczna trygoneliny jest równocześnie podobna do substancji odżywczych („*nutrients*”), takich jak aminokwasy czy witamina B₃. Dlatego w pracy doktorskiej podjęto próbę modelowania mechanizmu oddziaływania trygoneliny oraz jej analogów strukturalnych z cząsteczką A β , a także oszacowania ich bezpieczeństwa względem komórek i farmakokinetyki wraz ze zdolnością przenikania do mózgu. Do tego celu konieczne było opracowanie rzetelnej metody analitycznej, umożliwiającej oznaczenie trygoneliny w materiale badanym. W pierwszej kolejności zaplanowano zastosowanie zaawansowanych metod chemii obliczeniowej i wykonanie dokowania molekularnego trygoneliny i analogów do cząsteczki amyloidu β . Kolejnym zadaniem pracy była selekcja ligandów o teoretycznie największym powinowactwie do β -amyloidu i wykonanie dla nich testów cytotoksyczności z wykorzystaniem linii ludzkich komórek nowotworowych SH-SY5Y.

W następnym etapie badań w ramach pracy doktorskiej zaplanowano wyznaczenie parametrów farmakokinetycznych trygoneliny na podstawie analizy próbek surowicy mysiej oraz ocenę penetracji tego alkaloidu do ośrodkowego układu nerwowego. W tym celu opracowana i zwalidowana została oryginalna metoda,

wykorzystująca nowoczesne techniki analityczne, takie jak spektrometria mas i chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych (HILIC).

Planowane badania miały odpowiedzieć na pytanie, czy unikatowa struktura chemiczna trygoneliny rokuje na zastosowanie tego alkaloidu lub jego pochodnych w prewencji i leczeniu choroby Alzheimerera.

3. MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej zostały podzielone na trzy etapy. W pierwszym przeprowadzono modelowanie molekularne: dokowanie grupy dwudziestu pięciu pochodnych piperydyny (analogów trygoneliny) do cząsteczki β -amyloidu. Następnie wyselekcjonowane zostały związki, dla których przeprowadzono analizę cytotoksyczności *in vitro*. Ostatnim etapem był eksperyment farmakokinetyczny, poprzedzony przez opracowanie i walidację metody analitycznej, która posłużyła do oznaczenia stężeń trygoneliny w pobranym od zwierząt materiale biologicznym i wykonanie analizy farmakokinetycznej.

3.1. Dokowanie trygoneliny oraz innych pochodnych alkaloidów pirydynowych do cząsteczki β -amyloidu

Procedura dokowania molekularnego przeprowadzona została w Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki (Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny) we współpracy z Katedrą Chemii Nieorganicznej (Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański) oraz Katedrą Chemii Teoretycznej (Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański). Do analizy wytypowano 25 związków, dostępnych w katalogach komercyjnych dostawców odczynników. Podstawowym kryterium wyboru była obecność podstawnika przy atomie azotu w układzie pirydyniowym. Wyselekcjonowane związki, na czele z trygoneliną, zostały przedstawione w Tabeli 1.

Tabela 1. Struktury chemiczne oraz nazwy analizowanych związków.

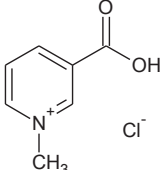
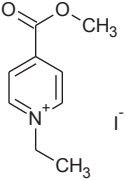
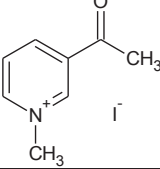
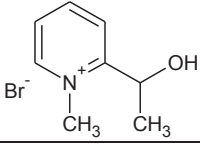
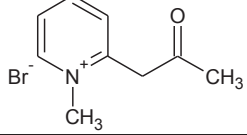
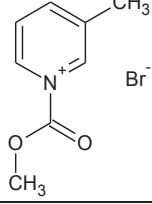
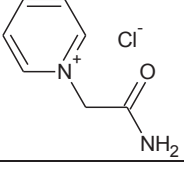
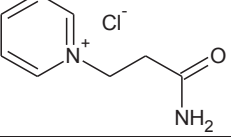
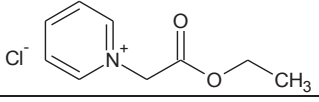
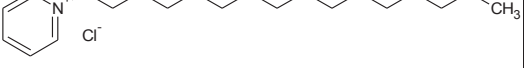
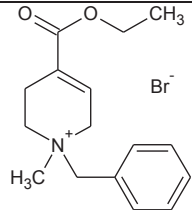
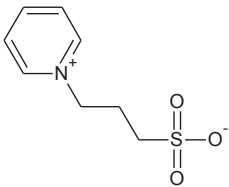
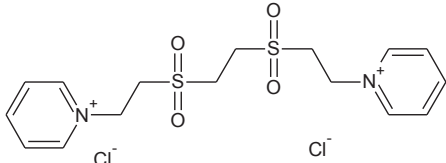
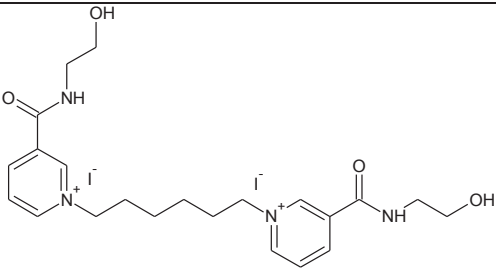
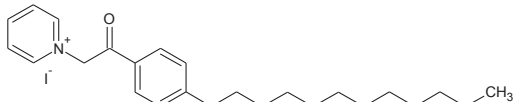
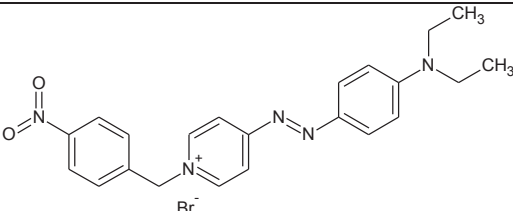
Lp.	Struktura chemiczna	Nazwa
1		Chlorek 1-metylo-3-karboksypirydyniowy (<i>Trygonelina</i>)
2		Jodek 1-etylo-4-(metoksykarbonylo)pirydyniowy
3		Jodek 3-acetylo-1-metylopirydyniowy
4		Bromek 2-(1-hydroksyetylo)-1-metylopirydyniowy
5		Bromek 1-metylo-2-(2-oksypropylo)-pirydyniowy
6		Bromek 1-metoksykarbonylo-3-metylopirydyniowy
7		Chlorek 1-(2-amino-2-oksoetylo)-pirydyniowy
8		Chlorek 1-(3-amino-3-oksopropylo)-pirydyniowy
9		Chlorek 1-(2-etoksy-2-oksoetylo)-pirydyniowy
10		Chlorek 1-heksadecylopirydyniowy

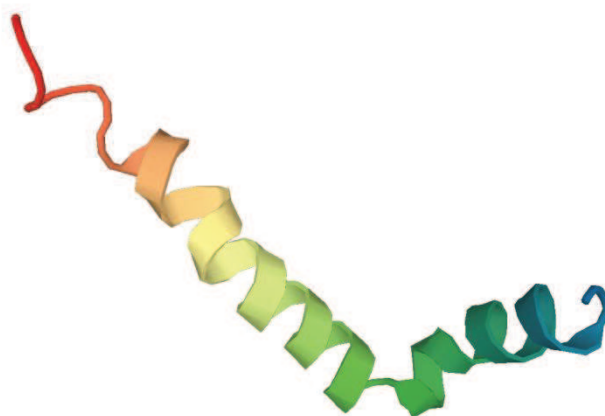
Tabela 1 – ciąg dalszy.

11		Bromek 1-heptylo-4-(4-pirydylo)-pirydyniowy
12		Chlorek 1-(4-pirydylo)-pirydyniowy
13		Tetrafluoroboran 2-bromo-1-etylo-pirydyniowy
14		Jodek 1-[2-okso-2-(2-pirydynylo)-etylo]-pirydyniowy
15		Chlorek 2-amino-1-benzylo-pirydyniowy
16		Chlorek 1-[2-[(2-izopropyl-5-metylocykloheksylo)-oksy]-2-oksoetylo]-pirydyniowy
17		Bromek 1-(1-okso-1-fenylpropan-2-ylo)-pirydyniowy
18		Bromek 1-(2-(3-metoksyfenylo)-2-oksoetylo)-pirydyniowy
19		Bromek 2-amino-1-(2-okso-2-fenyletylo)-pirydyniowy

Tabela 1 – ciąg dalszy

20		Bromek 1- benzylo-1-metylo-4-etoksykarbonylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyniowy
21		3-(1-pirydino)-1-propanosulfonian
22		Chlorek 1,1'-(etylenodisulfonyldietyleno)-bis-pirydyniowy
23		Jodek 1,1'-(heksano-1,6-diyl)-bis[3-(2-hydroksyetylokarbamoilo)-pirydyniowy]
24		Jodek 1-(4'-dodecylofenacylo)-pirydyniowy
25		Bromek 4-(4-dietyloaminofenylazo)-1-(4-nitrobenzylo)-pirydyniowy

Dokowanie przeprowadzone zostało za pomocą programu AutoDock 4.2 (The Scripps Research Institute, La Jolla, USA) [153]. Do obliczenia ładunków cząstkowych dla ligandów wykorzystano metodę PM7 [154], natomiast ich geometria została zoptymalizowana za pomocą programu MOPAC 2012 (Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, USA) [155]. Struktura β -amyloidu 1-42 (rys. 8), do której dokowane były testowane związki, pobrana została z bazy *Protein Data Bank* (model 1IYT) [156].



Rysunek 8. Model 1IYT β -amyloidu 1-42 z bazy PDB.

Miejsce dokowania ustalone zostało na podstawie danych literaturowych [127, 134]. Przyjęto, że miejscem tym będzie przestrzeń określona położeniem następujących reszt aminokwasowych (w nawiasie podano numer aminokwasu w sekwencji białka): histydyny (6), tyrozyny (10), histydyny (13) oraz histydyny (14). W celu przeprowadzenia dokowania stworzona została siatka o następujących parametrach: odstęp pomiędzy punktami 0,375 Å, 74 punkty siatki w każdej ze współrzędnych xyz, całkowita objętość obszaru dokowania 27,75 Å³. Takie ustawienia gwarantowały objęcie całego obszaru potencjalnego wiązania się cząsteczki z białkiem. Podczas dokowania struktura białka była elastyczna i miała możliwość zmiany konformacji. Poszukiwanie optymalnych konfiguracji wzajemnego ułożenia liganda i makromolekuły przeprowadzone zostało z użyciem algorytmu genetycznego [157].

3.2. Ocena cytotoksyczności *in vitro* wybranych związków

Badania cytotoksyczności przeprowadzono przy współpracy z Zakładem Biologii Komórki (Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i Uniwersytetu Gdańskiego). Wykorzystano grupę związków wyselekcjonowanych spośród ligandów użytych do modelowania molekularnego, charakteryzujących się największym powinowactwem i wybiórczością okupowania rejonu histydyny(13). Do oceny cytotoksyczności wykorzystano test z czerwienią obojętną.

3.2.1. Odczynniki i materiały

Chlorowodorek trygoneliny, bromek 1-heptylo-4-(4-pirydylo)-pirydyniowy, bromek 1-(2-(3-metoksyfenylo)-2-oksoetylo)-pirydyniowy, bromek 1-benzylo-1-metylo-4-etoksy-karbonylo-1,2,3,6-tetrahydro-pirydyniowy, bromek 4-(4-dietyloaminofenylazo)-1-(4-nitro-benzylo)-pirydyniowy, bromek 2-amino-1-(2-okso-2-fenyletylo)-pirydyniowy, chlorek 1,1'-(etylenodisulfonylodietyleno)-bis-pirydyniowy, czerwień obojętna, cytrynian sodu, kwas chlorowodorowy, metanol oraz trypsyna uzyskane zostały z Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Naczynia do hodowli komórkowych o pojemności 25 i 75 cm³ oraz płytki 96-dołkowe zakupione zostały w firmie Beckton Dickinson (Franklin Lakes, USA).

3.2.2. Hodowla komórek linii SH-SY5Y

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem linii komórkowej ludzkiego nowotworu neuroblastoma SH-SY5Y (ATCC[®]-CRL-2266[™], LGC Standards, Łomianki, Polska). Kulturę prowadzono w warunkach nawilżonej atmosfery, zawierającej mieszaninę 95% tlenu i 5% CO₂, w temperaturze 37°C (inkubator do hodowli komórkowych HeraCell, Heraeus, Langenselbold, Niemcy). Medium hodowlane stanowiła mieszanina EMEM (ang. *Eagle's Minimum Essential Medium*), składników odżywczych F12K oraz FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*) w stosunku objętościowym 45:45:10 (Life Technologies Sp. z o. o., Warszawa, Polska). Otrzymane komórki zostały poddane procedurze rozmrażania zgodnie z protokołem zalecanym przez producenta, a następnie przeniesione do naczynia hodowlanego o pojemności 25 cm³ i umieszczone w inkubatorze. Po sześciu dniach do naczynia dodano trypsynę w celu oddzielenia komórek od podłoża i przeprowadzono pierwsze rozdzielanie komórek. W tym celu zebrano medium hodowlane z naczynia, odwirowano (125 x g, 5 min.) i usunięto supernatant. Uzyskane komórki zawieszono w medium, a następnie rozdzielono uzyskując jedną krioampułkę stanowiącą zapas komórek oraz dwa naczynia hodowlane (25 cm³ oraz 75 cm³). W dalszej hodowli wykorzystywano tylko naczynia hodowlane o pojemności 75 cm³, co sześć dni przeprowadzając pasażowanie komórek, rozdzielając je na kolejne naczynia hodowlane oraz krioampułkę. Uzyskana kolonia stanowiła mieszaninę komórek przylegających do podłoża oraz unoszących się w medium hodowlanym. Zamrożone komórki stanowią repozytorium do dalszych badań, natomiast komórki z naczyń hodowlanych przeznaczone zostały na bieżące testy.

3.2.3. Ocena cytotoksyczności badanych związków

Do oceny cytotoksyczności wytypowano związki nr 1 (trygonelina), 11, 18, 19, 20, 22 oraz 23 (Tabela 1). Przygotowano wodny roztwór o stężeniu 1 mg/ml każdego z analizowanych związków, a następnie rozcieńczono je tak, aby uzyskać roztwory robocze o stężeniach 0,1, 1, 10 i 100 μM . Komórki SH-SY5Y, po osiągnięciu wystarczającej konfluencji, zostały poddane działaniu trypsyny i odwirowane. Uzyskany osad komórek przeprowadzono ponownie w zawiesinę, a następnie rozdzielono na płytkę 96-dółkową, przeznaczając około 3×10^4 komórek na jeden dółek płytki. Płytkę umieszczono w inkubatorze do hodowli komórkowych na 24 godziny, po czym usunięto pożywkę i dodano świeżą pożywkę zawierającą roztwór badanego związku. Ocenę cytotoksyczności wykonano po 24 godzinach od rozpoczęcia inkubacji. Na 40 minut przed upływem czasu pożywkę z każdego dołka usunięto za pomocą igły podłączonej do pompy próżniowej i dodano świeżą, zawierającą roztwór czerwieni obojętnej (końcowe stężenie barwnika w dołku – około 95 mg/L). Po czterdziestominutowej inkubacji w 37°C, pożywkę usunięto, dołki przepłukano 100 μl buforowanego roztworu soli (ang. *Phosphate Buffered Saline* – PBS) i dodano po 100 μl świeżo przygotowanego buforu Sorensena (mieszanina 8,04 g cytrynianu sodu, 165,5 ml 0,12 M HCl oraz 500 ml 95% metanolu uzupełniona wodą destylowaną do 1000 ml). Wynik testu odczytano korzystając z czytnika płytek (Victor 1420 Multilabel Counter, Jügesheim, Niemcy) przy długości fali 490 nm. Przeprowadzono trzy powtórzenia biologiczne, każdorazowo wykonując trzy próby z danym stężeniem.

3.3. Walidacja metody analitycznej oraz wyznaczenie parametrów farmakokinetycznych dla chlorowodorku trygoneliny

Walidacji poddano zmodyfikowaną własną metodę oznaczania trygoneliny [158]. Ocenione zostały następujące parametry metody: liniowość, dokładność, precyzja, efekt matrycy, odzysk oraz stabilność, zgodnie z wymaganiami opublikowanego przez FDA *Bioanalytical Method Validation Guidance* [151]. Zwalidowana metoda posłużyła do ilościowego oznaczenia stężenia trygoneliny w surowicy oraz mózgu myszy. Badania przeprowadzone zostały w Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

3.3.1. Odczynniki

Chlorowodorek trygoneliny i mrówczan amonu zakupione zostały w firmie Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Deuterowana trygonelina (D3-TRG), w której wodory w grupie metylowej zastąpione zostały cięższym izotopem – deuterem, stanowiła wzorzec wewnętrzny (HPC Standards GmbH, Cunnorsdorf, Niemcy). Do przygotowania fazy ruchomej wykorzystany został acetonitryl jakości LC-MS (J.T. Baker, Griesheim, Niemcy) oraz 97% kwas mrówkowy (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Niemcy). Do przygotowania roztworów wykorzystywana była dejonizowana woda uzyskana z systemu do oczyszczania wody D-100TUIM (Labopol-Polwater, Kraków, Polska).

3.3.2. Warunki chromatograficzne oraz spektrometria mas

Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu do chromatografii cieczowej firmy Agilent Technologies (Santa Clara, USA), połączonego z analizatorem mas typu potrójnego kwadrupola (Agilent 6430 Triple Quadrupole Mass Spectrometer, Santa Clara, USA). Zestaw do chromatografii cieczowej, HPLC 1200, składał się z pompy podwójnej (G1312B), termostowanego autosamplera (G1329B) oraz membranowego degazera (G1322A). Do wykonania analizy posłużyła kolumna chromatograficzna HILIC (Kinex HILIC, Phenomenex, Torrance, USA), długości 50 mm, średnicy wewnętrznej 4,6 mm i wielkości ziarna wypełnienia 2,6 μm . Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i roztworu mrówczanu amonu o stężeniu 10 mM, pH = 3 (55:45, v/v). W celu przygotowania roztworu, odważono 315,3 mg mrówczanu amonu, rozpuszczono w niewielkiej ilości wody dejonizowanej i za pomocą kwasu mrówkowego doprowadzono do pH = 3 (pehametr pH 211, Hanna Instruments, Bedfordshire, Wielka Brytania). Uzyskany roztwór przeniesiono do kolby miarowej i uzupełniono wodą do 500 ml, a następnie przefiltrowano przy użyciu pompy próżniowej (typ RZ-2, Vaccumbrand, Wertheim, Niemcy) i sączków o średnicy porów 0,45 μm . Gotową fazę ruchomą wstępnie odgazowano w łaźni ultradźwiękowej (Polsonic, Warszawa, Polska). Przepływ fazy ruchomej ustalono na 0,5 ml/min. Temperatura termostatu kolumny wynosiła 35°C a objętość nastrzyku próbki – 1 μl . Czas pojedynczej analizy chromatograficznej wynosił 2,5 minuty.

Detekcja trygoneliny oraz jej deuterowanego odpowiednika przeprowadzona została przy użyciu spektrometrii mas z elektrorozpylaniem (ang. *Electrospray*

Ionisation – ESI), w trybie jonizacji dodatniej. W celu ilościowego oznaczenia analitów, informacje zbierano w trybie monitorowania wielu reakcji (ang. *Multiple Reaction Monitoring* – MRM). Optymalne warunki jonizacji i fragmentacji analitów ustalone zostały przy zastosowaniu oprogramowania MassHunter Optimizer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Parametry te zostały przedstawione w Tabeli 2.

Tabela 2. Parametry analizatora podczas pracy w trybie MRM.

Parametr	Trygonelina	Deuterowana trygonelina
Jon prekursorowy	138 m/z	141 m/z
Jony potomne	92 m/z (ilościowy)	95 m/z
	94 m/z (jakościowy)	-
Napięcie fragmentora	125 V	145 V
Energia celi kolizyjnej	25 V (jon ilościowy)	22 V
	20 V (jon jakościowy)	-

W celu przeprowadzenia analizy konieczne było również zdefiniowanie parametrów źródła jonów, które zostały ustalone jako następujące: przepływ gazu suszącego 11 l/min, ciśnienie rozpylacza 40 psi, temperatura gazu suszącego 250°C, napięcie na kapilarze 2000 V. Zbiórka danych oraz analiza jakościowa i ilościowa zostały przeprowadzone przy użyciu pakietu programów Agilent Qualitative MassHunter Workstation (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), w skład którego wchodziły: LC/MS Data Acquisition for 6400 Series Triple Quadrupole version B.07.01, Qualitative Analysis version B.06.0 oraz Quantitative Analysis for QQQ version B.07.00.

3.3.3. Przygotowanie roztworów kontrolnych do procesu walidacji

W celu wykonania krzywej kalibracyjnej oraz przeprowadzenia procesu walidacji, niezbędne było przygotowanie wzorcowych roztworów o określonych stężeniach, a także próbek kontroli jakości (ang. *Quality Control* – QC) dla trygoneliny oraz wzorca wewnętrznego. Aby zachować jak największą powtarzalność, wszystkie roztwory zostały przygotowane z jednego roztworu wyjściowego o stężeniu 400 µg/ml. W celu jego sporządzenia odważono 5,06 mg chlorowodoru TRG i rozpuszczono w mieszaninie acetonitrylu i wody (50:50, v/v). Roztwór wyjściowy wzorca wewnętrznego o takim samym stężeniu przygotowano rozpuszczając 1,59 mg jodowodoru D3-TRG w 2 ml mieszaniny acetonitrylu i wody (50:50, v/v). Z roztworów tych poprzez odpowiednie rozcieńczanie przygotowano roztwory robocze o stężeniu 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0 oraz 25,0 µg/ml, jak również roztwory QC na trzech poziomach stężeń: niskim (ang. *Low Quality Control* – LQC, 2,0 µg/ml), średnim (ang. *Medium Quality Control* – MQC, 8,0 µg/ml) i wysokim (ang. *High Quality Control* – HQC, 20,0 µg/ml). Wszystkie roztwory wzorcowe przechowywane były w temperaturze -20°C i przed użyciem rozmrażane w temperaturze pokojowej.

Do przeprowadzenia walidacji niezbędne było przygotowanie krzywej kalibracyjnej. W tym celu z roztworów roboczych przygotowano próbki kalibracyjne TRG. Do każdej próbki zawierającej 970 µl acetonitrylu dodano 20 µl roztworu D3-TRG o stężeniu 5,0 µg/ml (wzorzec wewnętrzny, ang. *Internal Standard* – IS) oraz 10 µl odpowiedniego roztworu roboczego, wymieszano (wirówka jednopunktowa Yellowline TTS2, Ika Works, Inc., Wilmington, USA) i przefiltrowano przez filtr nylonowy o średnicy porów 0,22 µm. Otrzymano w ten sposób roztwory o stężeniu 5, 10, 25, 50, 100, 150 i 250 ng/ml trygoneliny. W analogiczny sposób przygotowano próbki QC, uzyskując stężenia: 20 ng/ml (LQC), 80 ng/ml (MQC) oraz 200 ng/ml (HQC). Stężenie wzorca wewnętrznego było takie samo w każdej próbce i wynosiło 50 ng/ml.

3.3.4. Walidacja opracowanej metody analitycznej

Proces walidacji polegał na przeprowadzeniu szeregu testów, których celem było potwierdzenie jakości metody analitycznej. W związku z zanieczyszczeniem matrycy przy stukrotnym rozcieńczeniu próbki surowicy, liniowość, precyzja, dokładność oraz testy stabilności wykonane zostały przy użyciu roztworów

wzorcowych. Ocena efektu matrycy, odzysku i efektywności procesu przygotowania próbki dokonana została w oparciu o analizy przeprowadzone z użyciem D3-TRG ze względu na występowanie trygoneliny w próbkach tkanek pozyskanych od myszy.

Krzywa kalibracyjna została przygotowana w oparciu o stosunek pól powierzchni pików wzorca wewnętrznego i trygoneliny na każdym z siedmiu poziomów stężeń: 5,0, 10,0, 25,0, 50,0, 100,0, 150,0 i 250,0 ng/ml. Dla każdego stężenia przygotowane zostały trzy powtórzenia. Roztwory kalibracyjne przygotowywane były *de novo* każdego dnia analizy. Wyznaczenie granicy wykrywalności (LOD) oraz granicy oznaczalności (LLOQ) opierało się na stosunku wysokości pików do szumu (S/N) równym 3 dla LOD oraz 10 dla LLOQ.

Opierając się na próbkach odpowiadających LLOQ, LQC, MQC oraz HQC wyznaczona została precyzja i dokładność. Zmienność obu parametrów została oceniona zarówno w ciągu jednego dnia, jak również pomiędzy kolejnymi dniami walidacji. Powtarzalność, czyli precyzja w danym dniu pracy została obliczona na podstawie współczynnika zmienności (ang. *Coefficient of Variation* – CV) dla sześciu pomiarów przeprowadzonych tego samego dnia. Powtarzalność pomiędzy różnymi dniami została obliczona jako średnia wyników z poszczególnych dni. Zgodnie z wytycznymi FDA, współczynnik zmienności nie powinien przekraczać 15%, a dla LLOQ – 20%. W celu obliczenia współczynnika zmienności, należy wyznaczyć odchylenie standardowe wyników zgodnie ze wzorem:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{\bar{r}})^2}{n-1}}$$

gdzie wyrażenie $(x_i - x_{\bar{r}})$ oznacza różnicę pomiędzy wartością danej cechy (np. stężenia) a wartością średnią tej cechy. Następnie należy wyznaczyć względne odchylenie standardowe (ang. *Relative Standard Deviation* – RSD), dzieląc wartość s przez wartość średnią. Współczynnik zmienności wyznacza się mnożąc wartość RSD przez 100%. Dokładność wyznaczana jest na podstawie stosunku wartości zmierzonego stężenia do nominalnej wartości stężenia danej próbki pomnożonej przez 100%. Średnia dokładność w ciągu dnia i pomiędzy dniami powinna mieścić się w granicach 85 – 115%, a dla LLOQ nie powinna przekraczać zakresu 80 – 120% [151, 152].

Do wyznaczenia efektu matrycy (ang. *Matrix Effect* – ME) w przypadku próbek surowicy posłużono się dwiema metodami, opisanymi szczegółowo w literaturze [159, 160]. Polegały one na porównaniu parametrów krzywych przygotowanych z roztworów wzorcowych oraz próbek surowicy, a także na niezależnym porównaniu pól powierzchni pików w próbkach kontrolnych, korzystając z odpowiedniego wzoru. W związku z obecnością trygoneliny w surowicy krwi mysiej, wszystkie oznaczenia zostały przeprowadzone z użyciem D3-TRG. Jednocześnie z efektem matrycy wyznaczony został odzysk metody (ang. *Recovery* – RE) oraz efektywność procesu przygotowania próbki (ang. *Process Efficiency* – PE). Krzywe zostały wykreślone na podstawie pól powierzchni pików uzyskanych z analizy roztworów próbek kontrolnych (LQC, MQC, HQC). Roztwory te przygotowano poprzez dodanie 10 µl roztworu D3-TRG o odpowiednim stężeniu (2,0, 8,0, lub 20,0 µg/ml) do 990 µl acetonitrylu lub dodaniu takiej samej ilości roztworu D3-TRG oraz 10 µl surowicy krwi mysiej do 980 µl acetonitrylu. Próbkę zostały następnie wymieszane i przefiltrowane, a w przypadku próbek surowicy zostały one dodatkowo odwirowane (15 minut, 4000 rpm, wirówka laboratoryjna Microfuge 16, Beckman Coulter, INC., Fullerton, USA) przed filtracją. Każda próbka została przygotowana w trzech powtórzeniach. Dodatkowo, przygotowano po 5 dodatkowych powtórzeń próbek kontrolnych, z których każda wykonana została w trzech wariantach:

- A: 10 µl roztworu D3-TRG o stężeniu 2,0, 8,0 lub 20,0 µg/ml dodano do 990 µl acetonitrylu, wymieszano i przefiltrowano;
- B: 10 µl surowicy zostało dodane do 980 µl acetonitrylu, wymieszane, odwirowane i przefiltrowane; następnie dodano do próbki 10 µl roztworu D3-TRG o odpowiednim stężeniu;
- C: 10 µl surowicy oraz 10 µl roztworu D3-TRG o odpowiednim stężeniu zostało dodane do 980 µl acetonitrylu, próbkę wymieszano, odwirowano i przefiltrowano.

W celu obliczenia ME, RE oraz PE, użyto następujących zależności [161]:

$$- ME = \left(\frac{B}{A} - 1 \right) \times 100 \%$$

$$- RE = \frac{C}{B} \times 100 \%$$

$$- PE = \frac{C}{A} \times 100 \%$$

Litery A, B i C odpowiadają opisanym powyżej roztworom próbek kontrolnych. Do wyznaczenia wartości efektu matrycy na podstawie krzywych kalibracyjnych, porównane zostały współczynniki a i b krzywej regresji, czyli nachylenie i punkt przecięcia z osią OY. Współczynniki te zostały porównane statystycznie przy użyciu testu F w programie GraphPad Prism (v. 5.04, GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA).

Ocena efektu matrycy, odzysku oraz efektywności procesu przygotowania próbek mózgu wykonana została w sposób analogiczny do opisanego powyżej, przy czym zastosowano jedynie metodę porównania pól powierzchni pików w próbkach kontrolnych. W celu przygotowania odpowiednich próbek kontrolnych, zamrożony mózg został podzielony na półkule, z których jedna została zachowana do dalszych analiz, druga natomiast została umieszczona w wytarowanej próbówce i zważona. W trakcie przygotowywania próbki, mózg zhomogenizowano przy użyciu homogenizatora tkankowego (model D-160, Dragonlab, Józefów, Polska) i odwirowano (10 minut, 12000 rpm, wirówka laboratoryjna Microfuge 16, Beckman Coulter, INC., Fullerton, USA). Roztwory A, B i C zostały przygotowane analogicznie jak w przypadku surowicy.

Badania stabilności przeprowadzone zostały na próbkach kontrolnych po 24 godzinach przechowywania w temperaturze 4°C (odzworowanie warunków w autosamplerze podczas analizy), podczas przechowywania w temperaturze pokojowej, wykonano również analizę wpływu zamrażania w temperaturze -20°C i rozmrażania. Próbki LQC, MQC i HQC zostały przygotowane w sposób opisany wcześniej dla roztworów wzorcowych. Stabilność w temperaturze pokojowej oraz w 4°C oceniona została na podstawie porównania średnich wartości stężeń w punkcie „0” oraz po 5 lub 24 godzinach. Do badania zamrażania-rozmrażania, przygotowano po 12 próbek LQC oraz HQC. Po trzy próbki z obu poziomów zostały poddane analizie bezpośrednio po przygotowaniu, pozostałe zostały natychmiast zamrożone w temperaturze -20°C. Po 12 godzinach 3 próbki LQC oraz 3 HQC zostały wyjęte i rozmrożone w temperaturze pokojowej, po czym poddano je analizie. Test powtórzono po kolejnych 12 oraz 24 godzinach. Ocena trwałości została oparta na porównaniu średnich stężeń próbek.

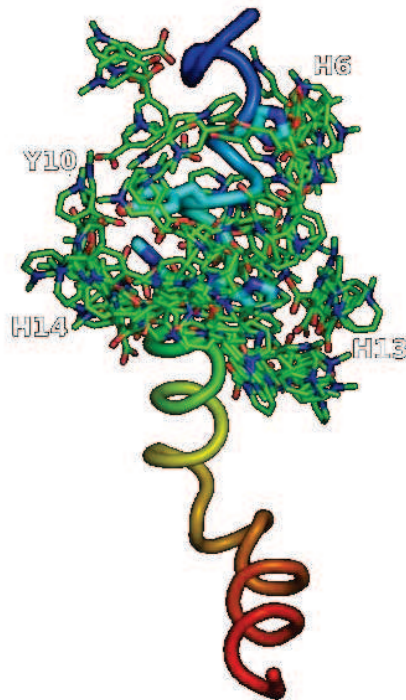
3.3.5. Wyznaczenie parametrów farmakokinetycznych trygoneliny oraz ocena penetracji do ośrodkowego układu nerwowego

Eksperyment farmakokinetyczny przeprowadzony został na podstawie zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach nr 3 w Gdańsku (uchwała nr 51/2012). Do doświadczeń wykorzystano 27 samców myszy szczepu C57BL/6. Zwierzęta przechowywane były w pomieszczeniu zapewniającym odpowiednią wilgotność i temperaturę oraz z regulowanym cyklem świetlnym. Miały też nieograniczony dostęp do wody i pokarmu. Średnia waga zwierząt w trakcie trwania doświadczeń wynosiła 28 g. Roztwór chlorowodoru trygoneliny, przygotowany przez rozpuszczenie substancji w PBS, został następnie przefiltrowany przez jałowy filtr membranowy o średnicy porów 0,22 μm . Mysz przed podaniem TRG została unieruchomiona w dostosowanym do jej rozmiarów poskramiaczu (AnimaLab, Poznań, Polska). W celu rozszerzenia naczyń krwionośnych ogona i ułatwienia dostępu do żyły ogon został zanurzony w ciepłej wodzie. 24 myszy otrzymały chlorowodorek trygoneliny w dawce 10 mg/kg, trzy myszy posłużyły jako punkt „0” i nie otrzymały iniekcji. Próbkę krwi oraz mózgi pobierane były w czasie 0,05, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 oraz 12 godzin od podania związku. Na każdy punkt czasowy przeznaczone zostały trzy myszy. Krew pobierano poprzez punkcję serca. W tym celu mysz została uszponowana za pomocą ketaminy i ksylazyny (50 + 5 mg/kg). Po stwierdzeniu braku reakcji na bodźce bólowe, w określonym punkcie czasowym klatka piersiowa myszy została otwarta i pobrano krew z komór serca. Bezpośrednio po pobraniu krwi mysz została zdekapitowana i wypreparowano mózg. Uzyskana próbka krwi została odstawiona do pojemnika z lodem na czas wystarczający do wytworzenia skrzepu. Następnie próbkę odwirowano (10 minut, 8000 rpm, wirówka laboratoryjna Microfuge 16, Beckman Coulter, INC., Fullerton, USA) i oddzielono surowicę. Mózg został trzykrotnie przepłukany zimnym 0,9% roztworem chlorku sodu. Obie tkanki zamrożono w temperaturze -80°C i przechowywano do czasu dalszej analizy. Parametry farmakokinetyczne wyznaczone zostały za pomocą analizy niekompartmentalnej przy użyciu programu Kinetica (v. 5.0, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

4. WYNIKI

4.1. Dokowanie trygoneliny oraz innych pochodnych alkaloidów pirydynowych do cząsteczki β -amyloidu

Celem przeprowadzonego dokowania molekularnego była ocena zdolności grupy związków, analogów trygoneliny, do wiązania się z cząsteczką β -amyloidu w miejscach, których zablokowanie mogłoby zahamować proces przechodzenia rozpuszczalnych monomerów o strukturze α -helisy w większe agregaty. Wykazano, że zarówno trygonelina, jak i inne badane związki mogą wchodzić w interakcje z resztami aminokwasowymi uznanymi za kluczowe w procesie agregacji – histydyną w pozycji 6, 13 i 14 oraz tyroziną w pozycji 10. Graficzne przedstawienie okupowania rejonu wymienionych powyżej reszt aminokwasowych przez cząsteczki trygoneliny przedstawiono na rysunku 9.



Rysunek 9. Umieszczenie cząsteczek trygoneliny wokół cząsteczki β -amyloidu. H6, H13, H14 – reszty histydyny, Y10 – reszta tyrozyny.

W Tabeli 3 zestawiono wyniki modelowania wyrażone jako procentowy udział lokowania się w danym rejonie cząsteczki A β ₁₋₄₂. Wyniki dotyczące trygoneliny zostały opublikowane niezależnie [158]

Tabela 3. Zestawienie wyników dokowania do cząsteczki β -amyloidu 1-42.

Lp.	Nazwa	His13	His14	Uwagi
1	Chlorowodorek trygoneliny	38%	6%	-
2	Jodek 1-etylo-4-(metoksykarbonylo)pirydyniowy	48%	18%	Niespecyficzny
3	Jodek 3-acetylo-1-metylopirydyniowy	22%	29%	Niespecyficzny
4	Bromek 2-(1-hydroksyetylo)-1-metylopirydyniowy	R – 16% S – 25%	R – 41% S – 38%	Niespecyficzny
5	Bromek 1-metylo-2-(2-oksypropylo)-pirydyniowy	-	-	Błąd podczas liczenia
6	Bromek 1-metoksykarbonylo-3-metylopirydyniowy	26%	32%	Niespecyficzny
7	Chlorek 1-(2-amino-2-oksoetylo)-pirydyniowy	36%	26%	Niespecyficzny
8	Chlorek 1-(3-amino-3-oksopropylo)-pirydyniowy	38%	25%	Niespecyficzny
9	Chlorek 1-(2-etoksy-2-oksoetylo)-pirydyniowy	45%	25%	Niespecyficzny
10	Chlorek 1-heksadecylopirydyniowy	82%	22%	Niespecyficzny
11	Bromek 1-heptylo-4-(4-pirydylo)-pirydyniowy	81%	25%	-
12	Chlorek 1-(4-pirydylo)-pirydyniowy	-	-	Błąd podczas optymalizacji
13	Tetrafluoroboran 2-bromo-1-etylo-pirydylowy	43%	27%	Niespecyficzny
14	Jodek 1-[2-okso-2-(2-pirydynylo)-etylo]-pirydyniowy	59%	16%	Niespecyficzny
15	Chlorek 2-amino-1-benzylo-pirydylowy	46%	26%	Niespecyficzny
16	Chlorek 1-[2-[(2-izopropylo-5-metylocykloheksylo)-oksy]-2-oksoetylo]-pirydyniowy	28%	41%	-
17	Bromek 1-(1-okso-1-fenylpropan-2-ylo)-pirydyniowy	R – 29% S – 34%	R – 27% S – 29%	-
18	Bromek 1-(2-(3-metoksyfenylo)-2-oksoetylo)-pirydyniowy	36%	51%	-
19	Bromek 2-amino-1-(2-okso-2-fenyletylo)-pirydyniowy	36%	32%	-
20	Bromek 1-benzylo-1-metylo-4-etoksykarbonylo-1,2,3,6-tetrahydro-pirydylowy	34%	35%	-

Tabela 3 – ciąg dalszy.

21	3-(1-pirydino)-1-propanosulfonian	-	-	Błąd podczas optymalizacji
22	Chlorek 1,1'-(etylenodisulfonyldietyleno)-bis-pirydyniowy	76%	14%	-
23	Jodek 1,1'-(heksano-1,6-diylo)-bis[3-(2-hydroksyetylokarbamoilo)-pirydyniowy]	74%	21%	Niespecyficzny
24	Jodek 1-(4'-dodecylofenacylo)-pirydyniowy	84%	20%	Niespecyficzny
25	Bromek 4-(4-dietyloaminofenylazo)-1-(4-nitrobenzylo)-pirydyniowy	91%	30%	-

4.2. Ocena cytotoksyczności wybranych związków

Z grupy potencjalnych ligandów, dla których wykonano modelowanie molekularne wytypowano siedem związków i oceniono ich cytotoksyczność na czterech poziomach stężeń: 0,1 μM , 1 μM , 10 μM i 100 μM . Żywotność komórek oceniano testem pobierania czerwieni obojętnej. Dwa spośród badanych związków nie miały wpływu na żywotność w całym zakresie badanych stężeń – chlorowoderek trygoneliny (związek nr 1) oraz bromek 1-heptylo-4-(4-pirydylo)-pirydyniowy (związek nr 11). Jeden związek, chlorek 1,1'-(etylenodisulfonyldietyleno)-bis-pirydyniowy (związek nr 22), wykazał istotną toksyczność w stężeniach przekraczających 1 μM . Wyznaczone dla tego związku średnie EC_{50} wynosiło $3,257 \pm 2,255 \mu\text{M}$. Dla pozostałych substancji wykazano średni spadek żywotności nieprzekraczający 20% przy najwyższym badanym stężeniu (średnia z trzech dni doświadczeń), niemożliwe jednak było wyznaczenie wartości EC_{50} . Wyniki pomiarów żywotności dla całej grupy związków przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Średnia żywotność komórek SH-SY5Y po 24 godzinach inkubacji z badanymi związkami (dane wyrażone jako procent żywych komórek w stosunku do kontroli równej 100%).

Związek (nr w tabeli 1)	C [μM]	Dzień I		Dzień II		Dzień III		ogółem	
		średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD
Chlorowodorek trygoneliny (1)	0,1	104,35	2,82	102,36	1,76	97,33	3,34	101,35	3,92
	1	103,26	2,49	97,64	2,55	94,12	1,85	98,34	4,47
	10	100,54	5,73	102,36	5,27	95,19	4,04	99,37	5,44
	100	102,72	5,65	98,31	8,84	99,47	4,24	100,16	5,99
Bromek 1-heptylo-4-(4-pirydylo)-pirydyniowy (11)	0,1	115,22	4,71	105,41	4,05	94,65	5,78	105,09	9,87
	1	116,85	5,24	132,09	51,65	83,96	2,45	110,97	33,61
	10	113,59	7,35	108,11	2,55	86,10	4,04	102,60	13,34
	100	116,30	4,10	108,45	16,75	88,24	5,56	104,33	15,47
Bromek 1-(2-(3-metoksyfenylo)-2-oksoetylo)-pirydyniowy (18)	0,1	115,22	3,76	105,41	5,07	95,72	4,63	105,45	9,31
	1	115,22	6,17	107,09	3,10	97,86	10,52	106,72	9,81
	10	108,15	6,79	101,69	11,83	91,44	6,42	100,43	10,49
	100	95,65	6,59	109,12	2,11	90,37	6,07	98,38	9,55
Bromek 2-amino-1-(2-okso-2-fenyloetylo)-pirydyniowy (19)	0,1	92,39	5,73	100,68	2,55	94,12	3,34	95,73	5,19
	1	98,37	3,39	101,69	8,44	94,12	4,04	98,06	5,96
	10	99,46	2,82	97,97	5,76	94,65	4,24	97,36	4,40
	100	103,26	4,71	93,92	4,79	87,17	4,04	94,78	8,02
Bromek 1-benzylo-1-metylo-4-etoksykarbonylo-1,2,3,6-tetrahydro-pirydyniowy (20)	0,1	105,44	5,24	116,22	10,40	91,98	8,07	104,54	12,68
	1	104,89	24,96	106,08	1,55	90,91	6,48	100,63	14,84
	10	109,78	4,98	104,39	6,33	96,26	5,78	103,48	7,70
	100	113,04	16,09	109,80	4,22	89,30	6,68	104,05	14,30
Chlorek 1,1'-(etylenodisulfonylodietyleno)-bis-pirydyniowy (22)	0,1	107,07	10,61	101,01	5,00	102,14	5,63	103,41	7,08
	1	92,94	3,26	93,24	2,03	54,01	1,85	80,06	19,66
	10	18,48	0,94	36,82	1,55	20,32	0,93	25,21	8,81
	100	13,04	0,00	24,66	19,92	18,72	0,93	18,81	11,17
Bromek 4-(4-dietyloaminofenylazo)-1-(4-nitrobenzylo)-pirydyniowy (25)	0,1	101,63	4,98	92,57	7,19	92,51	3,34	95,57	6,52
	1	96,74	0,94	93,58	2,11	102,14	5,16	97,49	4,69
	10	103,80	12,02	97,64	3,56	104,28	2,78	101,91	7,18
	100	72,28	14,24	102,70	13,38	91,44	3,21	88,81	16,60

4.3. Walidacja metody analitycznej oraz wyznaczenie parametrów farmakokinetycznych dla chlorowodoru trygoneliny

Opracowana metoda charakteryzowała się liniowością w zakresie od 5 do 250 ng/ml przy wartościach LOD oraz LLOQ równych odpowiednio 1,5 i 5 ng/ml. LLOQ odpowiada stężeniu, dla którego współczynnik S/N osiąga wartość o najmniej 10.

W przypadku analizowanej metody punkt ten pokrywa się z najniższym poziomem krzywej kalibracyjnej.

Na tej podstawie obliczono LOD według następującej zależności:

$$LOD = \frac{3 \times LLOQ}{10}$$

Krzywa kalibracyjna przygotowywana była *de novo* każdego dnia walidacji. Każdorazowo wyznaczone zostało równanie regresji opisujące krzywą, obliczono również średnią wartość oraz odchylenie standardowe dla współczynnika kierunkowego, wyrazu wolnego oraz współczynnika determinacji. Wyniki przedstawione zostały w tabeli 5.

Tabela 5. Parametry krzywych kalibracyjnych z trzech dni walidacji.

	Równanie regresji	Współczynnik kierunkowy	Wyraz wolny	Współczynnik determinacji
Dzień 1	y=0,778491x+0,004944	0,778491	0,004944	0,9989
Dzień 2	y=0,626794x+0,007338	0,626794	0,007338	0,9991
Dzień 3	y=0,824683+0,003877	0,824683	0,003877	0,9994
Średnia	-	0,743323	0,005386	0,9991
Odchylenie standardowe	-	0,103526	0,001772	0,0003

Precyzja i dokładność obliczone zostały na podstawie analizy sześciu powtórzeń próbek kontrolnych na trzech poziomach stężeń (LQC – 20 ng/ml, MQC – 80 ng/ml, HQC – 200 ng/ml) oraz próbki LLQC (5 ng/ml). Ocenie poddane zostały średnie wartości dokładności pomiaru oraz charakteryzujące precyzję współczynniki zmienności. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w tabeli 6.

Tabela 6. Wyniki oceny dokładności i precyzji walidowanej metody.

Dokładność								
	Dzień I		Dzień II		Dzień III		Dokładność pomiędzy dniami	
	średnia dokładność [%]		średnia dokładność [%]		średnia dokładność [%]		średnia dokładność [%]	
LLOQ	89,86		88,77		94,11		91,71	
LQC	100,14		102,98		101,47		101,53	
MQC	101,59		102,51		97,8		100,63	
HQC	101,35		103,31		101,5		102,05	
Precyzja								
	Dzień I		Dzień II		Dzień III		Precyzja pomiędzy dniami	
	średnie stężenie [ng/ml]	CV [%]	średnie stężenie [ng/ml]	CV [%]	średnie stężenie [ng/ml]	CV [%]	średnie stężenie [ng/ml]	CV [%]
LLOQ	4,49	4,01	4,44	8,59	4,71	5,03	4,59	5,93
LQC	20,03	3,65	20,6	6,04	20,29	2,62	20,31	4,27
MQC	81,27	4,67	82,01	1,78	78,24	3,66	80,51	3,95
HQC	202,7	3,53	206,62	1,76	203	3,13	204,11	2,86

Efekt matrycy dla próbek surowicy oceniany był na dwa sposoby. W pierwszej metodzie zastosowano porównanie parametrów krzywych kalibracyjnych opartych na analizie próbek kontrolnych surowicy mysiej oraz roztworów wzorcowych. Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy zarówno dla nachylenia krzywych ($p = 0,2526$, $F = 1,3687$), jak i dla punktu przecięcia z osią OY ($p = 0,1201$, $F = 2,5762$). Druga metoda polegała na porównaniu pól powierzchni pików chromatograficznych odpowiadających próbkom kontrolnym roztworów wzorcowych oraz surowicy mysiej. Średnia różnica wynosiła -3,35%, co potwierdziło zaniedbywalny wpływ efektu matrycy na wyniki pomiarów. Szczegółowe rezultaty przedstawione zostały w tabeli 7.

Tabela 7. Wyniki oceny efektu matrycy na podstawie porównania próbek kontrolnych.

	LQC	MQC	HQC
Roztwór wzorcowy (A)	286,14	1077,46	2676,61
Surowica (B)	269,25	1062,60	2602,73
Efekt matrycy [%]	-5,90	-1,38	-2,76

Efekt matrycy dla próbek mózgu oceniany był na podstawie analizy pola powierzchni pików D3-TRG w LQC oraz HQC. Wyniki zebrane zostały w tabeli 8.

Tabela 8. Wyniki oceny efektu matrycy dla mózgu na podstawie porównania próbek kontrolnych.

	LQC	HQC
Roztwór wzorcowy (A)	292,11	2400,92
Mózg (B)	281,79	1623,82
Efekt matrycy [%]	-3,53	-32,37

Odzysk metody oraz efektywność procesu przygotowania próbki ocenione zostały na podstawie porównania pól powierzchni pików uzyskanych z analizy próbek kontrolnych surowicy mysiej wzbogaconych D3-TRG przed i po ekstrakcji oraz roztworu wzorcowego. Średni odzysk wynosił 81,8% z odchyleniem standardowym na poziomie 4,7%, natomiast średnia efektywność metody 78,4% ± 4,8%. Dla próbek mózgu średni odzysk wyniósł 123,59% ± 18,37%, natomiast efektywność metody 99,53% ± 10,13%. Szczegółowe wyniki zostały zaprezentowane w tabeli 9.

Tabela 9. Wyniki oceny odzysku analitu z próbki oraz efektywności procesu przygotowania próbki.

	LQC	MQC	HQC
Surowica			
Roztwór wzorcowy (A)	286,10	1077,60	2676,60
Wzbogacenie po ekstrakcji (B)	275,47	1052,82	2505,72
Wzbogacenie przed ekstrakcją (C)	239,91	822,48	2009,28
RE [%]	87,09	78,12	80,19
PE [%]	83,85	76,33	75,07
Mózg			
Roztwór wzorcowy (A)	292,11	-	2400,92
Wzbogacenie po ekstrakcji (B)	281,79	-	1623,82
Wzbogacenie przed ekstrakcją (C)	311,67	-	2217,76
RE [%]	110,60	-	136,58
PE [%]	106,70	-	92,37

Ostatnim parametrem, który został poddany ocenie była stabilność roztworów wzorcowych podczas przechowywania. W tym celu porównano stężenia próbek kontrolnych natychmiast po przygotowaniu oraz w określonych punktach końcowych, jak również podczas

cykli zamrażania i rozmrażania. Wykazano, że badane roztwory są stabilne w warunkach eksperymentalnych. Szczegółowe wyniki stabilności podczas przechowywania zostały zestawione w tabeli 10, natomiast wyniki testu zamrażania i rozmrażania przedstawiono w tabeli 11.

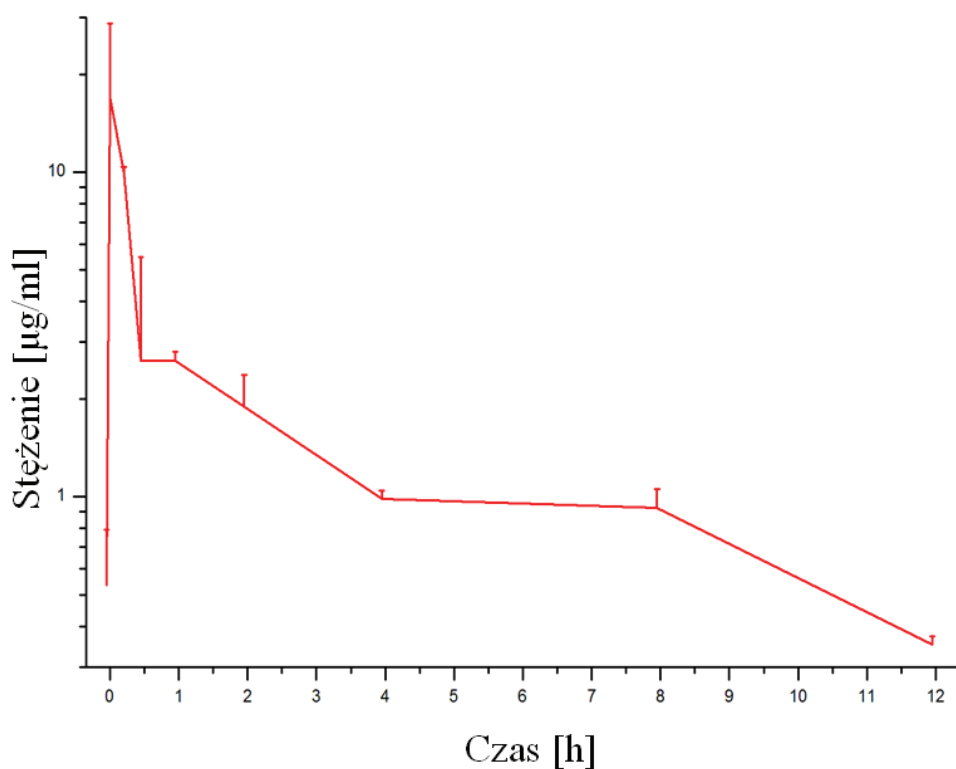
Tabela 10. Wyniki badania stabilności podczas przechowywania w temperaturze pokojowej oraz w autosamplerze.

Przechowywanie w temperaturze pokojowej		
	Oznaczone stężenie (ng/ml)	
	Czas	
	0h	5h (% stabilności)
LQC	18,6	19,5 (104,8)
MQC	74,3	73,0 (98,2)
HQC	191,3	183,5 (95,9)
Przechowywanie w autosamplerze (4°C)		
	Oznaczone stężenie (ng/ml)	
	Czas	
	0h	24h (% stabilności)
LQC	20,0	18,2 (90,8)
MQC	81,3	79,8 (98,2)
HQC	202,7	208,4 (102,8)

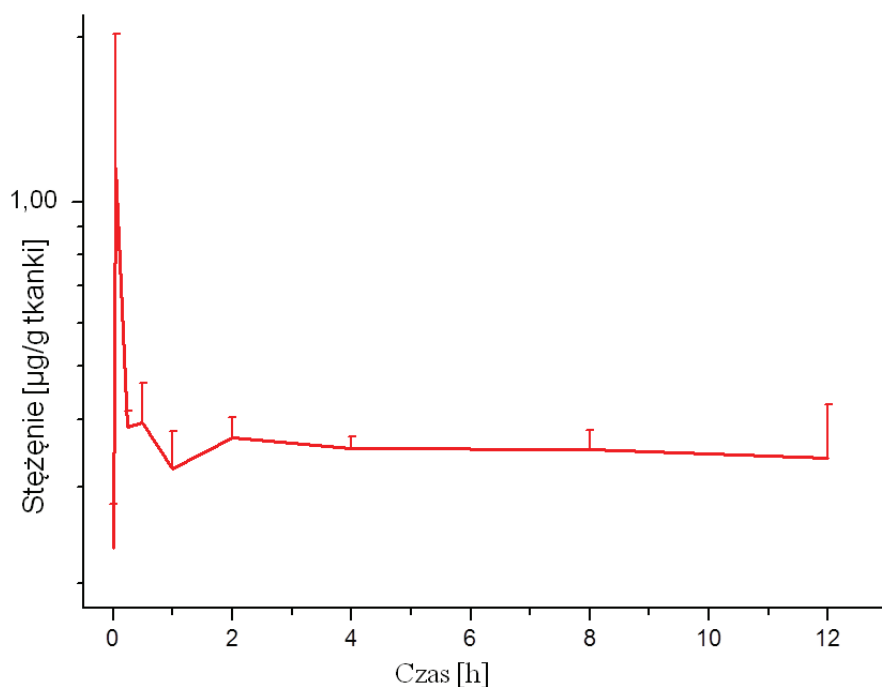
Tabela 11. Wyniki testu zamrażania – rozmrażania.

	Oznaczone stężenie (ng/ml)			
	Czas			
	0h	12h (% stabilności)	24h (% stabilności)	36h (% stabilności)
LQC	26,8	26,7 (99,8)	28,9 (107,8)	29,9 (111,8)
HQC	222,0	225,6 (101,6)	226,3 (102,0)	224,2 (101,0)

Zwalidowana metoda została wykorzystana do wyznaczenia profilu zmian stężenia trygoneliny w surowicy krwi mysiej (rys. 10) oraz w mózgu (rys. 11) po dożylnym podaniu chlorowodoru trygoneliny w dawce 10 mg/kg. Na podstawie uzyskanych danych wykonano również analizę niekompartmentalną, co pozwoliło na wyznaczenie podstawowych parametrów farmakokinetycznych. Stężenie TRG zmierzone w 5 minucie od podania wynosiło $17,80 \mu\text{g/ml} \pm 11,66 \mu\text{g/ml}$. Pole powierzchni pod krzywą stężenie-czas (AUC) wyniosło $20,646 \text{ h}\cdot\mu\text{g/ml}$, natomiast biologiczny okres półtrwania i stała szybkości eliminacji wynosiły odpowiednio 3,48 h oraz $0,213 \text{ h}^{-1}$. Najwyższe stężenie w mózgu zostało oznaczone w 5 minucie po podaniu i wynosiło $1,15 \mu\text{g/g tkanki} \pm 0,87 \mu\text{g/g tkanki}$.



Rysunek 10. Wykres zależności stężenia trygoneliny w surowicy od czasu.



Rysunek 11. Profil zmian stężenia trygoneliny w preparatach mózgu.

Profile stężeń na rys. 10 i 11 wskazują na szybką eliminację trygoneliny z organizmu. Wydaje się, że wzrost stężenia TRG w pierwszym okresie po podaniu dożylnym, następujący od niskich wartości do pikę po około 5 minutach od podania, wynika z fazy mieszania się związku z krwią zanim równomiernie wymieszana w całej objętości krwi trygonelina dotrze do serca, skąd pobierana jest krew do oznaczeń. Niezerowy poziom TRG w mózgu po 1 godzinie od podania może wynikać z podaży małych ilości substancji w paszy dla zwierząt laboratoryjnych.

Zakładając, że krew stanowi około 20% masy preparatów mózgu, można na podstawie oznaczonego stężenia po 5 minutach od podania, wyliczyć logarytm stosunku stężeń TRG w mózgu i krwi ($\log BB$). Wynosi on $-1,22$. Jest to wartość niższa niż spotykana u leków działających ośrodkowo [162].

5. DYSKUSJA WYNIKÓW I WNIOSKI

Od wielu lat prowadzone są intensywne poszukiwania skutecznych leków modyfikujących przebieg choroby Alzheimera. Źródeł nowych struktur poszukuje się zarówno wśród leków, które obecnie są stosowane w terapii innych chorób, jak i pośród surowców pochodzenia naturalnego. Przewagą pierwszego podejścia jest brak konieczności przeprowadzania pełnych badań klinicznych, co może skrócić czas potrzebny na wprowadzenie leku do terapii AD. Niestety, do tej pory nie udało się potwierdzić istotnej poprawy stanu pacjentów leczonych za pomocą obecnych na rynku statyn, leków przeciwzapalnych czy przeciwcukrzycowych. Z drugiej strony, znalezienie lub stworzenie zupełnie nowej cząsteczki daje szansę na ukierunkowanie jej aktywności przeciwko różnym patomechanizmom choroby Alzheimera. Poszukiwania takie są jednak bardziej skomplikowane i wymagają zaangażowania większej ilości środków oraz czasu. Konieczne jest potwierdzenie bezpieczeństwa projektowanego leku, poznanie jego właściwości farmakokinetycznych i ostatecznie udowodnienie wartości klinicznej.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było podjęcie próby wyznaczenia parametrów biochemicznych oraz fizykochemicznych dla trygoneliny i grupy związków pochodnych, które mogłyby być interesujące z punktu widzenia terapii choroby Alzheimera. Założono, że trygonelina, alkaloid pirydynowy występujący obficie w nasionach kozieradki, przyprawie „curry” oraz ziarnach kawy, mogłaby stanowić strukturę wyjściową, tak zwany „*lead compound*”, do poszukiwań potencjalnych środków antyneurodegeneracyjnych. Związek ten, będąc jednym z najobficiej występujących alkaloidów w codziennej diecie, uważany jest za jeden z czynników hamujących procesy starcze w mózgu [137, 138]. Niestety, wiele doniesień na ten temat ma charakter tak zwanej „medycyny anegdotycznej”. Wciąż nieliczne są rzetelne naukowo doniesienia na temat mechanizmu działania oraz właściwości farmakokinetycznych trygoneliny.

Mając na uwadze opisane uprzednio specyficzne cechy strukturalne trygoneliny oraz innych alkaloidów o zbliżonej budowie, stworzony został katalog dwudziestu pięciu pochodnych pirydyniowych, które poddane zostały wstępnym badaniom *in silico* w ramach niniejszej pracy. Wyboru dokonano spośród komercyjnie dostępnych odczynników, za kryterium wyjściowe przyjmując obecność N-podstawionego

pierścienia pirydynowego. Zróznicowane strukturalnie podstawniki obejmowały zarówno proste łańcuchy alifatyczne, reszty zawierające grupy karbonylowe, jak również pierścienie aromatyczne i grupy sulfonylowe (tabela 1).

Opierając się na wcześniejszych badaniach Katedry Biofarmacji i Farmakodynamiki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w tym pomiarach Grabowskiej i wsp. [133], które dowiodły zdolności wiązania się trygoneliny z A β ($K_a = 0,28 \times 10^8$), postanowiono przeprowadzić analizę mechanizmu tego wiązania z zastosowaniem dokowania molekularnego. Badania rozszerzono na grupę wybranych analogów trygonliny. Na podstawie danych literaturowych [134] przyjęto histydynę w pozycji 13 oraz 14 łańcucha A β_{1-42} jako potencjalne miejsce wiązania ligandów z amyloidem. Założono, że blokowanie tego miejsca mogłoby ograniczyć formację zagregowanych postaci tego białka, co przekładałoby się na potencjalne działanie antyneurodegeneracyjne. Oceniano procentowy udział okupowania rejonu His13 oraz His14 w stosunku do wszystkich lokalizacji, jakie zajmował badany ligand. Wykazano, że dla każdego z badanych związków wartość ta wynosiła od 6 do 91%, przy czym niektóre ligandy grupowały się niespecyficycznie i w dużym stopniu zajmowały także inne rejony w obrębie cząsteczki β -amyloidu. Największym stopniem okupowania rejonu His13 oraz największą wybiórczością charakteryzowały się trzy związki: bromek 4-(4-dietyloaminofenylazo)-1-(4-nitrobenzylo)-pirydyniowy (związek nr 25), chlorek 1,1'-(etylenodisulfonylodietyleno)-bis-pirydyniowy (związek nr 22) oraz bromek 1-heptylo-4-(4-pirydylo)-pirydyniowy (związek nr 11). Trygonelina w umiarkowanym stopniu zajmowała badany rejon, co pozostaje w zgodzie ze stosunkowo niewielką wartością stałej wiązania wyznaczoną przez Grabowską i wsp. [133].

Trygonelina oraz sześć innych związków, charakteryzujących się najlepszymi parametrami dokowania molekularnego, zostały poddane oznaczeniu cytotoksyczności *in vitro*. Badanie to jest jednym z etapów oceny bezpieczeństwa potencjalnego leku w celu określenia jego tak zwanego „drug-likeness”. Przeprowadzony test polegał na oznaczeniu wpływu serii stężeń badanych związków na żywotność komórek. Do badań wykorzystano linię ludzkiego nowotworu neuroblastoma SH-SY5Y. Zastosowany test z czerwieni α obojętną pozwalał na sprawdzenie ilości żywych komórek po 24 godzinach inkubacji z badanymi związkami w zakresie stężeń od 0,1 do 100 μ M. Tylko jedna z substancji, chlorek 1,1'-(etylenodisulfonylodietyleno)-bis-pirydyniowy (związek

nr 22), powodowała istotny spadek żywotności komórek w stężeniu powyżej 1 μM . Pozostałe testowane związki, w tym trygonelina, charakteryzowały się brakiem istotnej toksyczności w stężeniach poniżej 100 μM .

Finalnym etapem pracy doktorskiej było opracowanie oraz walidacja metody pomiaru stężenia trygoneliny w surowicy krwi oraz w mózgu i przeprowadzenie eksperymentu farmakokinetycznego z wykorzystaniem myszy szczepu C57BL/6. Do tej pory w literaturze mało jest informacji na temat oznaczania TRG w płynach ustrojowych ludzi lub zwierząt, a brak jest zupełnie doniesień o badaniach penetracji tego psychostymulującego przeciw alkaloidu do ośrodkowego układu nerwowego. Większość opisywanych metod analitycznych dotyczy oznaczania trygoneliny oddzielnie lub obok innych składników ziaren kawy oraz gotowego napoju i związana jest z rolą alkaloidu jako jednego ze związków odpowiedzialnych za smak kawy. Oznaczanie trygoneliny wykorzystuje się także do identyfikacji pochodzenia geograficznego kawy [163, 164]. W pierwszym opublikowanym badaniu stężenia TRG w materiale biologicznym (moczu) wykorzystana została technika RP-HPLC [165]. Ze względu na szczególne właściwości fizykochemiczne tego alkaloidu, opracowanie metody jego oznaczania z wykorzystaniem chromatografii w odwróconym układzie faz jest zadaniem niezwykle trudnym. Jako mała cząsteczka o bardzo dużej polarności, w standardowych układach RP-HPLC, trygonelina charakteryzuje się bardzo krótkim czasem retencji lub wręcz całkowitym jej brakiem. W badaniach farmakokinetyki TRG u szczurów przeprowadzonych przez Lin i wsp. [166] problem ten został rozwiązany przez zastosowanie elucji gradientowej, przy czym wybór karbamazepiny jako wzorca wewnętrznego powodował znaczne wydłużenie czasu analizy. Znacząco ogranicza to zastosowanie metody do analizy większej ilości próbek, co ma miejsce w przypadku badań farmakokinetycznych. Krótszy czas analizy uzyskali Cheng i wsp. [167] rezygnując z wzorca wewnętrznego i stosując technikę HILIC w ultrasprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV. Brak IS jest jednak poważnym ograniczeniem tej metody, ponieważ w przypadku analizy próbek biologicznych może wpłynąć na wiarygodność uzyskanych wyników.

Optymalnym rozwiązaniem wydaje się być połączenie techniki HILIC z zastosowaniem wzorca wewnętrznego z detekcją za pomocą spektrometrii mas. Podejście takie zostało wykorzystane w niniejszej pracy. Chromatografia cieczowa

oddziaływań hydrofilowych jest dedykowana między innymi oznaczeniom małych, polarnych analitów. Łącząc w sobie zalety trzech typów chromatografii, RP, NP oraz IEC, umożliwia opracowanie prostych i szybkich metod oznaczania polarnych związków chemicznych w materiale biologicznym. Dodatkową zaletą metody jest to, że stosowane fazy ruchome, oparte np. na mieszaninie acetonitrylu i roztworu mrówczanu amonu, umożliwiają połączenie metody chromatograficznej ze spektrometrią mas. Korzystanie ze spektrometrii mas ułatwia również stosowanie deuterowanych pochodnych analitów jako wzorców wewnętrznych. Pochodne te charakteryzują się praktycznie takim samym czasem retencji, jak wyjściowy związek, różnią się jednak masą, dzięki czemu mogą być niezależnie oznaczane przy użyciu techniki MS.

W niniejszej pracy opracowana i zwalidowana została metoda ilościowego oznaczania trygoneliny w surowicy krwi mysiej za pomocą techniki HILIC-ESI-MS/MS, z deuterowaną trygoneliną jako wzorcem wewnętrznym. Uzyskane wyniki walidacji (rozdział 4.3) świadczą o wysokiej jakości oraz wiarygodności metody. Potwierdzeniem jej użyteczności była analiza próbek surowicy krwi uzyskanych od myszy, którym podano dożylnie chlorowoderek trygoneliny. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyznaczenie profilu zmian stężenia TRG w surowicy. Wyniki te są zbliżone do uzyskanych przez Lin i wsp. [166] oraz Cheng i wsp. [167] w badaniach na szczurach.

Kwestia przenikania przez barierę krew-mózg jest niezwykle istotna w przypadku leków, które mogłyby znaleźć zastosowanie w terapii choroby Alzheimera. Bariera ta umożliwia dyfuzję bierną jedynie niewielkiej liczbie małych, silnie lipofilowych cząsteczek. Trygonelina, jako związek silnie polarny, będzie miała raczej ograniczoną zdolność do przenikania do OUN na zasadzie dyfuzji biernej. Z drugiej strony, wiadomo, że alkaloid ten wykazuje krótkotrwałe działanie psychostymulujące, nawet przyjęty *per os* jako składnik diety czy używek. Wydaje się, że możliwe jest wchłanianie trygoneliny do mózgu na zasadzie transportu przenośnikowego, typowego dla czynników odżywczych. Hipotezę tą uzasadnia podobieństwo strukturalne trygoneliny do naturalnych aminokwasów oraz witaminy B₃. Uzyskane wyniki dowodzą, że przenikalność TRG do ośrodkowego układu nerwowego zachodzi, chociaż w umiarkowanym stopniu. Maksymalne jej stężenie w mózgu jest

niższe niż w surowicy krwi. Trzeba jednak zauważyć, że parametr logBB dla TRG jest tego samego rzędu wielkości, jak niektórych działających ośrodkowo leków.

Ważnym aspektem, który należało uwzględnić w analizach prowadzonych w ramach pracy doktorskiej był tak zwany efekt matrycy. Definiowany jest on jako bezpośredni lub pośredni wpływ składników próbki na wielkość odpowiedzi aparatu analitycznego. Efekt ten jest szczególnie istotny w przypadku bardzo polarnych związków oraz stosowania techniki elektrorozpylania jako źródła jonów w spektrometrii mas i może prowadzić zarówno do supresji jonów, a więc wygaszania odpowiedzi aparatu, jak i jej wzmacniania. Oba zjawiska są niekorzystne z punktu widzenia analizy ilościowej, ponieważ mogą być przyczyną zafałszowanych wyników pomiarów stężenia analitu [161, 168]. Sposobem ograniczania wpływu matrycy jest odpowiednie przygotowanie próbki. Obejmuje to różne sposoby obróbki materiału biologicznego, od prostych zabiegów mających na celu wytrącenie białka przez dodatek metanolu lub acetonitrylu, po bardziej skomplikowane metody, wykorzystujące ekstrakcję do fazy stałej czy liofilizację. Niestety, zaawansowane metody przygotowania próbki są często czasochłonne i wymagają dużego zużycia drogich, nieprzyjaznych środowiskowo materiałów, co czyni kłopotliwym ich stosowanie w rutynowych analizach. W metodzie opracowanej w ramach niniejszej pracy przygotowanie próbki było szybkim etapem polegającym na wytrąceniu białek, odwirowaniu i przefiltrowaniu supernatantu. Podczas walidacji dowiedziono, że efekt matrycy dla surowicy krwi jest zanedbywalny, co można wytłumaczyć dużym, stukrotnym rozcieńczeniem w procesie przygotowania próbki. Dzięki temu możliwe było przeprowadzenie większości prób walidacyjnych z wykorzystaniem roztworów wzorcowych. Pozwoliło to na mniejsze zużycie materiału pochodzącego od zwierząt, a proste przygotowanie próbki sprawia, że metoda może być wykorzystywana w analizie dużej ilości próbek.

Problemem podczas optymalizacji metody była obecność trygoneliny w zerowych próbkach surowicy. O takim zjawisku zaobserwowanym u szczurów donosili między innymi Cheng i wsp. [167]. Jednym z prawdopodobnych powodów występowania „endogennej” TRG jest obecność jej źródeł w paszy, którą karmione były zwierzęta. W cytowanych badaniach zwierzęta były głodzone przez 12 godzin przed eksperymentem, pomimo tego jednak trygonelina wciąż była wykrywalna

w zerowych próbkach osocza. W niniejszych badaniach zwierzęta nie były głodzone. W związku z zanedbywalnym efektem matrycy walidacja została przeprowadzona z wykorzystaniem roztworów wzorcowych. Sam efekt matrycy oraz odzysk analitu z próbki i efektywność procesu jej przygotowania ocenione zostały poprzez dodatek D3-TRG do próbek surowicy.

Podczas optymalizacji pojawił się również problem nieporządanego przenoszenia trygoneliny pomiędzy kolejnymi próbkami, którego przyczyną było najprawdopodobniej pozostawianie roztworu w igle służącej do nastrzyku próbek. Problem ten został rozwiązany poprzez zastosowanie odpowiedniego programu płukania igły pomiędzy analizami, obejmującego dwukrotne przemycie igły za pomocą wody oraz mieszaniny acetonitrylu i wody (50:50, v/v). Dodatkowo, pomiędzy kolejnymi próbkami wykonywany był nastrzyk czystej wody.

Podsumowując, w wyniku badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej:

- wykazano, że alkaloidy pirydynowe, a w szczególności trygonelina oraz inne N-podstawione pochodne pirydyny mają zdolność okupowania miejsc molekularnych istotnych dla agregacji β -amyloidu;
- wykazano, że trygonelina i badane związki pirydyniowe (z jednym wyjątkiem) nie wykazują toksyczności wobec linii ludzkich komórek SH-SY5Y;
- opracowano i zwalidowano szybką i prostą metodę pomiaru stężenia trygoneliny w surowicy krwi oraz mózgu mysim;
- wyznaczono podstawowe parametry farmakokinetyczne trygoneliny oraz wstępnie oszacowano jej przenikalność do ośrodkowego układu nerwowego;
- wykazano, że trygonelina szybko dociera z krwi do mózgu i szybko też zostaje eliminowana z organizmu.

Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki wskazują, że trygonelina i jej analogi strukturalne mogą stanowić grupę potencjalnych struktur wiodących dla środków przydatnych dla prewencji i hamowania postępu choroby Alzheimera. Ze względu na cechy farmakokinetyczne, zwłaszcza szybką eliminację z ustroju, pirydyniowe analogi trygoneliny raczej słabo rokują na leki podawane typowo, czyli w rozsądnych odstępach czasu. Można jednak oczekiwać od trygoneliny działania zapobiegającego

neurodegeneracji przy stałej podaży do organizmu w diecie zawierającej np. nasiona kozieradki (*Trigonella foenum-graecum* L.).

SPIS TABEL

Tabela 1. Struktury chemiczne oraz nazwy analizowanych związków [61].

Tabela 2. Parametry analizatora podczas pracy w trybie MRM [68].

Tabela 3. Zestawienie wyników dokowania do cząsteczki β -amyloidu 1-42 [75].

Tabela 4. Średnia żywotność komórek SH-SY5Y po 24 godzinach inkubacji z badanymi związkami (dane wyrażone jako procent żywych komórek w stosunku do kontroli równej 100%) [77].

Tabela 5. Parametry krzywych kalibracyjnych z trzech dni walidacji [78].

Tabela 6. Wyniki oceny dokładności i precyzji walidowanej metody [79].

Tabela 7. Wyniki oceny efektu matrycy na podstawie porównania próbek kontrolnych [79].

Tabela 8. Wyniki oceny efektu matrycy dla mózgu na podstawie porównania próbek kontrolnych [80].

Tabela 9. Wyniki oceny odzysku analitu z próbki oraz efektywności procesu przygotowania próbki [80].

Tabela 10. Wyniki badania stabilności podczas przechowywania w temperaturze pokojowej oraz w autosamplerze [81].

Tabela 11. Wyniki testu zamrażania – rozmrażania [81].

SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1. Strutura chemiczna takryny [31].

Rysunek 2. Struktura chemiczna donepezylu [32].

Rysunek 3. Struktura chemiczna rywastygminy [33].

Rysunek 4. Struktura chemiczna galantaminy [34].

Rysunek 5. Struktura chemiczna memantyny [36].

Rysunek 6. Struktury chemiczne pirydyny (po lewej) i piperydyny (po prawej) [47].

Rysunek 7. Struktura chemiczna trygoneliny [50].

Rysunek 8. Model 1IYT β -amyloidu 1-42 z bazy PDB [64].

Rysunek 9. Umieszczenie cząsteczek trygoneliny wokół cząsteczki β -amyloidu. H6, H13, H14 – reszty histydyny, Y10 – reszta tyrozyny [74].

Rysunek 10. Wykres zależności stężenia trygoneliny w surowicy od czasu [82].

Rysunek 11. Profil zmian stężenia trygoneliny w preparatach mózgu [83].

6. PIŚMIENNICTWO

- [1] The Merck Manual - Podręcznik Diagnostyki i Terapii, wyd. III polskie, Wrocław, Elsevier Urban & Partner, 2008.
- [2] Minati L, Edginton T, Grazia Bruzzone M, Giaccone G. Reviews: Current concepts in alzheimer's disease: A multidisciplinary review. *American Journal of Alzheimer's Disease and other Dementias*. 2009, 24, 95-121.
- [3] Selkoe DJ. Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews*. 2001, 81, 741-766.
- [4] Bachurin SO. Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *Medicinal Research Reviews*. 2003, 23, 48-88.
- [5] Szczudlik A. Sytuacja osób chorych na chorobę Alzheimera w Polsce. Raport Rzecznika Praw Obywatelskich. Warszawa: Biuro Rzecznika Praw Obywatelskich. 2014.
- [6] <http://www.alz.org/facts/>; dostęp: 20.02.2016.
- [7] Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, 'Uber Eine Eigenartige Erkrankung der Hirnrinde'. *Clinical Anatomy*. 1995, 8, 429-431.
- [8] McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2011, 7, 263-269.
- [9] National Library of Medicine - Medical Subject Headings, MeSH 2016.
- [10] Davies P, Resnick J, Resnick B, et al. Consensus report of the working group on: 'Molecular and biochemical markers of Alzheimer's disease'. *Neurobiology of Aging*. 1998, 19, 109-116.
- [11] Hampel H, Bürger K, Teipel SJ, Bokde ALW, Zetterberg H, Blennow K. Core candidate neurochemical and imaging biomarkers of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2008, 4, 38-48.
- [12] Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*. 2010, 19, R12-R20.
- [13] Frank RA, Galasko D, Hampel H, et al. Biological markers for therapeutic trials in Alzheimer's disease: Proceedings of the biological markers working group; NIA

initiative on neuroimaging in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 2003, 24, 521-536.

[14] Henry MS, Passmore AP, Todd S, McGuinness B, Craig D, Johnston JA. The development of effective biomarkers for Alzheimer's disease: A review. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 2013, 28, 331-340.

[15] Humpel C. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends in Biotechnology*. 2011, 29, 26-32.

[16] Stern Y, Gurland B, Tatemichi TK, Tang MX, Wilder D, Mayeux R. Influence of Education and Occupation on the Incidence of Alzheimer's Disease. *Journal of the American Medical Association*. 1994, 271, 1004-1010.

[17] Patterson C, Feightner JW, Garcia A, Hsiung GYR, MacKnight C, Sadovnick AD. Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. *Canadian Medical Association Journal*. 2008, 178, 548-556.

[18] Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2006, 368, 387-403.

[19] Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Genetic insights in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*. 2013, 12, 92-104.

[20] Ridge PG, Ebbert MTW, Kauwe JSK. Genetics of alzheimer's disease. *BioMed Research International*. 2013, doi: 10.1155/2013/254954.

[21] Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, Zheng JB, Loturco JJ, Selkoe DJ. A critical function for β -amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *Journal of Neuroscience*. 2007, 27, 14459-14469.

[22] O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*. 2011, 185-204.

[23] Kowalska A. Genetyka zespołów otępiennych. Część 4: spektrum mutacji odpowiedzialnych za rozwój rodzinnej autosomalnie dominującej postaci choroby Alzheimera. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2009, 63, 583-591.

[24] Brouwers N, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of Alzheimer's disease: An update. *Annals of Medicine*. 2008, 40, 562-583.

[25] Kanekiyo T, Xu H, Bu G. ApoE and A β in Alzheimer's disease: Accidental encounters or partners? *Neuron*. 2014, 81, 740-754.

[26] Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1984, 120, 885-890.

- [27] Delacourte A. The natural and molecular history of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2006, 9, 187-194.
- [28] Wisniewski T, Ghiso J, Frangione B. Biology of A β Amyloid in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Disease*. 1997, 4, 313-328.
- [29] Morley JE, Farr SA, Banks WA, Johnson SN, Yamada KA, Xu L. A physiological role for amyloid- β protein: Enhancement of learning and memory. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010, 19, 441-449.
- [30] Baruch-Suchodolsky R, Fischer B. A β 40, either Soluble or Aggregated, Is a Remarkably Potent Antioxidant in Cell-Free Oxidative Systems. *Biochemistry*. 2009, 48, 4354-4370.
- [31] Atwood CS, Obrenovich ME, Liu T, et al. Amyloid- β : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid- β . *Brain Research Reviews*. 2003, 43, 1-16.
- [32] FINDER VH, GLOCKSHUBER R. Amyloid- β aggregation. *Neurodegenerative Diseases*. 2007, 4, 13-27.
- [33] Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2004, 44, 181-193.
- [34] Selkoe DJ. Soluble oligomers of the amyloid β -protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioural Brain Research*. 2008, 192, 106-113.
- [35] Ghiso J, Frangione B. Amyloidosis and Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002, 54, 1539-1551.
- [36] Viola KL, Klein WL. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathologica*. 2015, 129, 183-206.
- [37] Lorenzo A, Yankner BA. β -Amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994, 91, 12243-12247.
- [38] Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β (1-42) are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998, 95, 6448-6453.
- [39] Gong Y, Chang L, Viola KL, et al. Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003, 100, 10417-10422.

- [40] Wang ZX, Tan L, Liu J, Yu JT. The Essential Role of Soluble A β Oligomers in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*. 2016, 53, 1905-1924.
- [41] Shankar GM, Li S, Mehta TH, et al. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*. 2008, 14, 837-842.
- [42] Lesné S, Ming TK, Kotilinek L, et al. A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*. 2006, 440, 352-357.
- [43] Ballatore C, Lee VMY, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007, 8, 663-672.
- [44] Panza F, Solfrizzi V, Seripa D, et al. Tau-Centric Targets and Drugs in Clinical Development for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int*. 2016, doi: 10.1155/2016/3245935
- [45] Lee YJ, Han SB, Nam SY, Oh KW, Hong JT. Inflammation and Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research*. 2010, 33, 1539-1556.
- [46] Butterfield DA. Amyloid β -peptide [1-42]-associated free radical-induced oxidative stress and neurodegeneration in Alzheimer's disease brain: Mechanisms and consequences. *Current Medicinal Chemistry*. 2003, 10, 2651-2659.
- [47] Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. 2001, 357, 593-615.
- [48] Akama KT, Albanese C, Pestell RG, Van Eldik LJ. Amyloid β -peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NF κ b-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998, 95, 5795-5800.
- [49] Malinski T. Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2007, 11, 207-218.
- [50] Arispe N, Pollard HB, Rojas E. Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid β - protein [A β P-(1-40)] in bilayer membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993, 90, 10573-10577.
- [51] Hung CHL, Ho YS, Chang RCC. Modulation of mitochondrial calcium as a pharmacological target for Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*. 2010, 9, 447-456.

- [52] Keller JN, Quo Q, Holtsberg FW, Bruce-Keller AJ, Mattson MP. Increased sensitivity to mitochondrial toxin-induced apoptosis in neural cells expressing mutant presenilin-1 is linked to perturbed calcium homeostasis and enhanced oxyradical production. *Journal of Neuroscience*. 1998, 18, 4439-4450.
- [53] Lee CW, Shih YH, Kuo YM. Cerebrovascular Pathology and Amyloid Plaque Formation in Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*. 2014, 11, 4-10.
- [54] Li J, Wang YJ, Zhang M, et al. Vascular risk factors promote conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer disease. *Neurology*. 2011, 76, 1485-1491.
- [55] Regan RF, Panter SS. Neurotoxicity of hemoglobin in cortical cell culture. *Neuroscience Letters*. 1993, 153, 219-222.
- [56] Chuang JY, Lee CW, Shih YH, Yang T, Yu L, Kuo YM. Interactions between amyloid- β and hemoglobin: Implications for amyloid plaque formation in Alzheimer's disease. *PLoS ONE*. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0033120.
- [57] Beach TG, Wilson JR, Sue LI, et al. Circle of Willis atherosclerosis: Association with Alzheimer's disease, neuritic plaques and neurofibrillary tangles. *Acta Neuropathologica*. 2007, 113, 13-21.
- [58] Grammas P. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*. 2011, doi: 10.1186/1742-2094-8-26
- [59] Grammas P, Botchlet T, Fugate R, Ball MJ, Roher AE. Alzheimer disease amyloid proteins inhibit brain endothelial cell proliferation in vitro. *Dementia*. 1995, 6, 126-130.
- [60] Thirumangalakudi L, Samany PG, Owoso A, Wiskar B, Grammas P. Angiogenic proteins are expressed by brain blood vessels in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2006, 10, 111-118.
- [61] Nagy Z, Esiri MM, Cato AM, Smith AD. Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. 1997, 94, 6-15.
- [62] McShea A, Harris PLR, Webster KR, Wahl AF, Smith MA. Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*. 1997, 150, 1933-1939.
- [63] Zhu X, Lee Hg, Perry G, Smith MA. Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: An update. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2007, 1772, 494-502.

- [64] Borzym A. Leczenie Farmakologiczne w Chorobie Alzheimerera. W: Parnowski T (red.), Choroba Alzheimerera. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2010, 36-45.
- [65] Dobryczycka W, Leszek J, Rymaszewska J. Choroba Alzheimerera. Patogeneza, diagnostyka, leczenie. Wrocław: Wydawnictwo Continuo; 2002.
- [66] Crismon ML. Tacrine: First drug approved for Alzheimer's disease. *Annals of Pharmacotherapy*. 1994, 28, 744-751.
- [67] Davis KL, Thal LJ, Gamzu ER, et al. A double-blind, placebo-controlled multicenter study of tacrine for Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*. 1992, 327, 1253-1259.
- [68] David G. Standaert, Young AB. Leczenie Chorób Zwyrodnieniowych Ośrodkowego Układu Nerwowego, tłumaczenie: Piotr Sokołowski. W: Brunton LL, Buczko W, Krzemiński TF, Czuczwar SJ (red.). *Farmakologia Goodmana & Gilmana*, tom I. Lublin: Wydawnictwo Czelej; 2007, 551 - 572.
- [69] Kryger G, Silman I, Sussman JL. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*. 1999, 7, 297-307.
- [70] Vetulani J. Leki nootropowe i prokognitywne. *Farmakoterapia choroby Alzheimerera*. W: Kostowski W, Herman Z (red.). *Farmakologia. Podstawy Farmakoterapii*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 2007, 154 - 169.
- [71] Rogers SL, Farlow MR, Doody RS, Mohs R, Friedhoff LT. A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*. 1998, 50, 136-145.
- [72] Charakterystyka Produktu Leczniczego Aricept.
- [73] Kawakami Y, Inoue A, Kawai T, Wakita M, Sugimoto H, Hopfinger AJ. The rationale for E2020 as a potent acetylcholinesterase inhibitor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 1996, 4, 1429-1446.
- [74] Rösler M, Anand R, Cicin-Sain A, et al. Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: International randomised controlled trial. *British Medical Journal*. 1999, 318, 633-640.
- [75] Sramek JJ, Anand R, Wardle TS, Irwin P, Hartman RD, Cutler NR. Safety/tolerability trial of SDZ ENA 713 in patients with probable Alzheimer's disease. *Life Sciences*. 1996, 58, 1201-1207.
- [76] Charakterystyka Produktu Leczniczego Rivaldo.

- [77] Winblad B, Grossberg G, Frölich L, et al. IDEAL: A 6-month, double-blind, placebo-controlled study of the first skin patch for Alzheimer disease. *Neurology*. 2007, 69, S14-S22.
- [78] Charakterystyka Produktu Leczniczego Evertas (system transdermalny).
- [79] Heinrich M, Teoh HL. Galanthamine from snowdrop – The development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004, 92, 147-162.
- [80] Scott LJ, Goa KL. Galantamine: A review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs*. 2000, 60, 1095-1122.
- [81] Maelicke A, Samochocki M, Jostock R, et al. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry*. 2001, 49, 279-288.
- [82] Charakterystyka Produktu Leczniczego Galsya SR.
- [83] Danysz W, Parsons CG. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: Preclinical evidence. *International Journal of Geriatric Psychiatry*. 2003, 18, S23-S32.
- [84] Reisberg B, Doody R, Stöffler A, Schmitt F, Ferris S, Möbius HJ. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*. 2003, 348, 1333-1341.
- [85] Charakterystyka Produktu Leczniczego Biomentin.
- [86] Stone JG, Casadesus G, Gustaw-Rothenberg K, et al. Frontiers in Alzheimer's disease therapeutics. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2011, 2, 9-23.
- [87] Barten DM, Albright CF. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*. 2008, 37, 171-186.
- [88] Imbimbo BP, Giardina GAM. γ -secretase inhibitors and modulators for the treatment of Alzheimer's disease: Disappointments and hopes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2011, 11, 1555-1570.
- [89] Williams P, Sorribas A, Howes MJR. Natural products as a source of Alzheimer's drug leads. *Natural Product Reports*. 2011, 28, 48-77.
- [90] Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update. *Pharmacological Reports*. 2015, 67, 195-203.
- [91] Zlokovic BV. Clearing amyloid through the blood–brain barrier. *Journal of Neurochemistry*. 2004, 89, 807-811.

- [92] Matsuoka Y, Saito M, LaFrancois J, et al. Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease by peripheral administration of agents with an affinity to β -amyloid. *Journal of Neuroscience*. 2003, 23, 29-33.
- [93] Saito T, Iwata N, Tsubuki S, et al. Somatostatin regulates brain amyloid β peptide A β 42 through modulation of proteolytic degradation. *Nature Medicine*. 2005, 11, 434-439.
- [94] Ries M, Loiola R, Shah UN, Gentleman SM, Solito E, Sastre M. The anti-inflammatory Annexin A1 induces the clearance and degradation of the amyloid- β peptide. *Journal of Neuroinflammation*. 2016, doi: 10.1186/s12974-016-0692-6.
- [95] Schenk D, Barbour R, Dunn W, et al. Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999, 400, 173-177.
- [96] Rafii MS, Aisen PS. Advances in alzheimer's disease drug development. *BMC Medicine*. 2015, doi: 10.1186/1741-7015-7-7.
- [97] Sevigny J, Chiao P, Bussière T, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 2016, 537, 50-56.
- [98] Janusz M, Lisowski J, Franek F. Isolation and characterization of a proline-rich polypeptide from ovine colostrum. *FEBS Letters*. 1974, 49, 276-279.
- [99] Aisen PS, Gauthier S, Ferris SH, et al. Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease - A randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study (the alphase study). *Archives of Medical Science*. 2011, 7, 102-111.
- [100] Santa-Maria I, Hernández F, Del Rio J, Moreno FJ, Avila J. Tramiprosate, a drug of potential interest for the treatment of Alzheimer's disease, promotes an abnormal aggregation of tau. *Molecular Neurodegeneration*. 2007, doi: 10.1186/1750-1326-2-17.
- [101] <http://www.supersmart.com/en--Neuro-Nutrition--Homotaurine-50-mg--0661>, dostę: 18.09.2016.
- [102] Salloway S, Sperling R, Keren R, et al. A phase 2 randomized trial of ELND005, scyllo-inositol, in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*. 2011, 77, 1253-1262.
- [103] Pappolla M, Bozner P, Soto C, et al. Inhibition of Alzheimer β -fibrillogenesis by melatonin. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273, 7185-7188.
- [104] Noble W, Planel E, Zehr C, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, 102, 6990-6995.

- [105] Hampel H, Ewers M, Bürger K, et al. Lithium trial in Alzheimer's disease: A randomized, single-blind, placebo-controlled, multicenter 10-week study. *Journal of Clinical Psychiatry*. 2009, 70, 922-931.
- [106] Congdon EE, Wu JW, Myeku N, et al. Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo. *Autophagy*. 2012, 8, 609-622.
- [107] Dickey CA, Kamal A, Lundgren K, et al. The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *Journal of Clinical Investigation*. 2007, 117, 648-658.
- [108] Zhang B, Maiti A, Shively S, et al. Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, 102, 227-231.
- [109] Hüll M, Fiebich BL, Schumann G, Lieb K, Bauer J. Anti inflammatory substances - A new therapeutic option in Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today*. 1999, 4, 275-282.
- [110] Aisen PS, Davis KL, Berg JD, et al. A randomized controlled trial of prednisone in Alzheimer's disease. *Neurology*. 2000, 54, 588-593.
- [111] Van Gool WA, Weinstein HC, Scheltens PK, Walstra GJM. Effect of hydroxychloroquine on progression of dementia in early Alzheimer's disease: An 18-month randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet*. 2001, 358, 455-460.
- [112] Martin DSD, Walsh M, Miller AM, et al. A novel phospholipid-based drug formulation, VP025, modulates age- and LPS-induced microglial activity in the rat. *NeuroImmunoModulation*. 2009, 16, 400-410.
- [113] Barone E, Di Domenico F, Butterfield DA. Statins more than cholesterol lowering agents in Alzheimer disease: Their pleiotropic functions as potential therapeutic targets. *Biochemical Pharmacology*. 2014, 88, 605-616.
- [114] Ott BR, Daiello LA, Dahabreh IJ, et al. Do Statins Impair Cognition? A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Journal of General Internal Medicine*. 2015, 30, 348-358.
- [115] Cordle A, Landreth G. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors attenuate β -amyloid-induced microglial inflammatory responses. *Journal of Neuroscience*. 2005, 25, 299-307.

- [116] Combs CK, Johnson DE, Karlo JC, Cannady SB, Landreth GE. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: Inhibition of β -amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPAR γ agonists. *Journal of Neuroscience*. 2000, 20, 558-567.
- [117] Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, et al. Acute treatment with the PPAR γ agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and A β 1-42 levels in APPV717I transgenic mice. *Brain*. 2005, 128, 1442-1453.
- [118] Gold M, Alderton C, Zvartau-Hind M, et al. Rosiglitazone monotherapy in mild-to-moderate Alzheimer's disease: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 2010, 30, 131-146.
- [119] Dysken MW, Sano M, Asthana S, et al. Effect of vitamin E and memantine on functional decline in Alzheimer disease: The TEAM-AD VA cooperative randomized trial. *Journal of the American Medical Association*. 2014, 311, 33-44.
- [120] Galasko DR, Peskind E, Clark CM, et al. Antioxidants for Alzheimer disease: A randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures. *Archives of Neurology*. 2012, 69, 836-841.
- [121] Isaac MG, Quinn R, Tabet N. Vitamin E for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2008.
doi: 10.1002/14651858.CD002854.pub2.
- [122] Pogocki D, Ruman T, Danilczuk M, Celuch M, Wałajtys-Rode E. Application of nicotine enantiomers, derivatives and analogues in therapy of neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology*. 2007, 563, 18-39.
- [123] Houghton PJ, Howes MJ. Natural products and derivatives affecting neurotransmission relevant to Alzheimer's and Parkinson's disease. *NeuroSignals*. 2005, 14, 6-22.
- [124] Fratiglioni L, Wang HX. Smoking and Parkinson's and Alzheimer's disease: Review of the epidemiological studies. *Behavioural Brain Research*. 2000, 113, 117-120.
- [125] Swan GE, Lessov-Schlaggar CN. The effects of tobacco smoke and nicotine on cognition and the brain. *Neuropsychology Review*. 2007, 17, 259-273.
- [126] Wang HY, Lee DHS, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB. β -Amyloid1-42 binds to α 7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity.

Implications for Alzheimer's disease pathology. *Journal of Biological Chemistry*. 2000, 275, 5626-5632.

[127] Salomon AR, Marcinowski KJ, Friedland RP, Zagorski MG. Nicotine inhibits amyloid formation by the β -peptide. *Biochemistry*. 1996, 35, 13568-13578.

[128] Szymańska I, Radecka H, Radecki J, Kaliszan R. Electrochemical impedance spectroscopy for study of amyloid β -peptide interactions with (-) nicotine ditartrate and (-) cotinine. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007, 22, 1955-1960.

[129] Nordberg A, Hellström-Lindahl E, Lee M, et al. Chronic nicotine treatment reduces β -amyloidosis in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease (APPsw). *Journal of Neurochemistry*. 2002, 81, 655-658.

[130] Oddo S, Caccamo A, Green KN, et al. Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005, 102, 3046-3051.

[131] Soncrant TT, Raffaele KC, Asthana S, Berardi A, Morris PP, Haxby JV. Memory improvement without toxicity during chronic, low dose intravenous arecoline in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology*. 1993, 112, 421-427.

[132] Shih YT, Chen PS, Wu CH, Tseng YT, Wu YC, Lo YC. Arecoline, a major alkaloid of the areca nut, causes neurotoxicity through enhancement of oxidative stress and suppression of the antioxidant protective system. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010, 49, 1471-1479.

[133] Grabowska I, Radecka H, Burza A, Radecki J, Kaliszan M, Kaliszan R. Association constants of pyridine and piperidine alkaloids to amyloid β peptide determined by electrochemical impedance spectroscopy. *Current Alzheimer Research*. 2010, 7, 165-172.

[134] Echeverria V, Zeitlin R, Burgess S, et al. Cotinine reduces amyloid- β aggregation and improves memory in Alzheimer's disease mice. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2011, 24, 817-835.

[135] Li WL, Zheng HC, Bukuru J, De Kimpe N. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004, 92, 1-21.

[136] Zhou J, Zhou S, Zeng S. Experimental diabetes treated with trigonelline: Effect on β cell and pancreatic oxidative parameters. *Fundamental and Clinical Pharmacology*. 2013, 27, 279-287.

- [137] Tohda C, Nakamura N, Komatsu K, Hattori M. Trigonelline-induced neurite outgrowth in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 1999, 22, 679-682.
- [138] Tohda C, Kuboyama T, Komatsu K. Search for natural products related to regeneration of the neuronal network. W: *Neurosignals*. Bazylea: S. Karger AG; 2005, 34-45.
- [139] Wichur T, Malawska B. Ligandy wielofunkcyjne – nowa strategia poszukiwania leku w terapii chorób o złożonej etiologii. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 2015, 69, 1423-1434.
- [140] Polak S, Wiśniowska B. Modelowanie komputerowe w badaniach nad lekiem – projektowanie i poszukiwanie cząstki aktywnej, ocena właściwości fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej. *Farmacja Polska*. 2009, 65, 214-223.
- [141] Bielenica A, Kossakowski J. Modele oddziaływań ligandów arylopiiperazynylowych z receptorami serotoninowymi 5-HT1A, 5-HT2A i 5-HT7. *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego*. 2010, 2, 13-21.
- [142] Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005, 288, 369-376.
- [143] Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*. 2006, 160, 171-177.
- [144] Klajna P, Kosecka M, Starba J. Prezentacja multimedialna: Metody badania cytotoxyczności związków; <https://prezi.com/trf417eid3du/metody-badania-cytotoxycznosci-zwiazkow/>; dostęp: 24.09.2016.
- [145] Buxton ILO. Farmakokinetyka i farmakodynamika; dynamika wchłaniania, dystrybucji, działania i eliminacji leku. W: Brunton LL, Buczek W, Krzemiński TF, Czuczwar SJ (red.). *Farmakologia Goodmana & Gilmana*, tom I. Lublin: Wydawnictwo Czelej; 2007.
- [146] Misra A, Ganesh S, Shahiwala A, Shah SP. Drug delivery to the central nervous system: A review. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2003, 6, 252-273.
- [147] Haines PJ, Kealey D. Krótkie Wykłady. *Chemia Analityczna*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2009.
- [148] Kamiński M, Kartanowicz R. *Chromatografia Cieczowa*. Gdańsk: Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny; 2004.

- [149] Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, 402, 231-247.
- [150] Gumbach ES, Fountain KJ. *Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)*. Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA.
- [151] *Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry*, Food and Drug Administration, 2001.
- [152] Konieczka P, Namieśnik J. *Walidacja procedur analitycznych*. W: Konieczka P, Namieśnik J (red.). *Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych*. Warszawa: Wydawnictwa Naukowo - Techniczne; 2007.
- [153] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry*. 2009, 30, 2785-2791.
- [154] Stewart JJP. Application of the PM6 method to modeling proteins. *Journal of Molecular Modeling*. 2009, 15, 765-805.
- [155] Stewart JJP. MOPAC2012, Stewart Computational Chemistry, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, <http://OpenMOPAC.net>.
- [156] Crescenzi O, Tomaselli S, Guerrini R, et al. Solution structure of the Alzheimer amyloid β -peptide (1-42) in an apolar microenvironment: Similarity with a virus fusion domain. *European Journal of Biochemistry*. 2002, 269, 5642-5648.
- [157] Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*. 1998, 19, 1639-1662.
- [158] Makowska J, Szczesny D, Lichucka A, Giełdoń A, Chmurzyński L, Kaliszan R. Preliminary studies on trigonelline as potential anti-Alzheimer disease agent: Determination by hydrophilic interaction liquid chromatography and modeling of interactions with beta-amyloid. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2014, 968, 101-104.
- [159] Matuszewski BK. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC–MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2006, 830, 293-300.
- [160] Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *Journal of*

Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2009, 877, 2198-2207.

[161] Luigi Silvestro ITaSRS. Matrix Effects in Mass Spectrometry Combined with Separation Methods - Comparison HPLC, GC and Discussion on Methods to Control these Effects. Tandem Mass Spectrometry - Molecular Characterization: InTech; 2013.

[162] Bujak R, Struck-Lewicka W, Kaliszan M, Kaliszan R, Markuszewski MJ. Blood-brain barrier permeability mechanisms in view of quantitative structure-activity relationships (QSAR). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2015, 108, 29-37.

[163] Gant A, Leyva VE, Gonzalez AE, Maruenda H. Validated HPLC-diode array detector method for simultaneous evaluation of six quality markers in coffee. Journal of AOAC International. 2015, 98, 98-102.

[164] Mehari B, Redi-Abshiro M, Chandravanshi BS, Atlabachew M, Combrinck S, McCrindle R. Simultaneous Determination of Alkaloids in Green Coffee Beans from Ethiopia: Chemometric Evaluation of Geographical Origin. Food Analytical Methods. 2015, doi:10.1007/s12161-015-0340-2.

[165] Tarr JB. Measurement of urinary tryptophan metabolites by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. Biochemical medicine. 1981, 26, 330-338.

[166] Lin C, Cai J, Yang X. Liquid chromatography-mass spectrometry determination of trigonelline in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. Latin American Journal of Pharmacy. 2014, 33, 848-851.

[167] Cheng ZX, Wu JJ, Liu ZQ, Lin N. Development of a hydrophilic interaction chromatography-UPLC assay to determine trigonelline in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study. Chinese Journal of Natural Medicines. 2013, 11, 164-170.

[168] Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 1999, 13, 1175-1185.

CURRICULUM VITAE

1. Imię i nazwisko: **Damian Szczesny**
2. Data i miejsce urodzenia: 06.06.1985, Starogard Gdański
3. Imiona rodziców: Barbara, Andrzej
4. Adres zamieszkania: ul. Zygmunta Noskowskiego 17b/23, 80-170 Gdańsk
5. Miejsce zatrudnienia: Zakład Farmakodynamiki, Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki GUMed
6. Zajmowane stanowisko: Asystent naukowy

7. Tytuły, stopnie naukowe i zawodowe:

Tytuł, stopień naukowy i zawodowy	Data uzyskania	Nazwa uczelni
Magister farmacji	31.03.2010	Gdański Uniwersytet Medyczny

- **rozprawa doktorska** - Oznaczanie fizykochemicznych i biochemicznych właściwości naturalnych alkaloidów pirydynowych i piperidynowych oraz ich prostych pochodnych, istotnych dla działania przeciwko chorobie Alzheimera

8. Przebieg pracy zawodowej:

Nazwa zakładu	Zajmowane stanowisko	Okres pracy od -do
Apteka „Kartuska” w Gdańsku	Magister farmacji	Od 05.2010
Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny	Doktorant	01.05.2010 – 30.04.2016
Zakład Farmakodynamiki, Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki, Wydział Farmaceutyczny, Gdański Uniwersytet Medyczny	Asystent naukowy	Od 21.08.2015

9. Odbyte szkolenia i staże naukowe:

- Szkolenie dla osób wykonujących czynności związane z wykorzystaniem zwierząt do celów naukowych lub edukacyjnych – Gdańsk, 21-25.09.2015, organizator: Kolegium Kształcenia Podyplomowego, Gdański Uniwersytet Medyczny
- “Hodowla komórek” – Gdańsk, 26.05.2015, organizator: LGC Standards
- “HPLC and UHPLC Troubleshooting: A Performance Qualification Approach” – Warszawa, 22.05.2015, organizator: LCResources Inc., Polygen
- “Advanced HPLC Method Development Using Quality by Design (QbD)” – Warszawa, 20-21.05.2015, organizator: LCResources Inc., Polygen
- “LC-MS/MS for Chromatographers” - Warszawa, 19.05.2015, organizator: LCResources Inc., Polygen
- “GLP w życiu codziennym” – Gdańsk, 11.02.2015, organizator: Vivari
- „Pharmacokinetic – Pharmacodynamic Modeling: Concepts and Applications” – Gdańsk, 26-28.06.2014, organizator: School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of Buffalo, Gdański Uniwersytet Medyczny
- “Szkolenie dla osób przeprowadzających doświadczenia na zwierzętach (myszy, szczury)” – Gdańsk, 29-30.09.2012, organizator: Trójmiejska Akademicka Zwierzętarńia Doświadczalna – Centrum Badawczo Usługowe, Gdański Uniwersytet Medyczny
- Kurs dydaktyki akademickiej, Gdańsk, 16.04-14.05.2012, organizator: Dział Oceny Jakości Kształcenia, Gdański Uniwersytet Medyczny
- Staż naukowy w Department of Chemistry & Biochemistry, Ohio University, Athens, OH, USA, u prof. Tadeusza Malińskiego, 12.2010 – 11-2011.

10. Działalność dydaktyczna:

- **Prowadzenie ćwiczeń z przedmiotu „Farmakokinetyka”, „Farmakoterapia z informacją o leku” oraz „Farmakologia i farmakodynamika” dla studentów kierunku Farmacja, Analityka Medyczna oraz dla studentów studiów podyplomowych.**
- **Opiekun Studenckiego Koła Naukowego przy Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki.**

11. Działalność w Towarzystwach Naukowych:

- **Członek Polskiego Towarzystwa Farmakologicznego**

12. Uzyskane nagrody i wyróżnienia za działalność naukową:

- **Nagroda Naukowa Zespołowa I-go Stopnia Rektora GUMed za badania nad modelowaniem farmakodynamiczno-farmakokinetycznym działania leków za rok 2014**
- **Stypendium „InnoDoktorant” za rok 2013**

13. Działalność na rzecz Uczelni:

- **Członek Wydziałowej Komisji Wyborczej Wydziału Farmaceutycznego z OML**
- **Członek Wydziałowej Komisji ds. Zapewnienia Jakości Kształcenia**
- **Chorąży Poczty Sztandarowego**

14. Udział w projektach badawczych:

- **realizacja grantu Preludium Narodowego Centrum Nauki nr 2012/07/N/NZ7/04275 – „Oznaczanie fizykochemicznych i biochemicznych właściwości naturalnych alkaloidów pirydynowych i piperydynowych oraz ich prostych pochodnych, istotnych dla działania przeciwko chorobie Alzheimera”**
- **współpraca z prof. Michałem Markuszewskim oraz mgr inż. Arlette Yumba Mpanga w ramach realizacji projektu dotyczącego nowotworów pęcherza moczowego – realizacja części eksperymentalnej z wykorzystaniem zwierząt**

15. Organizacja zjazdów i sympozjów naukowych.

- **Organizacja czterech edycji „Symposium Studenckich Kół Naukowych Wydziału Farmaceutycznego z OML”**

Wykaz publikacji

1. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of propofol in cancer patients undergoing major lung surgery; Krzysztof Przybyłowski, Joanna Tyczka, **Damian Szczesny**, Agnieszka Bienert, Paweł Wiczling, Katarzyna Kut, Emilia Plenzler, Roman Kaliszan, Edmund Grześkowiak; J. Pharmacokinet. Pharmacodyn. 2015; vol. 42, nr 2, s. 111-122, Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, IF = 1.808, punktacja ministerstwa: 20.000
2. Preliminary studies on trigonelline as potential anti-Alzheimer disease agent: determination by hydrophilic interaction liquid chromatography and modeling of interactions with beta-amyloid; Joanna Makowska, **Damian Szczesny**, Agnieszka Lichucka, Artur Giełdoń, Lech Chmurzyński, Roman Kaliszan; J. Chromatogr. B 2014; vol. 968, s. 101-104; Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, IF = 2.729, Punktacja ministerstwa: 30.000
3. The influence of the time of day on midazolam pharmacokinetics and pharmacodynamics in rabbits; A. Bienert, W. Płotek, Paweł Wiczling, B. Kostrzewski, A. Kamińska, H. Billert, **Damian Szczesny**, C. Żaba, A. Teżyk, K. Buda, E. Bednarek, Roman Kaliszan, E. Grześkowiak; Pharmacol. Rep. 2014; vol. 66, nr 1, s. 143-152; Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, IF = 1,928, Punktacja ministerstwa: 25.000
4. The favorable kinetics and balance of nebulol-stimulated nitric oxide and peroxynitrite release in human endothelial cells; R. P. Mason, R. F. Jacob, J. J. Corbalan, **Damian Szczesny**, K. Matysiak, T. Maliński; BMC Pharmacol. Toxicol. 2013; vol. 14, nr art. 48; Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej
5. Influence of time of day on propofol pharmacokinetics and pharmacodynamics in rabbits; A. Bienert, W. Płotek, I. Zawidzka, N. Ratajczak, **Damian Szczesny**, Paweł Wiczling, Z. J. Kokot, J. Matysiak, E. Grześkowiak; Chronobiol. Int. 2011; vol. 28, nr 4, s. 318-329, Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, IF = 4.028, Punktacja ministerstwa: 35.000

Komunikaty zjazdowe

1. Development of an HPLC-MS/MS method for trigonelline determination in mouse brain and serum; Danuta Siluk, **Damian Szczesny**, Ewa Bartosińska, Małgorzata Patejko, Julia Jacyna, Roman Kaliszan; 24th Kraków Conference on Endothelium, 2016, VII JCET SEMINAR Wierchomla Mała, 19 – 21 czerwca 2016
2. Niecelowana analiza profili metabolicznych moczu i osocza szczurów w nowotworze pęcherza moczowego; Arlette Yumba Mpanga, **Damian Szczesny**, Aleksandra Radwańska, Joanna Raczak-Gutknecht, Małgorzata Patejko, Joanna Matlejewska, Marta Kordalewska, Emilia Dagher-Wojtkowiak, Renata Bujak, Julia Jacyna, Maciej R. Markuszewski, Marcin Markuszewski, Roman Kaliszan, Michał Jan Markuszewski; 7 Konferencja chromatograficzna :

zastosowanie technik chromatograficznych w analizie środowiskowej i klinicznej, Łódź, 11-13 maja 2016

3. Validated LC-ESI-MS/MS method for determination of trigonelline in mice serum and its application to pharmacokinetic studies; **Damian Szczesny**, Ewa Bartosińska, M. Patejko, Julia Jacyna, Danuta Siluk, Roman Kaliszan; 10th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods in memoriam of Georges Guiochon, Siófok, Węgry, 2-4 września 2015
4. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rHuEPO after subcutaneous infusion at low doses in rats; **Damian Szczesny**, K. Mołoniewicz, M. Józefowicz, Roman Kaliszan, Paweł Wiczling; 8th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences "Retrospects, Insights and Prospects", Kiel, 29-30 maja 2015
5. Opracowanie metody oznaczania trygoneliny w surowicy krwi mysiej za pomocą techniki LC-ESI-MS/MS; **Damian Szczesny**, Ewa Bartosińska, Danuta Siluk, Oliwia Szerkus, Julia Jacyna, A. Malich, Roman Kaliszan; IX Polska Konferencja Chemii Analitycznej: "Chemia analityczna to ciągle wyzwania", Poznań, 6-10 lipca 2015
6. Determination of trigonelline in biological samples by hydrophilic interaction liquid chromatography; **Damian Szczesny**, M. Gostkowska, Marta Kordalewska, Roman Kaliszan; 9th International Symposium on Chromatography of Natural Products "The Application of Analytical Methods for the Development of Natural Products", Lublin, 26-29 maja 2014
7. Rola alkaloidów pirydynowych oraz piperidynowych w terapii choroby Alzheimera Dokument elektroniczny; **Damian Szczesny**; Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki - VI Edycja, Gdańsk, 25-27 kwietnia 2014
8. Non-targeted metabolomic analysis of urine in urogenital tract cancer diseases using LC-MS; Arlette Yumba Mpanga, Wiktoria Struck-Lewicka, Magdalena Buszewska-Forajta, **Damian Szczesny**, Marcin Markuszewski, Marek Roslan, Roman Kaliszan, Michał J. Markuszewski; 19th International Symposium on Separation Sciences "New Achievements in Chromatography", Poreč, 25-28 września 2013
9. Influence of ketoprofen on propofol pharmacokinetics and pharmacodynamics in oncologic patients; **Damian Szczesny**, Paweł Wiczling, K. Przybyłowski, A. Bienert, J. Tyczka, E. Grześkowiak, Roman Kaliszan; 7th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences "Interdisciplinary research for pharmacy", Gdańsk, 24-25 maja 2013
10. An LC-MS metabolomics method for analysis of urine sample from patients with urogenital tract cancer; Arlette Yumba Mpanga, Wiktoria Struck, Magdalena Buszewska-Forajta, **Damian Szczesny**, Marcin Markuszewski, Roman Kaliszan, Michał J. Markuszewski; 7th Polish-German Symposium on

Pharmaceutical Sciences "Interdisciplinary research for pharmacy", Gdańsk, 24-25 maja 2013

11. Changes of rate and force of contraction of isolated rat heart atria by imidazoline derivatives: RS 45041-190, BU224, BU239 and 2-BFI; Justyna Długokęcka, **Damian Szczesny**, Antoni Nasal, Aleksandra Radwańska, Roman Kaliszan; Pharmacol. Rep. 2013; vol. 65, suppl., s. 41; XVIIIth International Congress of the Polish Pharmacological Society, Kazimierz Dolny, 23-25 maja 2013
12. Determination of red blood cell age distribution by means of capillary electrophoresis; W. Grochocki, Michał J. Markuszewski, Roman Kaliszan, **Damian Szczesny**, Paweł Wiczling; Pharmacol. Rep. 2013; vol. 65, suppl., s. 48; XVIIIth International Congress of the Polish Pharmacological Society, Kazimierz Dolny, 23-25 maja 2013
13. Wpływ ketoprofenu na farmakokinetykę i farmakodynamikę propofolu u pacjentów poddanych zabiegowi resekcji płuca: Dokument elektroniczny; **Damian Szczesny**, Paweł Wiczling, A. Bienert, J. Tyczka, K. Przybyłowski, E. Grześkowiak, Roman Kaliszan; XXII Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego "Farmacja - Nauka - Społeczeństwo", Białystok, 18-21 września 2013
14. Metabolic profiles of human urogenital tract cancer determined in urine using LC-MS, Dokument elektroniczny; Arlette Yumba Mpanga, Wiktoria Struck, Magdalena Buszewska, **Damian Szczesny**, Marcin Markuszewski, Roman Kaliszan, Michał J. Markuszewski; 29th International Symposium on Chromatography, Toruń, 9-13 września 2012
15. Pharmacological analysis of the engagement of imidazoline receptors in the inotropic and chronotropic activity of the isolated rat heart atria; Justyna Długokęcka, A. Radwańska, **Damian Szczesny**, Antoni Nasal, Roman Kaliszan; 6th Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences - Perspectives for a new decade - Perspektywy na nowe dziesięciolecie - Perspektiven für ein neues Jahrzehnt, Düsseldorf, 20-21 maja 2011
16. Testing conception of engagement of imidazoline receptors in effects of imidazoline agents on isolated rat heart atria; Antoni Nasal, Justyna Długokęcka, Aleksandra Radwańska, **Damian Szczesny**, Roman Kaliszan; Pharmacol. Rep. 2010; vol. 62, suppl., s. 91; XVIIth International Congress of the Polish Pharmacological Society, Krynica Zdrój, 16-18 września 2010
17. Analiza ilościowych zależności struktura-aktywność ino- i chronotropowa wywierana przez pochodne azolowe na izolowane przedsionki serca szczura; Justyna Długokęcka, Aleksandra Radwańska, **Damian Szczesny**, Antoni Nasal, Roman Kaliszan; XXI Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego "Farmacja polska na tle Unii Europejskiej", Gdańsk, 12-15 września 2010
18. Wpływ pory dnia na farmakokinetykę i farmakodynamikę propofolu u królika; **Damian Szczesny**, Paweł Wiczling, A. Bienert, W. Płotek, I. Zawidzka, E.

Grześkowiak, J. Matysiak, Z. Kokot, N. Ratajczak; XXI Naukowy Zjazd
Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego "Farmacja polska na tle Unii
Europejskiej", Gdańsk, 12-15 września 2010