

mgr farm. Maria Podsiedlik

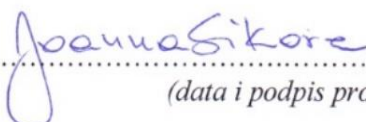
**Wpływ wybranych leków przeciwpsychotycznych na biochemiczne aspekty
choroby Alzheimerera**


**The influence of selected antipsychotic drugs on the biochemical aspects of Alzheimer's
disease**

**Rozprawa na stopień doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

Promotor: dr hab. n. med. Joanna Sikora, prof. uczelni
Katedra Chemii Medycznej, Zakład Chemii Bionieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Promotor pomocniczy: dr hab. n. farm. Magdalena Markowicz-Piasecka, prof. uczelni
Katedra Farmacji Stosowanej, Zakład Farmacji Aptecznej, Wydział Farmaceutyczny,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Akceptuję: 14.02.2024 
.....
(data i podpis promotora)

.....
(data i podpis promotora)
14.02.2024 
.....
(data i podpis promotora/promotora pomocniczego)

Składam najserdeczniejsze podziękowania Pani Prof. dr hab. n. med. Joannie Sikorze za opiekę naukową, cenne wskazówki, na które zawsze mogłam liczyć, nieustającą motywację do działania, życzliwość oraz zaufanie, którym mnie obdarzyła. Składam wyrazy wdzięczności za nieocenioną pomoc oraz ogrom bezcennej wiedzy teoretycznej i praktycznej przekazanej mi w trakcie realizacji moich badań, podczas przygotowywania artykułów naukowych oraz niniejszej pracy. Szczególnie dziękuję za dobre słowo oraz wsparcie nie tylko naukowe.

Serdecznie dziękuję Pani prof. dr hab. n. farm. Magdalenie Markowicz-Piaseckiej za życzliwość, wsparcie merytoryczne, ogromną motywację do działania, okazaną serdeczność oraz poświęcony czas. Szczególnie dziękuję za całą przekazaną mi przez lata wiedzę oraz nieocenioną pomoc w trakcie realizacji badań, redagowaniu artykułów naukowych oraz niniejszej dysertacji.

Dziękuję również wszystkim pracownikom Zakładu Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji oraz Zakładu Chemii Bionieorganicznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi za wsparcie i przyjazną atmosferę w pracy.

Dziękuję mojej najbliższej Rodzinie za okazaną wyrozumiałość i cierpliwość oraz wiarę w moje możliwości, szczególnie w chwilach zwątpienia. Składam wyrazy najgłębszej wdzięczności za każdą, nawet najdrobniejszą pomoc, bez której realizacja niniejszej pracy nie byłaby możliwa.

**Część danych i wyników zawartych w tej rozprawie doktorskiej zostało
opublikowanych w pracy:**

Podsiedlik M, Markowicz-Piasecka M, Sikora J. The Influence of Selected
Antipsychotic Drugs on Biochemical Aspects of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.*
2022; 23(9):4621. doi: 10.3390/ijms23094621

IF = 5,6 MNiSW = 140

Spis treści

Wykaz skrótów.....	11
Część teoretyczna.....	17
1. Wstęp.....	17
2. Dane dotyczące epidemiologii oraz aspekty zdrowia publicznego AD	19
3. Diagnostyka AD	18
4. Patologiczne podstawy AD.....	19
4.1. Hipoteza cholinergiczna AD	21
4.2. Teoria amyloidowa	22
4.3. Teoria białka <i>tau</i>	24
4.4. Stres oksydacyjny	25
5. Farmakoterapia AD.....	26
6. Aktualne kierunki badań nad potencjalnymi lekami mogącymi znaleźć zastosowanie w leczeniu AD.....	34
6.1. Terapia anty-amyloidowa	34
6.2. Terapie ukierunkowane na białko <i>tau</i>	41
6.3. Terapie przeciwzapalne	43
6.4. Terapia neuroprotektoryjna i neuroregeneracyjna	43
6.5. Leki wpływające na równowagę oksydacyjno-redukcyjną	44
6.6. Leki o działaniu metabolicznym.....	45
7. Zastosowanie leków przeciwpsychotycznych w leczeniu AD.....	48
7.1. Behawioralne i psychologiczne objawy demencji.....	48
7.2. Neuroleptyki w leczeniu AD	50
8. Repozycjonowanie leków	55
8.1. Koncepcja repozycjonowania.....	55
8.2. Strategie repozycjonowania.....	57
8.3. Przykłady repozycjonowanych leków.....	58
8.4. Repozycjonowanie leków w leczeniu AD.....	60
Założenia i cel pracy	63
Część badawcza.....	66
9. Materiały i odczynniki.....	66
9.1. Badane związki	66

9.2. Odczynniki	68
10. Materiał biologiczny.....	71
10.1. Przygotowanie osocza	71
10.2. Przygotowanie zawiesiny erytrocytów	71
10.3. Przygotowanie komórek na płytkach 96-dolkowych.....	71
11. Metody.....	72
11.1. Ocena stopnia hamowania aktywności AChE i BuChE przez badane związki oraz wyznaczenie wartości IC ₅₀	72
11.2. Wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej.....	81
11.3. Wyznaczenie synergizmu działania leków	82
11.4. Agregacja β -amyloidu	84
11.5. Hemoliza erytrocytów w warunkach stresu oksydacyjnego.....	93
11.6. Ocena erytrotoksyczności badanych związków	97
11.7. Ocena działania ochronnego badanych związków na erytrocyty w warunkach stresu oksydacyjnego	99
11.8. Potencjał antyoksydacyjny leków przeciwpsychotycznych w modelu hodowli komórkowej	102
12. Wyniki	107
12.1. Ocena stopnia hamowania aktywności AChE i BuChE przez badane związki oraz wyznaczenie wartości IC ₅₀	107
12.2. Wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej.....	116
12.3. Wyznaczenie synergizmu działania leków	122
12.4. Ocena interakcji mieszaniny binarnej z użyciem programu ComboSyn	131
12.5. Agregacja A β	139
12.6. Potencjał antyoksydacyjny badanych związków w modelu erytrocytarnym	144
12.7. Potencjał antyoksydacyjny leków przeciwpsychotycznych w modelu hodowli komórkowej	151
Podsumowanie wyników i próba oceny zależności aktywności badanych leków przeciwpsychotycznych od ich struktury chemicznej	160
Dyskusja wyników	166
Wnioski	184
Streszczenie w języku polskim.....	186
Streszczenie w języku angielskim	189
Piśmiennictwo.....	192

Spis rysunków, tabel i wykresów	220
Dorobek naukowy	231
Załączniki do pracy	234

Wykaz skrótów

5-HT	(ang. 5-hydroxytryptamine) serotonina
AA	(ang. ascorbic acid) kwas askorbinowy
AAPH	dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-metylopropionamidyny)
ACh	(ang. acetylcholine) acetylocholina
AChE	(ang. acetylcholinesterase) acetylocholinoesteraza
AChEIs	(ang. acetylcholinesterase inhibitors) inhibitory acetylocholinoesterazy
AD	(ang. Alzheimer's disease) choroba Alzheimerera
ADAM10	(ang. a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10) domena dezintegryny i metaloproteinazy zawierająca białko 10
ADHD	(ang. attention deficit hyperactivity disorder) zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi
ADI	Alzheimer's Disease International
aHTN	(ang. antihypertensives) leki przeciwnadciśnieniowe
APP	(ang. amyloid precursor protein) białkowy prekursor amyloidu
ARB	(ang. angiotensin receptor blockers) blokery receptora angiotensyny
ARIA	(ang. amyloid-related imaging abnormalities) nieprawidłowości w obrazowaniu mózgu związane z amyloidem
ARIA-E	(ang. amyloid-related imaging abnormalities – oedema) nieprawidłowości w obrazowaniu mózgu związane z amyloidem - obrzęki
ARIA-H	(ang. amyloid-related imaging abnormalities – haemorrhages) nieprawidłowości w obrazowaniu mózgu związane z amyloidem – krwotoki
AT1	(ang. angiotensin 1) angiotensyna 1
ATC	(ang. acetylthiocholine) acetylotiocholina

A β	(ang. amyloid beta) β -amyloid
BACE1	(ang. β -amyloid cleaving enzyme 1) β -sekretyza 1
BEHAVE-AD	(ang. Behavioral Pathology in Alzheimer's Disease Rating Scale) skala Oceny Zaburzeń Zachowania w Chorobie Alzheimer'a
BPSD	(ang. behavioral and psychological symptoms of dementia) behawioralne i psychologiczne objawy demencji
BTC	(ang. butyrylthiocholine) butyrylotiocholina
BuChE	(ang. butyrylcholinesterase) butyrylocholinoesteraza
CAS	(ang. catalytic active site) katalityczne miejsce anionowe
CDR-SB	(ang. Clinical Dementia Rating Scale Sum of Boxes) Kliniczna Skala Oceny O \acute pienia - Suma Pudełek.
CGI-S	(ang. Clinical Global Impression–Severity) skala Ogólnej Oceny Klinicznej
ChAT	(ang. acetyltransferase choline) acetylotransferaza cholinowa
ChEIs	(ang. cholinesterase inhibitors) inhibitory cholinoesteraz
COX	(ang. cyclooxygenase) cyklooksygenaza
CoQ10	(ang. coenzyme Q10) koenzym Q10
CR	(ang. Congo red) czerwien Kongo
CRABP	(ang. cellular retinoic acid-binding protein) komórkowe białko wiążące kwas retinowy
CRP	(ang. C-reactive protein) białko C-reaktywne
CSF	(ang. cerebrospinal fluid) płyn mózgowo-rdzeniowy
CYP2D6	(ang. cytochrome) cytochrom P450 2D6
CYP3A4	(ang. cytochrome) cytochrom P450 3A4
DHA	(ang. docosahexaenoic acid) kwas dokozaheksaenowy

DM2	(ang. diabetes mellitus 2) cukrzyca typu 2
DMT	(ang. disease-modifying therapy) terapia modyfikująca przebieg choroby
DTNB	(ang. 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy)
EOAD	(ang. early-onset Alzheimer disease) choroba Alzheimera o wczesnym początku
EMA	(ang. European Medicines Agency) Europejska Agencja Leków
EPS	(ang. extrapyramidal symptoms) objawy pozapiramidowe
FDA	(ang. Food and Drug Administration) Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków
FTIR	(ang. Fourier-transform infrared spectroscopy) spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
GABA	(ang. gamma-aminobutyric acid) kwas gamma-aminomasłowy
GLP-1	(ang. glucagon-like peptide-1) peptyd glukagonopodobny-1
GSK-3	(ang. glycogen synthase kinase 3) syntaza glikogenu 3
GSM	(ang. γ -secretase modulators) modulatory γ -sekreazy
GSM-I	(ang. first-generation γ -secretase modulators) modulatory γ -sekreazy pierwszej generacji
GSM-II	(ang. second-generation γ -secretase modulators) modulatory γ -sekreazy drugiej generacji
hChEs	(ang. human cholinesterases) ludzkie cholinoesterazy
HgbA1c	(ang. haemoglobin-A1c) hemoglobina A1c
HHE	(ang. 4-hydroxyhexenal) 4-hydroksyheksenal
HNE	(ang. 4-hydroxynonenal) 4-hydroksynonenal
HUVEC	(ang. Human Umbilical Vein Endothelial Cells) ludzkie komórki śródbłonna z żyły pępowinowej

IC ₅₀	(ang. half maximal inhibitory concentration) wartość stężenia hamującego aktywność enzymów w 50%
IGF-1	(ang. insulin-like growth factor-1) insulinopodobnego czynnika wzrostu-1
IL-1	(ang. interleukin-1) interleukina-1
IL-6	(ang. interleukin-6) interleukina-6
IL-18	(ang. interleukin-18) interleukina-18
LMTM	(ang. leuco-methylthioninium bis(hydromethanesulfonate)) bis(hydroksymetanosulfonian leuko-metylotioniny)
mAb	(ang. monoclonal antibodies) przeciwciała monoklonalne
mAChR	(ang. muscarinic acetylcholine receptor) receptor muskarynowy
MAO A	(ang. monoamine oxidase A) oksydaza monoaminowa, izoenzym A
MAP	(ang. microtubule associated protein) białko związane z mikrotubulami
MCI	(ang. mild cognitive inpairment) łagodne upośledzenie funkcji poznawczych
MCP-1	(ang. monocyte chemotactic protein 1) białko chemotaktyczne monocytów
MDD	(ang. major depressive disorder) ciężkie zaburzenia depresyjne
MRI	(ang. magnetic resonance imaging) magnetyczny rezonans jądrowy
MT	(ang. microtubules) microtubule
nAChR	(ang. nicotinic acetylcholine receptor) receptor nikotynowy
nbM	(ang. nucleus basalis of Meynert) jądro podstawne Meynert'a
NFT	(ang. neurofibrillary tangles) splątki neurofibrylarne
NIRF	(ang. near-infrared fluorescence) obrazowanie fluorescencyjne w bliskiej podczerwieni
NMDA	(ang. N-methyl-D-aspartic acid) kwas N-metylo-D-asparaginowy

NLPZ	(ang. NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs) niesteroidowe leki przeciwzapalne
NPI	(ang. Neuropsychiatric Inventory) skala oceny neuropsychiatrycznej
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PAS	(ang. peripheral anionic site) peryferyjne miejsce anionowe
PD	(ang. Parkinson's disease) choroba Parkinsona
PDD	(ang. phenotypic drug discovery) poszukiwanie leku bazujące na screeningu fenotypowym
PDE3	(ang. phosphodiesterase 3) fosfodiesteraza 3
PDE5	(ang. phosphodiesterase 3) fosfodiesteraza 5
PET	(ang. positron emission tomography) pozytonowa tomografia emisyjna
PI3K	(ang. phosphoinositide 3-kinase) kinaza 3-fosfatydyloinozytolu
PKC	(ang. protein kinase C) kinaza białkowa C
PPAR- γ	(ang. peroxisome proliferators-activated receptor γ) receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów γ
PSEN1	(ang. presenilin) presenilina 1
PSEN2	(ang. presenilin) presenilina 2
PTSD	(ang. post-traumatic stress disorder) zespół stresu pourazowego
R&D	(ang. research and development) badania i rozwój
RAGE	(ang. receptor for advanced glycation end products) receptory końcowych produktów zaawansowanej glikacji
RBC	(ang. red blood cells) czerwone krwinki krwi
rhAChE	(ang. recombinant human acetylcholinesterase) rekombinowana ludzka acetylocholinoesteraza
ROS	(ang. reactive oxygen species) reaktywne formy tlenu

SGLT-2	(ang. sodium-glucose co-transporter 2) kontransporter glukozy i sodu typu 2
SPECT	(ang. single photon emission computer tomography) tomografia emisyjna pojedynczego fotonu
STD	(ang. saturation transfer difference) różnica transferu nasycenia
SUVR	(ang. standardized uptake value ratio) wartość standaryzowanego współczynnika wychwytu
TDD	(ang. target-based drug discovery) opracowywanie leków na podstawie celu
TEM	(ang. transmission electron microscopy) transmisyjna mikroskopia elektronowa
ThT	(ang. thioflavin T) tioflawina T
TNB ⁻	(ang. 5-thio-(2-nitrobenzoate) ion) jon 5-tio-(2-nitrobenzoesanowy)
TNF- α	(ang. tumor necrosis factor α) czynnik martwicy nowotworów
TPC	(ang. therapeutic plasma concentration) terapeutyczne stężenie w osoczu

Część teoretyczna

1. Wstęp

Choroba Alzheimera (AD, Alzheimer's disease), należąca do nieodwracalnych i postępujących chorób neurologicznych [1], jest najczęstszą przyczyną demencji, powodując ogromne cierpienie zarówno pacjentów, jak również ich rodzin. AD charakteryzuje się zaburzeniami zachowania, opóźnieniem myślenia i postępującą utratą pamięci [2,3]. AD jest złożoną chorobą o heterogennej etiologii, jednak dokładna jej przyczyna pozostaje nieznana [1]. Istnieje kilka koncepcji opisujących czynniki przyczyniające się do rozwoju AD, z których wiodącymi są hipoteza β -amyloidu ($A\beta$), hipoteza propagacji białka *tau*, hipoteza cholinergiczna oraz hipoteza stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego [2,3]. W oparciu o te hipotezy podjętych zostało wiele prób opracowania leków przeciw AD, jednak przez wiele lat tylko pięć preparatów zostało zatwierdzonych przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, Food and Drug Administration) do leczenia tej choroby. Substancje te należą głównie do inhibitorów acetylocholinoesterazy (AChEIs, acetylcholinesterase inhibitors). Pierwszym zarejestrowanym lekiem z tej grupy była takryna, która została wycofana z użycia w Polsce. Kolejnymi lekami należącymi do AChEIs są: donepezil, rywastygmina, galantamina, którymi leczy się podstawowe objawy AD, tj. utratę pamięci i zaburzenia poznawcze. Alternatywę dla nich stanowi memantyna - antagonistą receptora kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA) wskazana w umiarkowanej i ciężkiej postaci AD [4,5]. Dopiero na początku 2021 oraz 2023 roku zostały zatwierdzone kolejne dwie substancje do leczenia AD, które działają na podstawową przyczynę choroby, a mianowicie redukcją gromadzenie w mózgu złogów $A\beta$. Aducanumab oraz lecanemab, będące przeciwciałami monoklonalnymi, zostały zatwierdzone przez FDA w trybie przyspieszonym, dlatego też konieczna jest kontynuacja badań nad skutecznością i bezpieczeństwem tych substancji w farmakoterapii AD [6,7]. Niemniej jednak, AD towarzyszą również inne trudne do leczenia objawy behawioralne, takie jak agresja, pobudzenie, problemy ze snem, depresja czy psychozy [8]. Leki z grupy AChEIs oraz memantyna odgrywają pomocniczą rolę w łagodnej psychozie u osób z AD, jednak są one niewystarczające do leczenia ciężkich objawów psychotycznych [9]. Często koniecznością jest włączenie leków przeciwpsychotycznych, zwłaszcza tych z grupy atypowych, które wydają się

być użytecznymi środkami terapeutycznymi w łagodzeniu objawów psychozy i pobudzenia w AD [9,10]. Ze względu na różne sposoby wiązania się z receptorami, atypowe leki przeciwpsychotyczne mają mniejsze ryzyko wywołania objawów pozapiramidowych, takich jak sztywność mięśni, spowolnienie ruchowe, drżenie i problemy z chodzeniem. Substancjami najczęściej przepisywanymi z tej grupy są kłozapina, rysperidon, olanzapina, natomiast z pierwszej grupy – haloperidol [10]. Z leków oficjalnie zatwierdzonych w Europie do leczenia zaburzeń zachowania oraz uporczywej agresji u pacjentów z otępieniem typu alzheimerowskiego o umiarkowanym i ciężkim nasileniu jest rysperidon [11]. Pozostałe leki przeciwpsychotyczne w tym kwetiapina czy olanzapina są przepisywane „poza wskazaniami”. Kwetiapina rzadziej wywołuje poważne działania niepożądane, takie jak objawy pozapiramidowe i późne dyskinezy, w porównaniu z innymi lekami przeciwpsychotycznymi, dlatego też jest często stosowana w leczeniu objawów neuropsychiatrycznych w AD [12]. Natomiast w terapii urojeń, halucynacji, lęku i pobudzenia u chorych na AD korzystna okazała się olanzapina [13]. Zastosowanie leków „*off label*” może mieć szereg zalet w porównaniu ze standardowym opracowywaniem leków *de novo*, szczególnie biorąc pod uwagę czas wprowadzania nowego leku na rynek oraz koszty z tym związane [14]. Zmiana przeznaczenia leku znana również pod pojęciami repozycjonowania czy reprofilingu leków w ostatnich latach cieszy się coraz większym zainteresowaniem wśród firm farmaceutycznych przede wszystkim ze względów ekonomicznych. Strategia ta umożliwia znalezienie nowej aktywności biologicznej dla leków już zarejestrowanych, jak również nowych wskazań do dalszych testów dla cząsteczek, które zostały odrzucone w badaniach klinicznych [15]. W świetle ostatnich doniesień Kumara i współautorów [16], którzy wykorzystali obliczeniowe metody do predykcji nowych wskazań leków, niektóre leki przeciwpsychotyczne mogą wykazywać aktywność przeciwko celom związanym z leczeniem AD, takim jak neurotransmisja cholinergiczna, tworzenie $A\beta$ czy odkładanie się białka *tau* [16]. Badania dokowania molekularnego obejmowały m.in. chlorowodorek promazyny, bromperidol, melperon, pimozyd, benperidol, anisoperydon. Obiecującą interakcję z acetylocholinoesterazą (AChE) wykazał pimozyd, z butyrylocholinoesterazą (BuChE) – bromperidol, natomiast melperon z oksydazą monoaminową (MAO A, monoamine oxidase A), anizopirol z receptorem NMDA, z kolei anisoperydon i benperidol z β -sekretazą 1 (BACE 1, β -amyloid cleaving enzyme 1) [16]. Ze względu na możliwość wystąpienia fałszywie dodatnich

wyników otrzymanych w komputerowych badaniach przesiewowych, czy też wystąpienia różnic potencjalnych aktywności leku w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, istnieje konieczność wykonania dalszych badań weryfikujących możliwość wykorzystania leków przeciwpsychotycznych w leczeniu AD.

2. Dane dotyczące epidemiologii oraz aspekty zdrowia publicznego AD

AD charakteryzująca się utratą neuronów, jest najczęstszą przyczyną otępienia osób w wieku podeszłym. Ocenia się, że około 6–10 % osób powyżej 65 roku życia jest dotkniętych AD, która powoduje narastające z czasem zaburzenia wszystkich funkcji psychicznych [17]. Według Alzheimer's Disease International (ADI), co trzy sekundy na świecie u kogoś rozwija się demencja. Szacuje się, że 55 milionów osób cierpi na demencję, z czego aż od 15 do 21 milionów przypadków stanowi AD [18,19]. Istotnym jest fakt, iż liczba pacjentów rośnie, podwajając się co 20 lat, w związku z tym w 2050 roku populacja chorych na AD może liczyć nawet ok. 131,5 miliona [20,21].

Pomimo upływu ponad 90 lat od opisanego przez Aloisa Alzheimera pierwszego przypadku otępienia i ogromnego postępu wiedzy w dziedzinie nauk medycznych, choroba ta nadal zaliczana jest do nieuleczalnych. Symptomy AD zależą od stadium choroby, które można podzielić na kolejne fazy: bezobjawową (początkową), wczesną (łagodną), umiarkowaną oraz chorobę zaawansowaną, w zależności od stopnia upośledzenia funkcji poznawczych [22]. Przebieg demencji oraz wpływ na zachowanie chorego przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Przebieg demencji i wpływ na zachowanie chorego [22,23].

EFEKT CHOROBY	FAZA POCZĄTKOWA	FAZA WCZESNA	FAZA UMIARKOWANA	CHOROBA ZAAWANSOWANA
<i>Pamięć</i>	Regularne zapominanie drobnych spraw, np. gubienie się na znajomej drodze.	Zauważalny zanik krótkotrwałej pamięci mający znaczący wpływ na codzienne życie, np. osoba chora zapomina rozkład mieszkania.	Znaczący zanik pamięci, chory przywołuje tylko stare wspomnienia, nowe informacje są szybko zapominane.	Zaawansowany zanik pamięci, tylko fragmenty starych wspomnień mogą być przywołane.
<i>Orientacja w czasie i przestrzeni</i>	Ogólnie dokładna i przejrzysta. Zmniejszona zdolność skupienia się, powtarzanie się, podejrzliwość i niepokój w stosunku do partnera.	Dezorientacja w datach, czasie, mylenie miejsc, gubienie się, trudność w rozpoznawaniu znajomych osób.	Znaczące trudności w rozpoznawaniu czasu, miejsc, osób, trudności w znajdowaniu właściwych słów, huśtawki nastroju, błędzenie.	Osoba chora myli lub nie rozpoznaje znajomych i najbliższej rodziny, może nie być w stanie chodzić i mówić. Brak rozpoznania różnicy między dniem i nocą.
<i>Podjęcie decyzji i rozwiązywanie problemów</i>	Zmniejszona zdolność do rozwiązywania problemów.	Trudności w zarządzaniu własnością i finansami, w prowadzeniu samochodu.	Postępująca niezdolność do podejmowania decyzji i zarządzaniu własnością, niekontrolowane zachowania seksualne, rozdrażnienie i frustracja w nowych sytuacjach.	Niezdolność do oceny sytuacji i podejmowania decyzji, poważna depresja często idąca w parze z rozdrażnieniem i psychozą.
<i>Uczestniczenie w życiu społecznym</i>	Pewne trudności w komunikacji, które utrudniają uczestnictwo w życiu towarzyskim i społecznym.	Trudności w znajdowaniu właściwych słów i śledzeniu rozmowy, osoba chora potrzebuje wsparcia w sytuacjach towarzyskich.	Brak zainteresowania i chęci do uczestniczenia w zajęciach towarzyskich, zauważalne trudności w porozumiewaniu się, osoba chora wymaga ciągłego nadzoru.	Bardzo ograniczona zdolność do kontaktów towarzyskich, nawet z pomocą. Poważnie upośledzona mowa, niepokój, agresja.
<i>Życie domowe, zainteresowania</i>	Małe zmiany w kontynuowaniu zainteresowań, hobby i zajęć domowych.	Trudności w samodzielnym funkcjonowaniu w domu, rozpoczynaniu i kończeniu zajęć.	Zdolność do wykonywania tylko najprostszych czynności, brak zainteresowania zajęciami domowymi i hobby, częsta depresja.	Utrata orientacji we własnym domu.

Niezwykle istotny w przypadku AD jest fakt, że choroba ta oprócz samego chorego, dotyczy również jego najbliższych, którzy przejmują szereg obowiązków socjalnych i finansowych chorego, ponieważ ten, ze względu na postępującą chorobę, traci zdolność do samodzielnego funkcjonowania [24,25]. AD generuje bardzo duże koszty w europejskich systemach zdrowotnych. Należą do nich koszty bezpośrednie, w tym hospitalizacja, opieka pielęgniarska i lekarska w domu lub w placówkach opiekuńczo-pielęgnacyjnych oraz pośrednie, w tym utrata możliwości podjęcia pracy [25].

3. Diagnostyka AD

Mimo rozwoju nowych metod diagnostycznych rozpoznanie AD następuje często zbyt późno - w drugiej lub nawet w trzeciej fazie choroby, która pozostaje w stadium przedklinicznym przez wiele lat i postępując stopniowo, niszczy układ limbiczny mózgu. Postępowanie diagnostyczne zarówno w identyfikacji, jak i różnicowaniu chorób neurodegeneracyjnych jest procesem złożonym. Diagnoza AD składa się z wielu elementów: oceny epidemiologicznej, neuropsychologicznej, elektro- i magnetoencefalograficznej oraz neuroobrazowania [26].

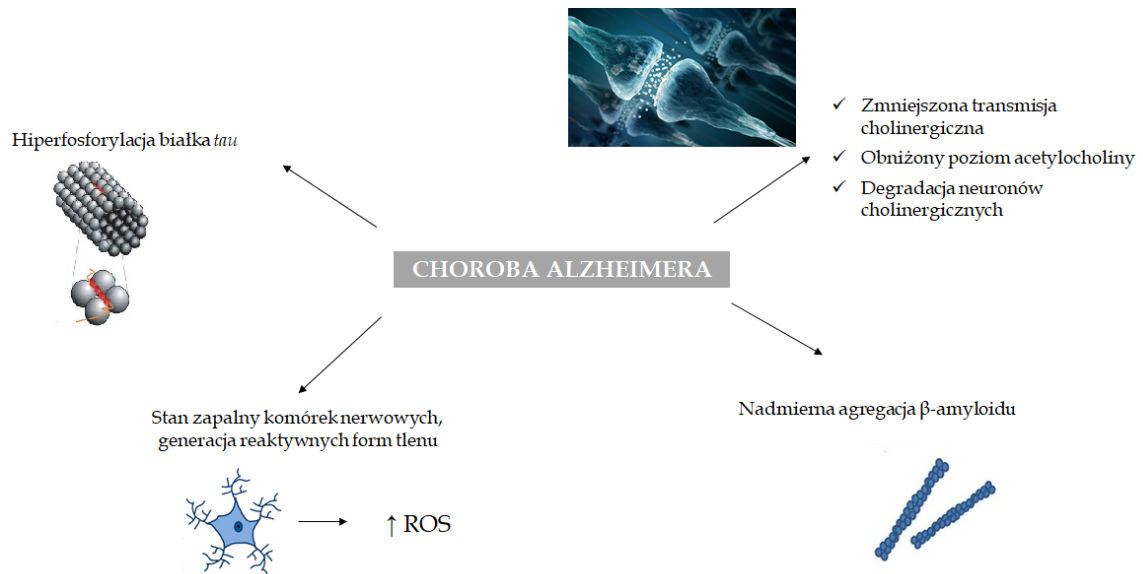
Do obrazowania mózgu oraz oceny zmian metabolizmu neuronalnego stosowane są: tomografia emisyjna pojedynczego fotonu (SPECT, single photon emission computer tomography), która określa przepływ krwi przez naczynia mózgowe, pozytonowa tomografia emisyjna (PET, positron emission tomography) oraz magnetyczny rezonans jądrowy (MRI, magnetic resonance imaging). Metody te służą do identyfikacji dysfunkcji mózgu i diagnostyki różnicowej, która pozwala na określenie stopnia i topografii zwyrodnień neuronalnych oraz na wykluczenie obecności guza lub krwaka i tym samym występowania otępienia naczyniopochodnego [27]. W przypadku rodzinnego występowania choroby istnieje możliwość wykonania innych badań, w tym analizy molekularnej genów preseniliny 1 (PSEN1) czy preseniliny 2 (PSEN2), których mutacje (np. p.A136V) zidentyfikowano u pacjentów z AD o wczesnym początku (EOAD, early-onset Alzheimer disease) [28].

Aktualne kierunki badań dotyczące diagnostyki AD koncentrują się na poszukiwaniu wskaźników użytecznych do wykrycia nowych, przedklinicznych oznak choroby, co jest niezmiernie istotne dla odpowiednio wczesnych interwencji terapeutycznych.

Dotychczas nie istnieje swoisty biochemiczny wskaźnik AD, za pomocą którego można wcześniej wykryć chorobę i szybko zastosować odpowiednią terapię. Wśród czynników wskazujących na rozwój AD znajdują się: obniżone stężenie peptydów $A\beta$: $A\beta_{42/43}$ i stosunku $A\beta_{42/40}$ w płynie mózgowo-rdzeniowym. Nie znaleziono korelacji między $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$ w płynie mózgowo-rdzeniowym i w osoczu ani związku z wiekiem, płcią, ale wykazano istotną korelację między α_1 -chymotrypsyną w płynie mózgowo-rdzeniowym i w osoczu (przejście przez barierę krew-mózg). Peptydy $A\beta$ we krwi mogą więc pochodzić z innego źródła niż płyn mózgowo-rdzeniowy, jednak u 10–20% chorych na AD stwierdza się zwiększone stężenie $A\beta_{42}$ we krwi. Kolejnym wskaźnikiem mogącym świadczyć o rozwoju AD jest stężenie białka *tau* we krwi. Interdyscyplinarny zespół badaczy, wykazał, że podwyższony poziom osoczkowego białka *p-tau217* jest obiecującym wskaźnikiem w zakresie diagnostyki AD, podobnie do badania płynu mózgowo-rdzeniowego czy badania PET. Autorzy stwierdzili, że badanie to z wysoką skutecznością umożliwia odróżnienie AD od innych chorób neurodegeneracyjnych [29,30].

4. Patologiczne podstawy AD

Etiologia AD jest wysoce złożona, jednakże istnieje kilka charakterystycznych cech patologicznych w obrębie mózgu, które zostały scharakteryzowane (Rysunek 1). Wśród nich można wymienić: zmniejszoną aktywność acetylotransferazy cholinowej w korze mózgowej i hipokampie, degradację neuronów cholinergicznych, co skutkuje obniżonym poziomem acetylocholino, obecność mózgowych blaszek starczych powstałych w wyniku odkładania się $A\beta$, tworzenie się skręconych włókien ufosforylowanego białka *tau* wewnątrz neuronów, stan zapalny oraz stres oksydacyjny. Te cechy patologiczne stały się punktem wyjściowym do poszukiwań leków przeciwko AD, jednak do tej pory dostępne na rynku preparaty jedynie łagodzą objawy choroby i poprawiają komfort życia pacjentów [3,31-35].



Rysunek 1. Czynniki biorące udział w patogenezie AD. Opracowanie własne na podstawie [36], z wykorzystaniem programu BioRender (<https://www.biorender.com>).

Warto podkreślić, że wyżej wymienione czynniki mogą indukować powstawanie kolejnych, tworząc różnego rodzaju zależności. Na przykład agregacja $A\beta$, hiperfosforylacja białka τ i powstawanie splątków neurofibrylarnych (NFT, neurofibrillary tangles) wewnątrz neuronów wiążą się również z indukcją stresu oksydacyjnego i wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (ROS, reactive oxygen species) [37-39]. Z kolei, uszkodzenie oksydacyjne w mózgu pacjentów z AD powoduje nieprawidłową akumulację $A\beta$ i odkładaniem się NFT [40,41]. Ponadto, przyspieszona preagregacja $A\beta$ związana jest z dysfunkcją neuronów cholinergiczných w mózgu. Jak dowodzą ostatnio przeprowadzone badania, enzymy rozkładające acetylocholinę (ACh, acetylcholine), a mianowicie AChE i BuChE, indukują agregację włókien $A\beta$ [42]. Istnieją także przesłanki, że AD może być traktowana jako choroba metaboliczna, w której komórki nerwowe stają się niezdolne do efektywnego metabolizowania glukozy. Na podstawie wyników badań klinicznych, wskazano możliwość rozwoju insulinooporności w mózgu, a co za tym idzie - osłabienie odpowiedzi komórek nerwowych na insulinę w niektórych częściach ośrodkowego układu nerwowego (OUN) chorych pacjentów [43].

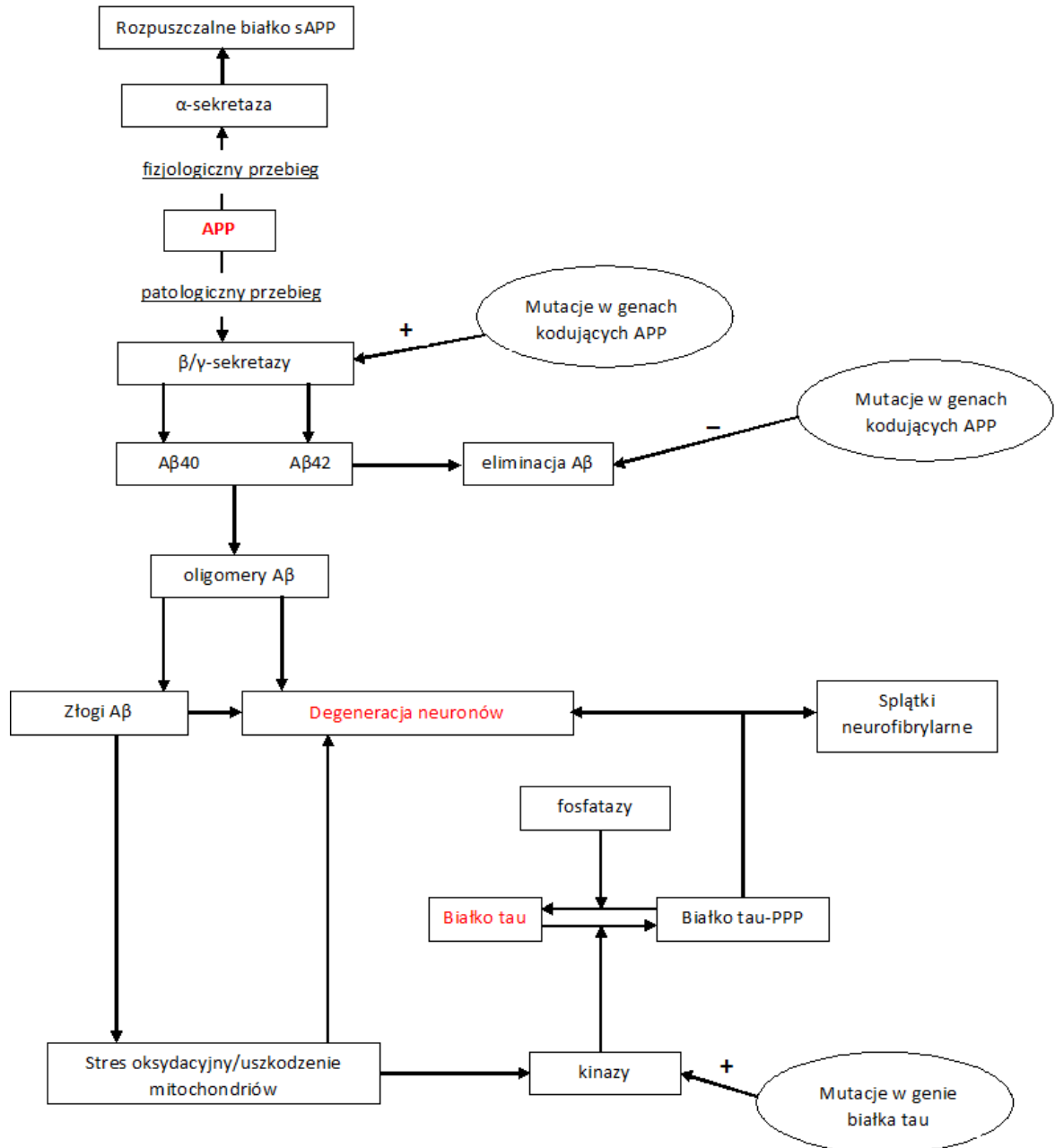
4.1. Hipoteza cholinergiczna AD

Jedną z hipotez, które opisują przyczynę AD jest hipoteza cholinergiczna, która oparta jest o proces degradacyjny prowadzący do uszkodzenia grup neuronów cholinergicznym w hipokampie, korze czołowej, ciele migdałowatym, jądrze podstawnym i przegrodzie przysiódkowej. Zaburzenie prawidłowego działania tych regionów skutkuje upośledzeniem świadomości, pamięci i zdolności poznawczych [3,35,44]. Badania kliniczne wskazują na słuszność tej hipotezy jako jednego z czynników przyczyniającego się do rozwoju AD [35,44,45]. Stwierdzono dodatnią korelację nasilenia otępienia w AD ze stopniem utraty przekaźnictwa cholinergicznego i wykazano, że AChEIs, mogą prowadzić do poprawy funkcji poznawczych u tych pacjentów [35,45,46]. Co więcej, badania wykazały, że degeneracja neuronów cholinergicznym w jądrze podstawnym Meynert'a (nbM, nucleus basalis of Meynert) w podstawnej części przodomózgowia jest obecna już w bardzo wczesnych stadiach AD, a jej zakres nawet na etapie przed śmiercią komórki, jest ściśle związany z deficytami poznawczymi [46-48]. Hipoteza cholinergiczna opiera się również na kolejnych dwóch dowodach, mówiących o poważnym zubożeniu presynaptycznym markerów cholinergicznym w korze mózgowej oraz zaburzeniach pamięci wywołanymi przez antagonistów cholinergicznym i łagodzeniu tych objawów przez agonistów cholinergicznym [46-48]. ACh pełni funkcję istotnego neuroprzekaźnika, który jest wykorzystywany przez neurony cholinergiczne do krytycznym procesów fizjologicznym, takich jak pamięć, reakcja na stres, uczenie się, czuwanie i sen [3,49,50]. Uszkodzenie neuronów cholinergicznym uznano zatem za powiązane z upośledzeniem funkcji poznawczym występującym w AD [3]. Podsumowując, w mózgu osoby cierpiącej na AD, neurotransmisja cholinergiczna zmniejsza się na skutek kilku mechanizmów, takich jak: obniżenie aktywności enzymu biorącego udział w syntezie acetylocholin – acetylotransferazy cholinowej (ChAT, acetyltransferase choline), zmniejszenie uwalniania ACh do szczeliny synaptycznej, zmniejszenie zwrotnego wychwytu ACh, degeneracji komórek nerwowych w nbM i istocie bezmiennej. Dodatkowe kierunki badań wskazały również możliwość wpływu wyżej wymienionych zmian cholinergicznym na patogenezę AD poprzez złożone i słabo poznane oddziaływanie na amyloidogenezę, fosforylację białka *tau* i neuroplastyczność [46]. Chociaż zmiany w innych neuroprzekaźnikach korowych takich jak dopamina, histamina, noradrenalina były także odnotowywane w AD,

to jednak przegląd literaturowy donosi, że zmiany cholinergiczne występują znacznie wcześniej, są bardziej rozpowszechnione, a zarazem bardziej spójne niż zmiany patologiczne pozostałych neuroprzekaźników [3,46]. Teoria cholinergiczna AD doprowadziła do rozwoju AChEIs, które mogą przywrócić funkcję cholinergiczną poprzez blokowanie AChE, w konsekwencji zwiększając dostępność ACh w szczelinie synaptycznej [32]. Na tej podstawie wprowadzono do leczenia takrynę (obecnie wycofaną z leczenia z powodu działań niepożądanych) oraz pozostałe substancje o tym mechanizmie działania – donepezyl, rywastygminę i galantaminę. Leki te, mimo iż stanowią podstawę w leczeniu AD, łagodzą jedynie objawy choroby [3,48].

4.2. Teoria amyloidowa

W mózgu zdrowej osoby, białkowy prekursor amyloidu (APP, amyloid precursor protein) jest metabolizowany za pośrednictwem α -sekretazy do rozpuszczalnego białka sAPP posiadającego funkcję czynnika wzrostu [51]. W przypadku AD, APP ulega cięciu przez β - lub γ -sekretazy w innych miejscach, w wyniku czego powstają peptydy $A\beta_{40}$ i $A\beta_{42}$, które kumulują się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a ich usuwanie jest ograniczone. Zwłaszcza ta druga postać występuje w większym stopniu u pacjentów z AD i ma zdolność do agregacji (Rysunek 2). To z kolei sprzyja rozwojowi złogów amyloidu, gromadzących się poza neuronami i zaburzających przekazywanie synaptyczne [52]. Dodatkowo $A\beta_{42}$ nasila stres oksydacyjny komórek i indukuje kinazę biorącą udział w fosforylacji białka *tau* [5,53]. Nadmierna fosforylacja białka *tau* manifestuje się powstawaniem wewnątrzkomórkowych splotów neurofibrylarnych, które wraz z $A\beta$ wywierają działanie neurotoksyczne prowadzące do śmierci komórek nerwowych czyli wobec tego do neurodegeneracji [54]. Aktualne badania kliniczne wskazują także na powiązanie szlaku cholinergicznego z tworzeniem złogów amyloidowych poprzez sekretazy [34]. Co istotne, wykazano, że mutacje w genach kodujących APP oraz PSN wzmocniają metabolizm APP drogą β - lub γ -sekretazy, co sprzyja powstawaniu $A\beta_{42}$ [51,54].



Rysunek 2. Rola APP oraz białka tau w patogenezie AD. Opracowanie własne na podstawie [55].

Teoria amyloidowa, obok teorii cholinergicznej, stanowi kluczową rolę w patogenezie AD, stąd też $A\beta$ od dawna postrzegany jest jako potencjalny cel dla poszukiwania nowych leków, które mogłyby znaleźć zastosowanie w farmakoterapii AD. Najbardziej bezpośrednią strategią jest zmniejszenie wytwarzania $A\beta$ poprzez hamowanie β - i γ -sekretazy [3]. Nadrzędnym problemem są kwestie bezpieczeństwa. W przypadku ukierunkowania potencjalnego leku na sekretazę γ niepożądane skutki uboczne są nieuniknione ze względu na jej fizjologiczne substraty, np. białko

sygnałowe Notch, które jest niezbędne w prawidłowym procesie biologicznym. Białka Notch tworzą rodzinę receptorów błonowych, które kontrolują przeznaczenie różnicujących się komórek. U ssaków zaangażowane one są w procesy neurogenezy, somitogenezy oraz angiogenezy, w tym również w różnicowanie i regulację funkcji limfocytów T i B [56,57]. Podobnie, ukierunkowanie leków na hamowanie β -sekreazy narażone jest również na wystąpienie działań niepożądanych, ze względu na duże centrum aktywne tego enzymu, przez co jest mało prawdopodobne, aby strukturalnie duże związki potrzebne do hamowania aktywności β -sekreazy przekroczyły barierę krew-mózg [3,58]. Istotny w rozwoju leków anty-amyloidowych może być również fakt, że u części pacjentów chorujących na AD nie obserwuje się zwiększonego poziomu APP. Poza tym izoformy $A\beta$ mogą również służyć jako endogenne pozytywne regulatory uwalniania neuroprzekazników w synapsach hipokampa. Zatem hamowanie wytwarzania $A\beta$, jako strategia w leczeniu AD może napotkać wiele wyzwań [3].

4.3. Teoria białka tau

Białko *tau* należy do grupy białek związanych z mikrotubulami (MAP, microtubule associated protein), których główna funkcja to regulacja aktywności mikrotubul (MT, microtubules) w cytoszkielecie komórkowym. Prawidłowe funkcjonowanie białka *tau* warunkuje zachowanie optymalnego procesu transportu neuroprzekazników i hormonów wzdłuż wypustek aksonalnych oraz podziału w wyniku regulowania aktywności MT [59].

W warunkach fizjologicznych, białko *tau* występuje w równowadze dynamicznej między formą ufosforylowaną a defosforylowaną (Rysunek 2). Cząsteczki białka wiążą się krótkotrwale z MT i ulegają fosforylacji przez swoiste kinazy, dzięki czemu białko odłącza się od MT. W kolejnym etapie, ufosforylowane białko *tau* ulega defosforylacji w wyniku aktywności odpowiednich fosfataz. Konsekwencją tej zmiany jest ponowne połączenie się białka *tau* z MT [60].

Zaburzona równowaga między formą ufosforylowaną, a defosforylowaną białka *tau* skutkuje tworzeniem NFT, które zbudowane są z podwójnie skręconych włókienek, których głównym składnikiem jest hiperfosforylowane białko *tau* [61]. Proces formowania się NFT może być inicjowany kilkoma czynnikami, do których należą: czynniki genetyczne, stres oksydacyjny, stan zapalny w OUN, trucizny bądź zaburzone

przemiany węglowodanowo-lipidowe [62]. Wyniki badań wskazują, że to złoże zewnątrzkomórkowego amyloidu pojawiają się jako pierwsze w przebiegu AD, a hiperfosforylacja białka *tau* jest procesem wtórnym [63]. Co istotne, jak wykazano w zwierzęcym modelu badań, ograniczenie ekspresji białka *tau* może zapobiegać zmianom behawioralnym czy kognitywnym [64]. W związku z powyższym, zmniejszenie procesu neurodegeneracji wywołanej tworzeniem się NFT może stanowić potencjalny cel farmakoterapii AD.

4.4. Stres oksydacyjny

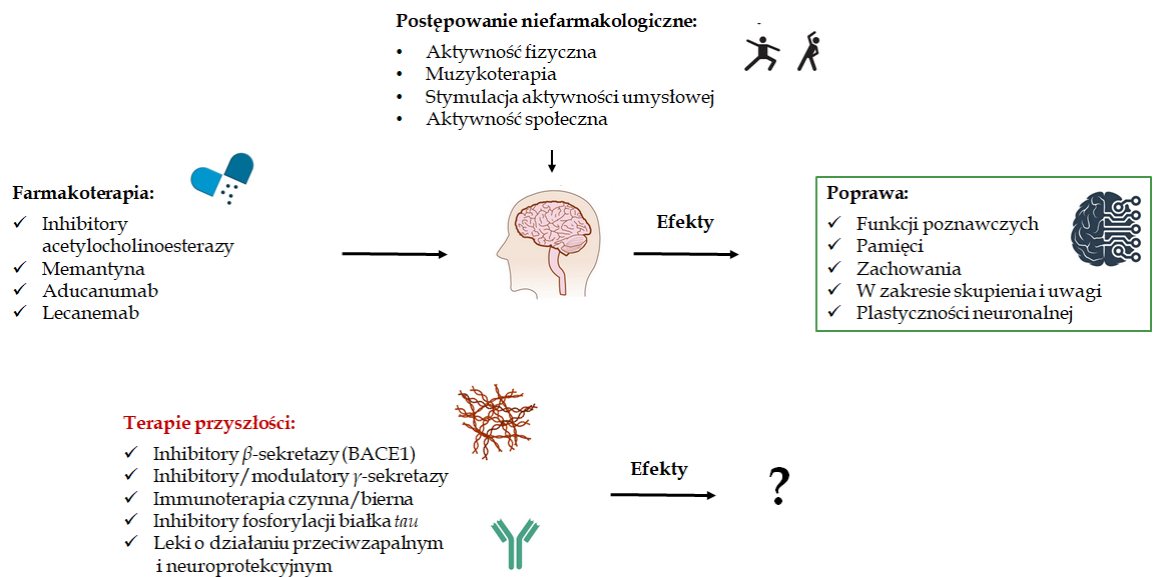
W organizmie, w wyniku zachodzących reakcji dochodzi do powstawania ROS, które posiadają w obrębie powłoki walencyjnej co najmniej jeden niesparowany elektron. Właściwość ta czyni je związkami o wysokiej reaktywności, w związku z czym mogą one uszkadzać struktury komórkowe, takie jak błony biologiczne, enzymy czy kwasy nukleinowe. Stres oksydacyjny, wywołany przez podwyższony poziom ROS lub zmniejszenie aktywności układów antyoksydacyjnych, towarzyszy wielu stanom patologicznym, a jego obecność została potwierdzona w chorobach neurodegeneracyjnych, nowotworowych, chorobach układu sercowo-naczyniowego oraz cukrzycy [65]. Patogeneza AD jest silnie powiązana ze stresem oksydacyjnym na poziomie komórkowym, włączając w to nasilone utlenianie i nitrację białek, glikooksydację i peroksydację lipidów, jak również kumulację $A\beta$ [3]. W związku z powyższym, stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w zmianach degeneracyjnych w AD, jednakże należy podkreślić, że nie jest to mechanizm podstawowy, a należy go traktować jako uzupełnienie patogenezy AD.

Podwyższony poziom $A\beta_{1-40}$ i $A\beta_{1-42}$ związany jest ze zwiększonymi poziomami utleniania białek, lipidów i kwasów nukleinowych oraz jest źródłem nadmiernej generacji ROS w hipokampie i korze mózgowej [66]. Natomiast regiony mózgu, jak np. mózdzek, w których są niskie stężenia $A\beta$ wykazują niskie stężenia markerów stresu oksydacyjnego. Kluczową rolę w wytwarzaniu ROS przez peptydy $A\beta$ w stresie oksydacyjnym odgrywają jony metali, w szczególności miedzi (Cu^{2+}), żelaza (Fe^{3+}). Jony te pełnią rolę wydajnych katalizatorów produkcji ROS. Jony te mogą ulegać redukcji do Cu^+ i Fe^{2+} przez endogennie występujące związki redukujące jak np. askorbinian czy glutation, a następnie reagować z tlenem lub nadtlakiem wodoru,

tworząc odpowiednio rodniki ponadtlenkowe i hydroksylowe. Te same jony metali mogą być także obecne w centrum katalitycznym enzymów antyoksydacyjnych, niszcząc anion ponadtlenkowy i H_2O_2 . W zależności od miejsca koordynacji jony metali mogą być prooksydantami lub przeciwutleniaczami. Z tego względu bardzo ważna jest kontrola metabolizmu tych jonów metali pod kątem stężenia, transportu czy też włączania do miejsc aktywnych. W przypadku braku równowagi może dojść do wzrostu stężenia wolnego lub luźno związanego Cu^{2+} i Fe^{3+} , które są zdolne do katalizowania produkcji ROS. Ponadto, mogą się one wiązać z innymi cząsteczkami i zaburzać ich funkcje, co także może skutkować zwiększeniem stresu oksydacyjnego [66]. Stosowanie związków przeciwutleniających teoretycznie mogłoby zapewnić ochronę przed stresem oksydacyjnym i toksycznością $A\beta$. Ze względu na to, że stres oksydacyjny jest tylko jedną z wielu cech AD strategia antyoksydacyjna została jednak zakwestionowana ze względu na brak zdolności do hamowania progresji AD, dlatego proponuje się ją jako część terapii skojarzonej [3].

5. Farmakoterapia AD

Pomimo ogromnego postępu badań, metod diagnostyki i częściowego poznania patogenezы AD, w dalszym ciągu nie dysponujemy leczeniem przyczynowym tej choroby. Strategie profilaktyczne, stosowane w przypadku otępień naczyniopochodnych, nie istnieją w przypadku AD. Wobec takiego stanu rzeczy stosowane leczenie ma charakter wyłącznie objawowy i tylko hipotetycznie ingeruje w biologię otępień. Aktualną farmakoterapię i nowe strategie w rozwoju leków przeciwko AD przedstawia Rysunek 3.



Rysunek 3. Aktualna farmakoterapia i nowe strategie w rozwoju leków przeciwko AD.

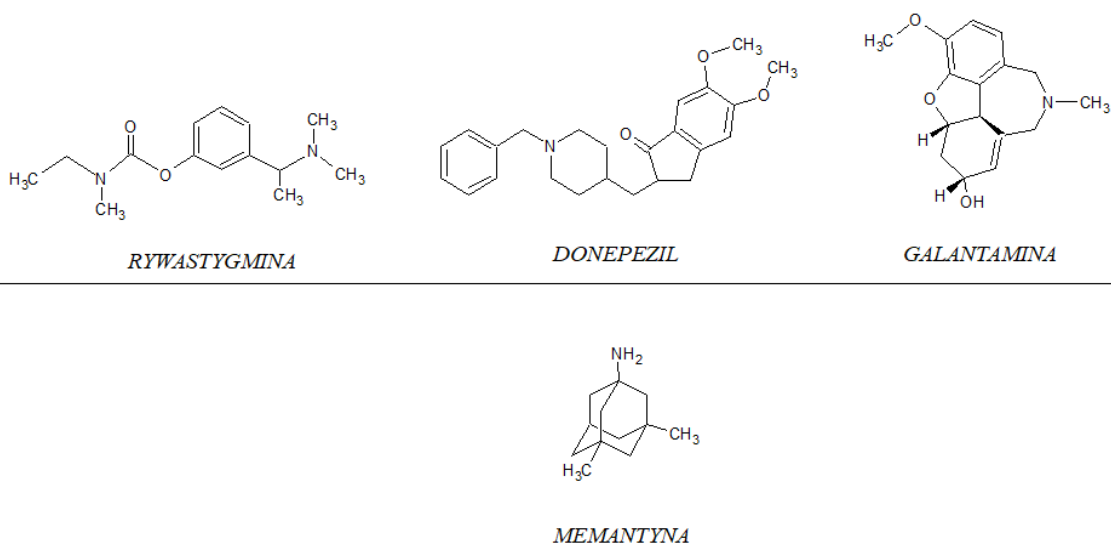
Podstawowym celem współczesnej farmakoterapii AD jest poprawa funkcjonowania psychospołecznego pacjentów i spowolnienie procesu chorobowego, stąd też terapia AD obejmuje konieczność postępowania farmakologicznego jak i niefarmakologicznego. Niefarmakologiczny element opieki nad chorym z AD polega przede wszystkim na zapewnieniu choremu dobrych warunków w zakresie bezpieczeństwa oraz odciążeniu osób, na których spoczywa obowiązek zajmowania się chorym.

Farmakoterapia jest ukierunkowana na:

1. zmniejszenie zaburzeń w zakresie funkcji poznawczych (pamięci, mowy, uwagi itp.)
2. leczenie zaburzeń psychicznych i zaburzeń zachowania związanych z otępieniem - depresji, pobudzenia, objawów psychotycznych i zaburzeń lękowych.

Obecne leczenie AD opiera się na stosowaniu AChEIs, takich jak donepezyl, galantamina lub rywastygmina oraz antagonisty receptora NMDA - memantyny, która jest wskazana w umiarkowanej i ciężkiej postaci tej choroby (Rysunek 4). Pierwszym lekiem z grupy AChEIs wprowadzonym do stosowania w AD była, obecnie już wycofana w Polsce, takryna (Tacrinum). Takryna odwracalnie hamuje (mieszany typ inhibicji) aktywność zarówno AChE, jak i BuChE. Lek w dawce 80 mg/dobę poprawia pamięć i funkcje poznawcze u pacjentów z łagodnym do umiarkowanego

stadium AD. Jednak niekorzystny wpływ takryny na czynność wątroby (działanie hepatotoksyczne) przyczynił się do wycofania leku z obrotu farmaceutycznego [67].



Rysunek 4. Wzory strukturalne leków należących do AChEIs – rywastygminy, donepezylu, galantaminy oraz antagonisty receptora NMDA - memantyny. Opracowanie własne z wykorzystaniem programu ChemSketch.

Mechanizm działania AChEIs polega na zwiększaniu stężenia ACh w OUN w wyniku hamowania AChE, enzymu katalizującego odłączenie reszty acetylowej od choliny; w ten sposób AChEIs nasilają ośrodkowe przekazywanie cholinergiczne, wpływając korzystnie na procesy pamięciowe. Leki należące do AChEIs zapewniają jedynie czasową poprawę funkcji poznawczych, zwiększoną aktywność, dobry nastrój i zachowanie. Wywierają także korzystny wpływ na niektóre zaburzenia psychiczne towarzyszące otępieniu, takie jak omamy, urojenia, apatia, pobudzenie czy bezcelowa nadaktywność. Aby uzyskać optymalne wyniki stosowania AChEIs leczenie należy rozpocząć możliwie wcześnie, ponieważ hamuje to postęp choroby, poprawia funkcje poznawcze i przedłuża okres autonomii funkcjonalnej, czyli stanu, w którym chory nie wymaga stałej pielęgnacji. Warto jednak podkreślić, że leki te nie wpływają na istotę procesu patologicznego leżącego u podstaw AD, dlatego też nie zatrzymują, ani nie spowalniają postępującego procesu neurodegeneracji [4]. Biorąc pod uwagę powyższe, niezbędne jest poszukiwanie nowych, bardziej skutecznych leków wpływających na rozwój i przebieg AD [2-4].

Działanie poszczególnych AChEIs jest zasadniczo podobne. Różnią się one jednak istotnie pod pewnymi względami w mechanizmach działania, a także tym,

że przy dłuższym stosowaniu różnice te mogą wskazywać na korzystniejsze skutki działania któregoś z nich [68]. Ponadto, leki te różnią się między sobą parametrami farmakokinetycznymi i dawkami docelowymi (Tabela 2).

Donepezil swoiście i odwracalnie blokuje AChE (mieszany typ inhibicji), zlokalizowaną w zakończeniach nerwowych w OUN. Ponad 1000 razy silniej hamuje ten enzym niż BuChE znajdującą się głównie poza OUN, co wskazuje na znacznie większą selektywność donepezilu w stosunku do AChE w porównaniu do takryny. Lek został zatwierdzony do leczenia łagodnej lub średnio ciężkiej postaci AD przez FDA w 1996 roku. U chorych z otępieniem w przebiegu AD w dawkach terapeutycznych hamuje ok. 64–77% aktywności AChE erytrocytów. Skuteczność kliniczna donepezilu została potwierdzona na podstawie wyników testów oceny zdolności poznawczych, oceny ogólnego funkcjonowania oraz oceny zdolności przystosowania do funkcjonowania społecznego, w warunkach domowych, oceny zainteresowań oraz dbania o siebie. Niestety na działanie donepezilu wytwarza się tolerancja i po roku stosowania efekt wzmocnienia transmisji cholinergiczej zmniejsza się. Donepezil jest lekiem o dobrej tolerancji, jego najczęściej występujące działania niepożądane mają charakter przemijający. Lek stosowany jest w dawce 5 lub 10 mg jeden raz dziennie [69].

Galantamina to trzeciorzędowy alkaloid będący wybiórczym, odwracalnym, kompetycyjnym inhibitorem AChE oraz allosterycznym modulatorem receptora nikotynowego. Działa w obrębie połączeń w sieci neuronalnej oraz płytki nerwowo-mięśniowej. Efekt działania farmakologicznego leku to nasilenie aktywności układu cholinergicznego. Galantamina przekracza barierę krew-mózg, co predestynuje ją do stosowania w schorzeniach neurodegeneracyjnych. Galantamina, po raz pierwszy została wprowadzona do leczenia w Bułgarii (Nivalin®), jako środek wspomagający leczenie chorób nerwowo-mięśniowych i rdzenia kręgowego [70], natomiast potencjał leku pod kątem zastosowania w leczeniu AD oceniono w latach 80-tych i 90-tych. W 2000 roku została ona zatwierdzona w leczeniu pod tym wskazaniem w Islandii, Irlandii, Szwecji i Wielkiej Brytanii. Aktualnie jest dopuszczona w wielu krajach Europejskich, Stanach Zjednoczonych i niektórych krajach Azji w terapii AD. Galantamina poprawia funkcje poznawcze, zdolności ogólnego funkcjonowania, czynności życia codziennego i opóźnia wystąpienie zaburzeń zachowania [71,72].

Rywastygmina, w odróżnieniu od donepezilu i galantaminy, w porównywalnym stopniu hamuje aktywność AChE i BuChE w OUN. W miarę postępu choroby, kiedy

neurony zawierające AChE wymierają, BuChE odgrywa coraz większą rolę, stąd można założyć, że rywastygmina będzie skuteczniejsza od pozostałych inhibitorów w późniejszych stadiach choroby. Ze względu na budowę (obecność ugrupowania karbaminianowego) rywastygmina wiąże się z AChE, która rozszczepia cząsteczkę rywastygminy, w konsekwencji czego uwalnia się nieaktywny farmakologicznie fenolowy produkt rozkładu, który jest szybko wydalany przez nerki, natomiast ugrupowanie karbaminianowe pozostaje związane z miejscem estrowym enzymu znacznie dłużej niż grupa acetylowa podczas hydrolizy ACh. W związku z tym enzym jest nieaktywny jeszcze przez pewien czas po usunięciu cząsteczki macierzystej. Ważną konsekwencją tego mechanizmu działania jest fakt, że rywastygmina nie ulega metabolizmowi w wątrobie i nie jest substratem dla układu cytochromu P450. Należy podkreślić, że na rywastygminę nie wytwarza się tolerancja nawet po dłuższym czasie stosowania [73].

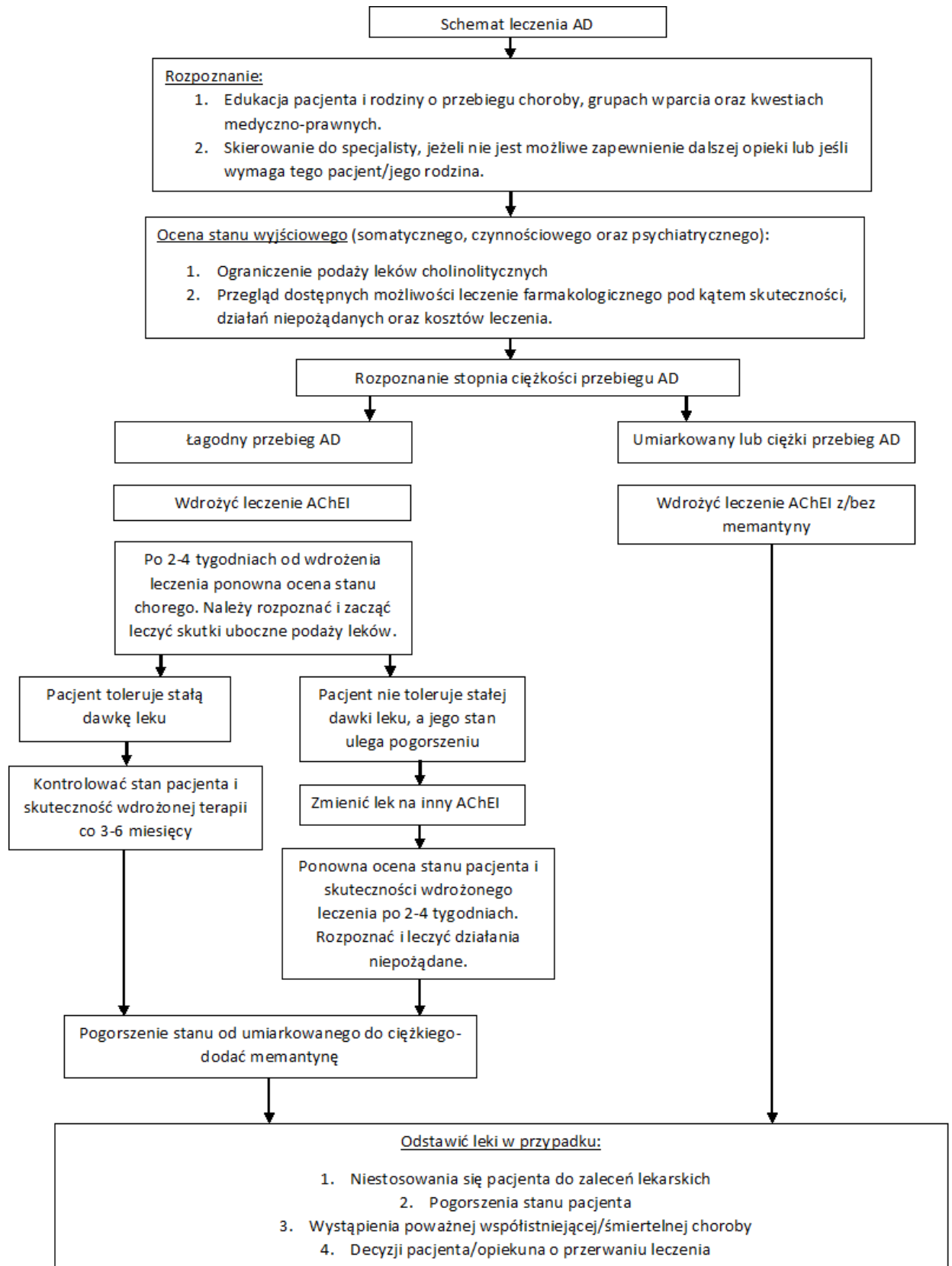
Tabela 2. Porównanie podstawowych parametrów farmakodynamicznych i farmakokinetycznych zarejestrowanych produktów leczniczych będących AChEIs w leczeniu AD [74].

Substancja czynna	Chlorowodorek donepezylu	Bromowodorek galantaminy	Wodorowinian rywastygminy
<i>Mechanizm działania</i>	Inhibitory AChE		Inhibitor AChE i BuChE
<i>Wskazania rejestracyjne</i>	AD, PD	AD	AD, PD
<i>Metabolizm</i>	Wątrobowy: CYP3A4 oraz CYP2D6		-
<i>Okres półtrwania</i>	Około 70 godzin	8-10 godzin	Około 1 godziny
<i>Postaci farmaceutyczne</i>	Tabletki powlekane, tabletki ulegające rozpadowi w jamie ustnej	Kapsułki twarde o przedłużonym uwalnianiu	Kapsułki, płyn, plastry transdermalne
<i>Dawka początkowa</i>	5 mg/dobę	8 mg/dobę	Kapsułki: dwa razy 1,5 mg/dobę Plastry: 4,6 mg/dobę
<i>Dawka końcowa</i>	10 mg/dobę	24 mg/dobę	Kapsułki: dwa razy 6 mg/dobę Plastry: 9,5 mg/dobę
<i>Najczęstsze działania niepożądane</i>	Nudności, wymioty, zawroty głowy, senność, skurcze mięśni, zmęczenie		
<i>Przeciwwskazania</i>	Nadwrażliwość na substancję czynną lub składniki pomocnicze formulacji farmaceutycznej		

PD – (ang. Parkinson's disease) choroba Parkinsona; CYP3A4 - cytochrom P450 3A4; CYP2D6 - cytochrom P450 2D6

W leczeniu AD poza AChEIs, stosowana jest także memantyna - napięciozależny, niekompetycyjny antagonist, charakteryzujący się umiarkowanym powinowactwem do receptora NMDA. Zależność od potencjału i szybka kinetyka łączenia się i dysocjacji od receptora NMDA wpływa na fakt, że memantyna normalizuje jego funkcjonowanie - zapobiega skutkom nadmiernego pobudzenia glutaminianem w warunkach patologicznych, które mogą prowadzić do zaburzenia czynności neuronów, jednocześnie nie blokując całkowicie aktywności fizjologicznej i nie generując ryzyka efektu propsychotycznego. Lek nie wykazuje istotnej aktywności względem receptorów GABA, benzodiazepinowych, dopaminowych, adrenergicznych, histaminowych i glicynowych ani względem zależnych od potencjału kanałów wapniowych, sodowych i potasowych.

Stosowanie memantyny u chorych na AD prowadzi do stabilizacji lub poprawy parametrów oceny stanu ogólnego, czynności życia codziennego, funkcji poznawczych. Co istotne, memantyna łagodzi wiele objawów behawioralnych, w tym omamy, pobudzenie, agresję oraz drażliwość [75]. Skuteczność leku w leczeniu AD została potwierdzona w badaniach klinicznych, w których udokumentowano efektywność leku w otępieniu umiarkowanym do znacznego w zakresie oceny globalnej wpływu na skale kliniczne oceny funkcji poznawczych oraz aktywności dnia codziennego [76]. Memantyna jest lekiem dobrze tolerowanym, niemniej jednak, należy monitorować nie tylko efekty kliniczne, ale także jego tolerancję. Najczęściej występujące działania niepożądane to zawroty głowy (6,3%), ból głowy (5,2%), zaparcia (4,6%) oraz senność (3,4%) [77]. Poniżej (Rysunek 5) przedstawiono algorytm postępowania w leczeniu AD [78].



Rysunek 5. Algorytm postępowania w przypadku rozpoznania AD wg [22,78].

Jednym z najważniejszych osiągnięć medycyny z ostatnich lat jest wprowadzenie na rynek farmaceutyczny dwóch nowych leków stosowanych w leczeniu AD. W czerwcu 2021 roku FDA zatwierdziło aducanumab – pierwszy lek, który redukuje nagromadzenie w mózgu złogów $A\beta$, podstawowej przyczyny tej choroby. Aducanumab ma długi okres półtrwania; podaje się go raz na cztery tygodnie. Czas stosowania, który pozwala na osiągnięcie maksymalnie skutecznego stężenia leku w mózgu, wynosi około 5 miesięcy. Optymalna dawka to 10 mg/kg masy ciała. FDA zatwierdziła aducanumab w trybie przyspieszonym, a wynika to z danych uzyskanych w badaniach klinicznych wykazujących jego wpływ na redukcję złogów $A\beta$. Lek z dużym prawdopodobieństwem może przynosić korzyści kliniczne, w tym przypadku poprawę stanu klinicznego pacjenta [6]. Dalsze kroki zatwierdzające, dotyczące wskazań do stosowania aducanumabu w leczeniu AD mogą być uzależnione od weryfikacji korzyści klinicznych w badaniach potwierdzających [79].

Kolejnym lekiem, zarejestrowanym w styczniu 2023 roku do terapii AD jest lecanemab, będący również przeciwciałem monoklonalnym, redukującym nagromadzenie w mózgu złogów $A\beta$. Podobnie jak w przypadku aducanumabu, lek ten został zatwierdzony przez FDA w trybie przyspieszonym, co budzi kontrowersje wśród ekspertów [7,80]. Badanie kliniczne III fazy zostało zakończone sukcesem osiągając swój pierwszorzędowy punkt końcowy, wykazując spowolnienie postępu choroby w porównaniu z grupą osób przyjmujących placebo. Wyniki wykazały, że po terapii trwającej 18 miesięcy, podczas której pacjenci otrzymywali lek we wlewach dożylnych co 2 tygodnie, w dawce 10 mg/kg masy ciała, nastąpiło zmniejszenie tempa pogarszania się funkcji poznawczych w wyniku obniżenia poziomu $A\beta$ w mózgu. Jak wskazały wyniki badania klinicznego, lecanemab spowalnia postępy choroby o 27% w porównaniu z grupą osób przyjmujących placebo. Pomimo zmniejszenia tempa pogorszenia się funkcji poznawczych i funkcjonalnych pacjentów z wczesnym stadium AD, występowały przy tym również działania niepożądane. Z tego względu uzasadnione są dalsze badania w celu określenia dokładnej skuteczności i bezpieczeństwa lecanemabu w leczeniu wczesnej fazy AD [81-83].

6. Aktualne kierunki badań nad potencjalnymi lekami mogącymi znaleźć zastosowanie w leczeniu AD

Prace w zakresie poszukiwania nowych potencjalnych leków mających zastosowanie w leczeniu AD są prowadzone w oparciu o patogenezę tej choroby, tj. koncentrują się na poszukiwaniu leków o działaniu antyamyloidowym, ograniczającym hiperfosforylację białka *tau*, antyoksydacyjnym czy neuroprotektynym [84]. Wielu badaczy zwraca także uwagę na genetyczne czynniki ryzyka wystąpienia AD, dlatego w literaturze pojawia się coraz więcej doniesień dotyczących terapii genowej [85].

6.1. Terapia anty-amyloidowa

Zgodnie z hipotezą kaskady amyloidowej, akumulacja zewnątrzkomórkowa peptydów $A\beta$ oraz jego agregacja w postaci płytek starczych są uważane za jeden z podstawowych filarów neuropatologicznych AD. Z tego względu, poszukiwanie nowych możliwości terapeutycznych ukierunkowanych zostało na $A\beta$, których celem są zarówno jego monomery, oligomery jak również jego agregaty [86,87]. Pierwsze strategie anty-amyloidowe koncentrowały się na hamowaniu produkcji $A\beta$. Strategie te można podzielić w zależności od miejsca, w którym metabolizowane jest białko APP: inhibitory BACE1, inhibitory/modulatory γ -sekreazy i aktywatory α -sekreazy [86]. Pierwsza próba terapii anty-amyloidowej polegała na immunizacji pacjentów z AD poprzez wstrzyknięcie do ich organizmu $A\beta$, jednak zakończyła się ona niepowodzeniem, ponieważ wśród badanych obserwowano zapalenie mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych [87]. Również kolejne próby uzyskania leku zmniejszającego poziom $A\beta$ okazały się nieskuteczne (Tabela 3). Immunoterapia jest obecnie najbardziej promowaną strategią mającą na celu redukcję $A\beta$. Testy opierają się głównie na stymulacji komórek układu odpornościowego, takich jak limfocyty B i T oraz aktywacji mikrogleju w celu promowania ich zdolności fagocytarnych. Aktywna immunoterapia (szczepionki) zależy od komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej, skutkującej w efekcie długotrwałym wytwarzaniem przeciwciał endogennych. W porównaniu z immunoterapią pasywną, w tym przypadku wytwarzane są przeciwciała o wysokim stężeniu w ludzkim ciele. Niemniej jednak, immunoterapię bierną (przeciwciała) uważa się za skuteczniejszą i bardziej odpowiednią u pacjentów w podeszłym wieku, ze względu na zmniejszoną u nich odpowiedź na szczepionki.

Zaletą humanizowanych przeciwciał monoklonalnych, w odróżnieniu od szczepionek, jest celowanie w określone konformacje białek, co stwarza możliwość dogodniejszego zatrzymania ewentualnych działań niepożądanych. Niestety immunizacja bierna wymaga wielokrotnego dawkowania co generuje większe koszty leczenia. Ponadto oba podejścia mogą wywoływać nadmierną aktywację wrodzonego i nabytego układu odpornościowego, powodując działania niepożądane, takie jak zapalenie naczyń mózgowych [88].

Tabela 3. Przykłady preparatów, które zostały wykluczone z badań klinicznych w terapii anty-amyloidowej AD [89-93].

Preparat	Typ cząsteczki	Stadium AD u badanej populacji	Cel molekularny lub mechanizm	Poprawa funkcji poznawczych
<i>Bapinezumab</i>	Humanizowane przeciwciało IgG1	Łagodny do umiarkowanego	Rozpuszczalny A β (włóknisty)	Brak
<i>Solanezumab</i>	Humanizowane przeciwciało IgG1	Łagodny do umiarkowanego	Rozpuszczalny A β (monomery)	Brak
<i>Crenezumab</i>	Humanizowane przeciwciało IgG4	Bardzo łagodny do łagodnego (pozytywne markery dla A β)	Oligomery, złożki i blaszki A β	Brak
<i>AN-1792</i>	Pełnowartościowy fragment A β 42	Łagodny do umiarkowanego	Immunizacja aktywna	Badania wstrzymane (wystąpiło zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych)
<i>Semagacestat</i>	Benzoazepinowa pochodna butanoamidu	Łagodny do umiarkowanego	Inhibitor γ -sekreazy	Brak (wzrost ryzyka wystąpienia nowotworu skóry)
<i>Tarenflurbil</i>	Fluorobifenyłowa pochodna kwasu propanowego	Łagodny	Inhibitor γ -sekreazy	Brak
<i>Verubecestat</i>	Pochodna fluoropikolinamidu	Początkowy bez objawów	Inhibitor enzymów prekursorowych A β	Brak (nastąpiło pogorszenie)
<i>Atabecestat</i>	Pochodna fluoropikolinamidu	Początkowy bez objawów (pozytywne markery dla A β)	Inhibitor enzymów prekursorowych A β	Brak (nastąpiło pogorszenie)

6.1.1. Inhibitory β -sekretazy (BACE1)

Rozwój inhibitorów BACE1 ograniczony jest głównie poprzez strukturę tego enzymu, który należy do proteaz aspartylowych i wymusza to na inhibitorze, aby był dużą, hydrofilową cząsteczką. Pierwsze inhibitory BACE1 naśladowały sekwencje substratów enzymu i cechowały się niską biodostępnością oraz słabym przenikaniem przez barierę krew-mózg, co doprowadziło do opracowania drugiej generacji inhibitorów BACE1 - bardziej lipofilowych. Kolejnym aspektem ograniczającym zastosowanie inhibitorów β -sekretazy jest różnorodność substratów dla tego enzymu, którym oprócz białka APP jest również neuregulina-1, biorąca udział w mielinizacji nerwów obwodowych. Dlatego też, istotnym jest specyficzne hamowanie tego enzymu by uniknąć działań niepożądanych.

W ostatnich latach kilka inhibitorów BACE1, m.in. verubecestat, lanabecestat, elenbecestat, atabecestat czy LY3202626 osiągnęło późną fazę badań klinicznych (II/III), ale żaden z nich nie wykazał u pacjentów poprawy poznawczej ani funkcjonalnej w dużych badaniach kontrolowanych placebo, pomimo znacznego zmniejszenia poziomów $A\beta$ w osoczu i płynie mózgowo-rdzeniowym oraz blaszek mózgowych. Kilka z tych badań zostało przedwcześnie przerwanych z powodu efektów toksycznych lub pogorszenia funkcji poznawczych i behawioralnych w porównaniu z pacjentami otrzymującymi placebo [86,95-99].

6.1.2. Inhibitory oraz modulatory γ -sekretazy

Sekretaza γ jest kompleksem proteazowym zbudowanym z czterech białek, którymi są nikastryna, białko APH-1 oraz presenilina 1 i 2. Funkcją tego enzymu jest proteoliza ponad dziewięćdziesięciu śródbłonowych białek sygnałowych, w tym APP. Enzym pełni tym samym zasadniczą rolę w powstawaniu agregatów amyloidowych. Hamowanie γ -sekretazy ma na celu zmniejszenie produkcji peptydów $A\beta$, jednak niespecyficzne inhibitory γ -sekretazy prowadzą do poważnych działań niepożądanych wynikających z działania również na inne białka niż APP [20,85,99]. Przykładem może być semagacestat – pierwszy nieselektywny inhibitor γ -sekretazy, który mimo obniżania poziomu $A\beta$ we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym, został wycofany z III fazy badań klinicznych z powodu spadku funkcji poznawczych u pacjentów oraz występowania nieczerniakowych raków skóry. Przyczyną występowania tych działań niepożądanych jest najprawdopodobniej hamowanie szlaku sygnałowego białka Notch, które również

należy do substratów γ -sekreazy i odpowiada za regulację proliferacji, rozwoju i różnicowania komórek [86,91,100-102].

W celu zminimalizowania ryzyka działań niepożądanych wynikających z interakcji z białkami, które również są substratami dla γ -sekreazy stworzono nową - II generację inhibitorów γ -sekreazy, o selektywnym działaniu, których przedstawicielami są avagacestat oraz begacestat. Opracowanie tych leków charakteryzujących się specyficnością działania na poszczególne białka stanowi duży problem ze względu na złożoność struktury enzymatycznej γ -sekreazy [20,86,102]. Badania kliniczne avagacestatu i begacestatu zostały przerwane, odpowiednio w II i I fazie z powodu braku poprawy poznawczej lub funkcjonalnej, a w przypadku avagacestatu poważne działania niepożądane, w tym raka skóry [100,103,104].

W wyniku dalszych poszukiwań leków opracowane zostały modulatory γ -sekreazy (GSM, γ -secretase modulators) jako alternatywa dla inhibitorów. Ich mechanizm działania wiąże się ze zmianą aktywności proteolitycznej enzymu, czego rezultatem jest zablokowanie przetwarzania białka APP bez zakłócania innych szlaków sygnałowych, takich jak Notch. GSM sprzyjają sekwencyjnemu rozszczepianiu APP, zmniejszają produkcję $A\beta_{42}$ poprzez allosteryczną aktywację γ -sekreazy i zwiększają stosunek nietoksycznych krótszych form $A\beta$ (np. $A\beta_{38}$) [20,86,100].

Rozwój modulatorów γ -sekreazy pierwszej generacji (GSM-I, first-generation γ -secretase modulators) rozpoczął się od obserwacji niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ, ang. NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs): m.in. ibuprofenu, indometacyny, flurbiprofenu, które obniżyły poziom peptydu $A\beta(1-42)$ *in vitro* i *in vivo* na korzyść produkcji $A\beta_{38}$. Według niektórych badań $A\beta_{38}$ jest mniej podatny na agregację i wykazuje mniejszą toksyczność w odniesieniu do $A\beta_{42}$ i może mieć właściwości ochronne. Działanie leków z grupy NLPZ oparte jest na hamowaniu enzymów cyklooksygenazy (COX) i w przypadku ibuprofenu obniżenie poziomu $A\beta$ można by wiązać z hamowaniem tego enzymu, jednak dla tarenflurbilu (R-enancjomeru flurbiprofenu), który jest pozbawiony działania przeciwzapalnego związanego z hamowaniem COX, mechanizm oddziaływania na $A\beta$ pozostaje nieznan. Oba te leki jednak nie wykazały skuteczności w leczeniu AD w badaniach klinicznych. Badania tarenflurbilu przerwano w III fazie ze względu na pogorszenie funkcji poznawczych i ogólnej sprawności w zakresie czynności życiowych [20,86,100].

Modulatory γ -sekreazy drugiej generacji (GSM-II, second-generation γ -secretase modulators) to skuteczniejsze, zmodyfikowane cząsteczki oparte na NLPZ, charakteryzujące się większą penetracją do mózgu. Na ogół obniżają produkcję $A\beta_{42}$ bez wpływu na poziom $A\beta_{40}$, kompensując poziomy krótszych peptydów (peptydy $A\beta_{38}$ i $A\beta_{37}$). Przykładem może być itanapraded (CHF5074), który *in vitro* wykazywał preferencję w hamowaniu wytwarzania oligomerów $A\beta_{42}$. Kolejne badania dowiodły jednak, że nie obniża on poziomu $A\beta_{42}$ w osoczu, ani płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów, ale działa jako modulator mikrogleju. Mimo tego, że zapewniało to pewną ochronę, negatywne wyniki uzyskane w badaniach klinicznych GSM-II opartych na NLPZ wskazują, że ochrona przed AD nie jest ogólną korzyścią zapewnianą przez leki należące do tej grupy [86,100,105].

6.1.3. Aktywatory α -sekreazy

Pomimo badań, które wskazują, że szlak kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K)/Akt lub sygnalizacja receptora GABA może sprzyjać aktywacji szlaku α -sekreazy to nadal niewiele wiadomo na ten temat. Jednak dzięki aktywacji α -sekreazy możliwa jest zmiana metabolizmu białka APP na nieamyloidogenny, czego rezultatem jest utworzenie rozpuszczalnego APP, które, jak wykazano, pełni neuroochronną i stymulującą rolę w synaptogenezie. W związku z tym, badaniom pod kątem zwiększenia aktywności α -sekreazy zostały poddane różne związki, takie jak agoniści receptorów muskarynowych, glutaminergicznych i serotonergicznych, aktywatory kinazy białkowej C (PKC, protein kinase C) oraz modulatory receptora PI3K/Akt lub $GABA_A$ [86]. Etazolat stymuluje remielinizację i uniemożliwia tworzenie się peptydów amyloidogennych, prowadząc do uwolnienia rozpuszczalnego N-końcowego fragmentu APP (sAPP α), który ma właściwości neurotroficzne i prokognitywne. Badania kliniczne II fazy nad etazolatem jako terapią wspomagającą inhibitory cholinesterazy potwierdziły jego bezpieczeństwo i dobrą tolerancję [86,106]. Bryostatyna 1 w badaniach *in vivo* na zwierzętach zwiększała aktywność α -sekreazy i zdolności poznawcze u myszy z AD. Natomiast w badaniach klinicznych wykazywała niewielką poprawę funkcji poznawczych, przy jednocześnie dobrym profilu bezpieczeństwa, dając rzadkie działania niepożądane, takie jak - zmiany skórne i pobudzenie [86,107]. Trwają również badania kliniczne nad związkiem APH-1105, który jest analogiem bryostatyny w postaci nanocząsteczek do podawania donosowego

[86,108]. Kolejnym związkiem zwiększającym aktywność α -sekretazy jest acytretyna stosowana w leczeniu łuszczycy, która jest chorobą autoimmunologiczną i wiązać się może ze zwiększonym ryzykiem upośledzenia funkcji poznawczych i demencji [109]. W badaniach klinicznych acytretyna wykazywała zdolność do aktywacji szlaku nieamyloidogenego, zmniejszając poziomy $A\beta$, a tym samym zwiększając ilość sAPP α w płynie mózgowo-rdzeniowym. Acytretyna wykazuje działanie neuroprotekcyjne konkurując z tretynoiną (kwasem all-trans-retinowym) o interakcję z komórkowym białkiem wiążącym kwas retinowy (CRABP, cellular retinoic acid-binding protein). Białko to transportuje acytretynę do jądra komórkowego, gdzie wzmacnia ADAM10, które jest bardzo ważną α -sekretazą dla nieamyloidogenego szlaku [86,110]. Naturalnie występującym w środowisku aktywatorem α -sekretazy okazał się być preparat ID1201, będący ekstraktem z owoców drzewa jagodowego *Melia toosendan* Sieb. i Zucc. (*Meliaceae*), które w Chinach tradycyjnie uznaje się za roślinę owadobójczą i leczniczą. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały działanie neuroprotekcyjne i anty-amyloidogenne ekstraktu ID1201, poprzez aktywację szlaku PI3K/Akt, ale także przez hamowanie receptorów końcowych produktów zaawansowanej glikacji (RAGE, receptor for advanced glycation end products), które w AD obejmują wytwarzanie i akumulację $A\beta$, tworzenie splotów neurofibrylarnych, uszkodzenie transmisji synaptycznej oraz degenerację neuronów [86,111,112].

6.1.4. Immunoterapia czynna

Czynna immunizacja stymuluje układ odpornościowy poprzez podanie $A\beta$ lub jego fragmentów, wywołując w ten sposób odpowiedź immunologiczną, poprzez aktywację zdolności fagocytarnej mikrogleju, w celu wytworzenia endogennych przeciwciał przeciwko $A\beta$. Badania nad immunoterapią AD zapoczątkował Dale Schenk w 1999 roku wykorzystując w tym celu transgeniczny model myszy AD. Kolejnym etapem było opracowanie w 2001 roku szczepionki AN1792, ukierunkowanej na $A\beta$ pełnej długości, która weszła do badań klinicznych. Badania zostały przerwane w II fazie, ze względu na występujące zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych wywołane limfocytami T. Aby zmniejszyć nadmierną reakcję immunologiczną, opracowano drugą generację szczepionek bez epitopu limfocytów T, czego przykładem może być CAD106, które obecnie jest w badaniach klinicznych fazy II/III. Zaletą immunoterapii czynnej są niskie nakłady finansowe oraz krótki czas

podawania leków, zaś przeciwciała, długo utrzymują się w organizmie. Z drugiej jednak strony, wadą ich są trudne do przewidzenia odpowiedzi immunologiczne i działania niepożądane, zwłaszcza u osób w podeszłym wieku [20,86,88,100].

6.1.5. Immunoterapia bierna - przeciwciała monoklonalne

Pasywna immunizacja humanizowanymi przeciwciałami anti- $A\beta$ stała się głównym nurtem rozwoju leków przeciw AD. W tym modelu przeciwciała wytworzone zewnętrznie podaje się w infuzjach dożylnych lub wstrzyknięciach podskórnych. Tak jak w przypadku bapineuzumabu, mogą to być humanizowane wersje mysich przeciwciał ocenianych we wcześniej prowadzonych badaniach przedklinicznych. Przeciwciała monoklonalne (mAb, monoclonal antibodies) mogą być także w pełni ludzkie czego przykładem jest gantenerumab. Tego typu mAb są wytwarzane z transgenicznych myszy, które zostały zmodyfikowane genetycznie z ludzkim locus immunoglobuliny, podczas gdy humanizowane mAb są początkowo wytwarzane u myszy typu dzikiego z endogennym mysim locus immunoglobuliny. W porównaniu z humanizowanymi mysimi mAb, w pełni ludzkie mAb są uważane za bezpieczniejsze i bardziej skuteczne ze względu na rzadziej występujące działania niepożądane [20,86,88,100]. Przykłady substancji, które były objęte badaniami klinicznymi w zakresie terapii anti-amyloidowej przedstawia Tabela 4.

Tabela 4. Przykłady przeciwciał monoklonalnych badanych pod kątem terapii anti-amyloidowej w AD [100,113-117].

Preparat	Typ cząsteczki	Przebieg AD w badanej populacji	Faza badań klinicznych
<i>Bapineuzumab</i>	Humanizowane mAb IgG1	łagodny/umiarkowany	II/III, zakończona
<i>Solanezumab</i>	Humanizowane mAb IgG1	łagodny/umiarkowany	II/III
<i>Crenezumab</i>	Humanizowane mAb IgG4	łagodny	II/III
<i>Ponezumab</i>	Humanizowane mAb IgG2	łagodny	II, zakończona

6.2. Terapie ukierunkowane na białko *tau*

Białko *tau* jest dobrze rozpuszczalne i gromadzi się w neuronach, gdzie odgrywa kluczową rolę w stabilizacji MT, szczególnie w aksonach. Utrata zdolności wiązania MT wywołuje destabilizację cytoszkieletu, co ostatecznie powoduje neurodegenerację i śmierć neuronów. Zgodnie z hipotezą wiążącą patogenezę AD z białkiem *tau*, kluczowym elementem procesu neurodegeneracji jest jego hiperfosforylacja, która prowadzi do powstania NFT. Jako alternatywę dla terapii anty-amyloidowej leczenie ukierunkowane na białko *tau* ma na celu hamowanie jego fosforylacji i agregacji [20,86,100,118-122]. W zakresie zmniejszenia ilości NFT, prowadzono badania z wykorzystaniem błękitu metylenowego, a następnie z jego pochodną o nazwie LMTM (Leuco-methylthioninium bis(hydromethanesulfonate)). W modelach mysich dowiedziono skuteczności tych związków, ponieważ zmniejszały one apoptozę neuronów indukowanych NFT, jednak badania kliniczne nie udowodniły skuteczności tych związków [123]. Ponadto leki stabilizujące MT mogą być stosowane jako strategia modyfikująca przebieg AD. W tym zakresie testowano wiążący się z tubuliną, syntetyczny taksan trzeciej generacji – TPI 287, jednak badania kliniczne już w I fazie wykazały, że związek jest nieefektywny i źle tolerowany. Strategie skierowane na białko *tau* obejmują: hamowanie hiperfosforylacji i agregacji białka *tau* oraz immunoterapię zarówno czynną, jak i pasywną [20,86,100,118-122].

6.2.1. Inhibitory fosforylacji białka *tau*

Hamowanie kinazy syntazy glikogenu-3 (GSK-3, glycogen synthase kinase 3) jest istotnym celem dla leku w terapii zaburzeń neurodegeneracyjnych, w tym AD. Jest to kinaza proteinowa uczestnicząca w fosforylacji białka *tau*, dlatego jej inhibicja blokuje tworzenie NTF. Badania wykazały również uczestniczenie tego enzymu w przetwarzaniu białka APP i wytwarzaniu $A\beta$, jak również w apoptotycznej śmierci komórek. Z inhibitorów GSK-3 do badania klinicznego II fazy dotyczącego leczenia AD zakwalifikował się jedynie tideglusib. Został on przetestowany w badaniach klinicznych u pacjentów z łagodną do umiarkowanej AD, które wykazały dobrą tolerancję, ale nie było znaczącej poprawy klinicznej [122,124].

6.2.2. Immunoterapia aktywna

Pierwszą testowaną szczepionką przeciwko białku *tau* był AADvac1, który zawiera syntetyczny peptyd, odpowiadający naturalnie występującemu, skróconemu i nieprawidłowo zbudowanemu białku *tau*. W badaniach przeprowadzonych na transgenicznym myszom dowiedziono, że szczepionka ta nie tylko redukuje hiperfosforylację białka *tau* i poprawia pamięć, ale co więcej, ma korzystny profil bezpieczeństwa i indukuje wysoki poziom przeciwciał *anti-tau*. Kolejne badania, które przeprowadzone były z udziałem pacjentów z umiarkowanym przebiegiem AD wykazały, że wytworzyły się przeciwciała przeciwko białku *tau*, a leczenie było dobrze tolerowane. Wyniki przeprowadzonych badań sugerują, że preparat AADvac1 może spowalniać postęp choroby [121,125].

6.2.3. Przeciwciała monoklonalne

Badania kliniczne dotyczące immunoterapii pasywnej ukierunkowane na białko *tau* prowadzone są dla przeciwciał monoklonalnych takich jak ABBV-8E12, gosuranemab, zagotenemab, UCB0107 czy też semorinemab. Substancje te są humanizowanymi przeciwciałami należącymi do IgG1 lub IgG4, których celem molekularnym jest białko *tau* w różnej postaci m.in. monomerów, oligomerów, NFT czy też w postaci zewnątrzkomórkowej [20,120]. W Tabeli 5. przedstawiono przykłady aktualnie badanych przeciwciał ukierunkowanych na białko *tau*.

Tabela 5. Przeciwciała ukierunkowane na białko *tau* w badaniach klinicznych [120,126].

Preparat	Typ cząsteczki	Badana populacja	Cel molekularny	Faza badań klinicznych
<i>ABBV-8E12</i>	Humanizowane przeciwciało IgG4	Wczesna postać AD	M, NFT, eTau	II
<i>RG7345</i>	Humanizowane przeciwciało IgG1 lub IgG4	Zdrowi mężczyźni	Ufosforylowane M, PHF	I
<i>BIIB076</i>	Ludzkie przeciwciało IgG1	Osoby zdrowe i łagodna postać AD	M, PFF, NFT	I
<i>JNJ-63733657</i>	Humanizowane przeciwciało IgG4	Zdrowe kobiety i mężczyźni	M, PHF	I

Oznaczenia: M – monomery, O – oligomery, NFT – spletki neurofibrylarne, eTau – postać zewnątrzkomórkowa, PFF – wstępnie formowane fibryle, PHF – podwójne spiralne włókienka

6.3. Terapie przeciwzapalne

Patogeneza AD wiązana jest także z dużą liczbą reaktywnych astrocytów i aktywowanego mikrogleju, co w konsekwencji prowadzi do stanu zapalnego w mózgu. Ze względu na fakt, że neurozapalenie może być jedną z przyczyn powstawania AD, przeprowadzono kilka badań z zastosowaniem NLPZ, jako związków o działaniu przeciwzapalnym. W literaturze dostępne są dane sugerujące ochronne działanie NLPZ, jednak randomizowane badania kliniczne przeprowadzone z podwójnie ślepą próbą nie potwierdziły pozytywnego wpływu tej grupy leków na objawy AD [127]. Badaniom poddano m.in. ibuprofen, który poza tym, że należy do NLPZ jest także agonistą receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów γ (PPAR- γ , peroxisome proliferators-activated receptor γ) w połączeniu z kromoglikanem disodowym, lekiem przeciwalergicznym, hamującym degranulację komórek tucznych (badanie ALZT-OPT1) [127]. W badaniach *in vitro* wykazano, że kromoglikan hamuje reakcję fibrylacji $A\beta$ oraz zmniejsza poziom $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ w mózgu zwierząt doświadczalnych. Długoterminowa obserwacja wykazała, że stosowanie NLPZ odpowiednio wcześniej (gdy OUN funkcjonuje jeszcze prawidłowo), może przynieść korzyści pacjentom, co sugeruje, że czas rozpoczęcia terapii ma kluczowe znaczenie [128]. Aktualnie badaniom klinicznym poddawany jest masytynib, który jest inhibitorem kinazy C i lokuje mastocyty uwalniające mediatory stanu zapalnego po przekroczeniu bariery krew-mózg. Co więcej, masytynib blokuje kinazę tyrozynową przez co może modulować fosforylację białka *tau*. Wyniki badania klinicznego III fazy nad terapią skojarzoną masytynibu z inhibitorem AChE lub memantyną wykazały poprawę pamięci u pacjentów oraz ich funkcjonowanie w życiu codziennym [20,129,130].

6.4. Terapia neuroprotekcjna i neuroregeneracyjna

Do grupy leków o różnych mechanizmach działania, które mogą hamować charakterystyczny dla AD postępujący proces neurodegeneracji należą leki stosowane aktualnie w innych wskazaniach leczniczych, co wpisuje się w aktualny trend repozycjonowania leków. Jako przykłady wymienić można m.in.: dabigatran - bezpośredni inhibitor trombiny, lek przeciwzakrzepowy, który zmniejsza uszkodzenia nerwowo-naczyniowe; cilostazol - inhibitor fosfodiesterazy 3 (PDE3, phosphodiesterase 3), redukujący akumulację $A\beta$ i fosforylację białka *tau*, co w konsekwencji wpływa

na poprawę krążenia mózgowego; telmisartan - antagonistą receptora angiotensynowego (AT_1) oraz agonista receptora PPAR- γ , który usprawnia funkcjonowanie naczyń oraz korzystnie wpływa na patologiczny proces odkładania amyloidu [131-133]. Ponadto, w badaniach klinicznych oceniających właściwości neuroprotektoryjne znalazły się następujące leki: lewetiracetam (lek przeciwpadaczkowy), kandesartan (lek hipotensyjny, antagonistą receptora AT_1 , L-seryna (aminokwas) czy kwas dokozaheksaenowy (DHA). Obiecujące wyniki badań uzyskano dla endogennej cząsteczki NA-831 (traneurocin). Badania II fazy wykazały, że związek ten działa neuroprotektoryjnie, stymuluje neurogenezę w wyniku czego następuje poprawa pamięci u pacjentów chorujących na łagodne upośledzenie funkcji poznawczych (MCI, mild cognitive impairment) lub AD. Udowodniono, że NA-831 statystycznie istotnie poprawia zdolność koncentracji, pamięć krótkotrwałą i długotrwałą oraz funkcje poznawcze w porównaniu do grupy placebo [134].

6.5. Leki wpływające na równowagę oksydacyjno-redukcyjną

Biorąc pod uwagę znaczenie stresu oksydacyjnego w patomechanizmie AD, badaniom klinicznym poddane zostały związki o właściwościach antyoksydacyjnych m.in. kurkumina czy koenzym Q10 (CoQ10). Kurkumina i jej pochodne hamują tworzenie fibrylarnego $A\beta$ z monomeru $A\beta$, a także destabilizują wstępnie uformowany fibrylarny $A\beta$ *in vitro*, co wskazuje, że kurkumina chroni przed toksycznością $A\beta$ i poprawia funkcje poznawcze [134,135]. Dostępna literatura wskazuje, że kurkumina w warunkach *in vitro* zmniejsza hiperfosforylację białka *tau*, wiąże miedź, modyfikuje aktywność mikrogleju, hamuje AChE oraz ma właściwości przeciwutleniające. Najważniejszym ograniczeniem w przypadku stosowania kurkuminy jest jej niska biodostępność po podaniu doustnym [135,136].

Z kolei CoQ10 jest ważnym kofaktorem w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów i ma dobrze scharakteryzowane właściwości przeciwutleniające nie tylko w mitochondriach, ale również w błonach lipidowych. Badania *in vitro* wykazały, że podawanie CoQ10 prowadzi do zmniejszenia patologii amyloidu w mysich modelach AD oraz wykazały jego ochronne działanie na komórki neuronalne przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. CoQ10 zmniejsza stres oksydacyjny mózgu, poziomy $A\beta_{42}$ i obciążenie blaszką miazdżycową oraz poprawia wydajność poznawczą. W badaniach przeprowadzonych na myszach jednoczesne podawanie CoQ10 i α -tokoferolu poprawiło zdolności behawioralne oraz uczenie się u starszych myszy.

CoQ10 jest dobrze tolerowany przez ludzi i może być obiecujący w badaniach terapeutycznych w AD [137-139].

Poza badaniami dotyczącymi kurkuminy oraz CoQ10 zbadano także skuteczność innych naturalnych produktów i przeciwutleniaczy, w tym witaminy E, ekstraktu z miłorzębu japońskiego, resweratrolu, melatoniny czy kwasu liponowego, aby określić, czy te związki o właściwościach antyutleniających zmniejszają poziom $A\beta$ i białka *tau* oraz poprawiają funkcje poznawcze w mysich modelach AD [136]. Z kolei wyniki badań klinicznych wskazują, że podawanie pacjentom substancji o charakterze antyoksydacyjnym, takich jak witamina E, czy ekstrakt z *Ginkgo biloba* wykazują działanie korzystne, aczkolwiek niewielkie, obejmujące tylko nieznaczne spowolnienie rozwoju choroby [140].

6.6. Leki o działaniu metabolicznym

Wyniki opublikowanych badań wykazują, że cukrzyca jest jednym z czynników ryzyka, który przyczynia się do rozwoju AD. Sugeruje się, że obwodowe i ośrodkowe zaburzenia sygnalizacji insuliny są charakterystyczne w obu jednostkach chorobowych. Niezwykle istotną rolę odgrywa osłabienie sygnalizacji insulinowej oraz funkcji receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1, insulin-like growth factor-1), ponieważ przyczynia się to do zwiększenia akumulacji $A\beta$ w uszkodzonych obszarach mózgu, zwiększenia stresu oksydacyjnego, neurozapalenia oraz osłabienia integralności neuronów [141]. Charakterystyczna w cukrzycy insulinooporność powoduje dysfunkcję mitochondriów i stres oksydacyjny, co w konsekwencji wyzwała odpowiedź zapalną oraz wzrost uwalniania cytokin (np. interleukiny-1 (IL-1), interleukiny-6 (IL-6), interleukiny-18 (IL-18)), czynnika martwicy nowotworów (TNF- α , tumor necrosis factor α), białka C-reaktywnego (CRP, C reactive protein)) [142]. Jak wskazują wyniki badań insulinooporność nasila charakterystyczną hiperfosforylację białka *tau* oraz odkładanie $A\beta$ [143].

Na podstawie tej teorii, przypuszcza się, że insulina i inne leki przeciwcukrzycowe mogą modyfikować przebieg AD. W rezultacie opracowano hipotezę „cukrzycy typu 3”, którą pełni AD dla mózgu, co zapoczątkowało badania nad stosowaniem insuliny w leczeniu AD. Aktualnie trwają badania kliniczne dla insuliny Humulin RU-100 stosowaną w podaniu donosowym, oceniające

długoterminową (12-miesięczną) skuteczność insuliny w łagodnej postaci AD. Transport insuliny do mózgu z krążenia obwodowego jest zależny od aktywnych mechanizmów transportowych, które mogą ulec zaburzeniu w AD, dlatego ta szczególna droga podawania jest obiecująca, ponieważ omija barierę krew-mózg. Dodatkowo zostaje zmniejszone ryzyko występowania działań niepożądanych w tkankach obwodowych. Przypuszcza się, że dostarczanie insuliny bezpośrednio do mózgu aktywuje mózgową sygnalizację insulinową, prowadząc do poprawy przetwarzania pamięci i skutkuje działaniem neuroprotekcijnym. Pozytywny wpływ insuliny na pamięć wiąże się ze zwiększeniem mózgowego przepływu krwi, ochroną synaps przed toksycznym działaniem $A\beta$ i białka *tau* [20,144]. Przykłady badań klinicznych insulin w leczeniu AD przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Aktualnie badania kliniczne prowadzone dla insulin w leczeniu AD [145].

Preparat	Numer badania klinicznego	Faza badania	Oznaczone biomarkery
<i>Insulina aspart</i>	NCT00581867	I/II	aktywacja hipokampa
<i>Insulina glulizynowa</i>	NCT02503501	II	$A\beta$ 42 w CSF*; białko <i>tau</i> w CSF*
<i>Insulina aspart</i>	NCT01145482	nie dotyczy	aktywacja glutaminy w mózgu
<i>Insulina aspart</i>	NCT02462161	I	$A\beta$ w CSF*/osoczu; białko <i>tau</i> w CSF*/osoczu; grubość kory w obszarach wrażliwych na AD; markery stanu zapalnego
<i>Insulina lispro</i>	NCT01636596	wycofane	mózgowy metabolizm glukozy
<i>Insulina glulizynowa</i>	NCT01436045	II	Stopień funkcji poznawczych
<i>Insulina ludzka (Humulin R)</i>	NCT01767909	II/III	$A\beta$ 42 w CSF*; białko <i>tau</i> w CSF*; stopień atrofii hipokampa
<i>Insulina detemir</i>	NCT01595646	II	$A\beta$ w CSF*/osoczu; białko <i>tau</i> w CSF*/osoczu; mózgowy przepływ krwi

CSF* (cerebrospinal fluid) - płyn mózgowo-rdzeniowy

W leczeniu cukrzycy typu 2 (DM2; diabetes mellitus 2) i otyłości stosowany jest również liraglutyd, który należy do analogów glukagonopodobnego peptydu-1 (GLP-1, glucagon-like peptide 1). Wyniki badań przeprowadzonych na myszach dowiodły, że analogi GLP-1 obniżają poziom $A\beta$, hamują stres oksydacyjny, działają przeciwzapalnie w obrębie neuronów oraz poprawiają funkcje poznawcze. Natomiast

badania kliniczne przeprowadzone na pacjentach z łagodną lub umiarkowaną postacią AD wykazały jedynie umiarkowanie pozytywne efekty [146,147].

Kolejną substancją należącą do najnowszej klasy leków przeciwcukrzycowych, nad którą prowadzone są badania kliniczne w odniesieniu do AD jest dapagliflozyna. Jest to inhibitor kotransportera glukozy-sodowego typu 2 (SGLT2, sodium-glucose co-transporter 2). Badania dowiodły że, dapagliflozyna zmniejsza insulinooporność i hamuje AChE [145,148].

Spośród leków o działaniu metabolicznym statyny są kolejną grupą leków, która jest szeroko badana pod kątem wpływu na AD. Kierunek tych badań wynika z faktu, że mózg jest najbardziej bogatym w cholesterol narządem, a mielina zawiera 70% całkowitego cholesterolu w mózgu. Statyny są silnymi lekami obniżającymi poziom cholesterolu, stosowanymi przez miliony dorosłych w zapobieganiu chorobom naczyniowym, jednak wpływ statyn na bogatą w cholesterol istotę białą mózgu jest w dużej mierze nieznany. W badaniach klinicznych znajduje się atorwastatyna i simwastatyna. W fazie II/III znajduje się badanie prewencyjne łączące polifarmakoterapię z aktywnością fizyczną. W badaniu tym poza atorwastatyną podawane są pacjentom leki hipotensyjne: losartan i amlodypina, które w połączeniu z aktywnością fizyczną mają przeciwdziałać występowaniu dyslipidemii, czy też nadciśnienia tętniczego jako czynników ryzyka AD [149-151].

Prowadzone są także badania kliniczne, będące w fazie II, nad benfotiaminą, będącą syntetycznym analogiem tiaminy (witaminy B₁). Wyniki dowodzą, że benfotiamina zapobiega uszkodzeniom mikro- i makronaczyniowym w cukrzycy, związanym z końcowymi produktami zaawansowanej glikacji oraz korzystnie wpływa na funkcje poznawcze [152]. W Tabeli 7 przedstawiono przykłady badań klinicznych leków o działaniu metabolicznym w leczeniu AD.

Tabela 7. Badania kliniczne prowadzone dla leków o działaniu metabolicznym w AD [145].

Preparat	Numer badania klinicznego	Faza badania	Oznaczone biomarkery
<i>Metformina XR</i>	NCT04098666	II/III	SUVR $A\beta$ w mózgu; SUVR białko <i>tau</i> w mózgu; osoczowy $A\beta$
<i>Metformina</i>	NCT01965756	II	CSF $A\beta$, całkowite białko <i>tau</i> , stężenie ufosforylowanego białka <i>tau</i>
<i>Metformina</i>	NCT00620191	II	osoczowy $A\beta_{42}$
<i>Pioglitazon</i>	NCT00982202	II	nieprawidłowości laboratoryjne
<i>T3D-959</i>	NCT04251182	II	współczynnik osoczowego $A\beta_{42}/40$
<i>Rosiglitazon XR</i>	NCT00428090	III	HgbA1c, masa ciała
<i>MSDC-0160 (Mitoglitazon)</i>	NCT01374438	II	Adiponektyna
<i>Dapagliflozyna</i>	NCT03801642	I/II	mózgowy metabolizm glukozy, HgbA1c, aktywność oksydazy cytochromowej, MCP-1, eotaksyna-1, TNF- α , CRP
<i>Empagliflozyna</i>	NCT03852901	I	Ciała ketonowe
<i>Eksenatyd</i>	NCT01255163	II	Ciała ketonowe
<i>Liraglutyd</i>	NCT01843075	II	mózgowy metabolizm glukozy
<i>Semaglutyd</i>	NCT04777396	III	CDR-SB

SUVR (standardized uptake value ratio) - wartość standaryzowanego współczynnika wychwyty; CSF (cerebrospinal fluid) - płyn mózgowo-rdzeniowy; HgbA1c (haemoglobin-A1c) - hemoglobina A1c; MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) - białko chemotaktyczne monocytów; TNF (tumour necrosis factor) - czynnik martwicy nowotworów; CRP (C-reactive protein) - białko C-reaktywne; CDR-SB (Clinical Dementia Rating Scale Sum of Boxes) - Kliniczna Skala Oceny Otepienia - ilościowa ocena „sumy pól”

7. Zastosowanie leków przeciwpsychotycznych w leczeniu AD

7.1. Behawioralne i psychologiczne objawy demencji

Wielu pacjentów chorujących na AD cierpi jednocześnie na behawioralne i psychologiczne objawy demencji (BPSD, behavioral and psychological symptoms of dementia), które obejmują szeroki wachlarz zaburzeń psychicznych i emocjonalnych [153]. Międzynarodowe Towarzystwo Psychiatrii Geriatrycznej (International Society of Geriatric Psychiatry) definiuje objawy psychologiczne i behawioralne związane z AD jako grupę powszechnych, nieprawidłowych objawów u pacjentów z otępieniem. Pacjenci z demencją wykazują różne formy objawów psychologicznych i behawioralnych, m.in. depresję, agresję, apatię, urojenia, pobudzenie, euforię,

halucynacje, a także zaburzenia snu. Jak wskazują dane, wśród 50% pacjentów geriatrycznych cierpiących na AD lub inne formy demencji występują stany psychiatryczne, depresja ujawnia się u 20-30% chorych, podczas gdy na zaburzenia lękowe cierpi około 20%. Jak podaje Abraha i współautorzy [154] częstość występowania zaburzeń percepcyjnych u pacjentów z otępieniem jest wysoka. U około 20% osób bez objawów behawioralnych w chwili rozpoznania choroby w ciągu 2 lat wystąpią niektóre z ww. objawów [154].

BPSD są ważną częścią klinicznych objawów otępienia i obejmują wyżej wymienione rodzaje objawów psychicznych. Nie wszystkie zachowania psychiczne występują w tym samym czasie i często występują pojedynczo lub jako kombinacja wielu objawów. W trakcie rozwoju choroby u pacjentów z AD inteligencja stopniowo spada, co dodatkowo pogłębia uszkodzenie funkcji społecznych i zwiększa obciążenie rodziny [155]. Wystąpienie BPSD prowadzi do większego upośledzenia funkcji poznawczych, gorszej jakości życia, przedłużonego pobytu w szpitalu, trudniejszego wypisu i zwiększonej śmiertelności [156,157]. Cechy objawów psychiatrycznych w AD zwykle różnią się od cech występujących w innych zaburzeniach psychicznych. W porównaniu ze schizofrenią, urojenia w AD są prostsze i charakteryzują się głównie niedowierzaniem, nieufnością wobec członków rodziny i zwiększoną podejrzliwością [158]. Halucynacje w przebiegu AD mają zwykle charakter wzrokowy, rzadziej somatyczny i węchowy [159]. Pobudzenie u pacjentów z AD prowadzi do zwiększonego poczucia stanu zagrożenia [159].

W ostatnim czasie pojawiły się także doniesienia wskazujące, że łagodne zaburzenia zachowania, klinicznie objawiające się jako zaburzenia neuropsychiatryczne, mogą reprezentować fazę prodromalną AD. W związku z powyższym BPSD mogą zostać uznane za nowy cel w przyszłych badaniach klinicznych AD oraz mogą stanowić strategie profilaktyki wtórnej u pacjentów z przedklinicznymi objawami AD. Dlatego zrozumienie patofizjologii BPSD w AD stanowi istotny krok w kierunku projektowania leków modyfikujących przebieg choroby, zdolnych do przeciwdziałania progresji AD [160].

Niestety, farmakoterapia BPSD jest skomplikowana i trudna; dostępne metody leczenia są ograniczone, powodzenie terapii jest zróżnicowane, a spektrum możliwych działań niepożądanych ogranicza wybór leku [161]. Jak wskazuje przegląd literatury

wykonany przez Abraha i współautorów [154] preferowanym podejściem w terapii BPSD w przebiegu AD są metody nefarmakologiczne; jednak pomimo wielu badań nie ma wystarczających dowodów skuteczności m.in. psychoterapii czy zooterapii ze względu na brak jednorodności pod względem wielkości próby w badaniach, przyjętej interwencji oraz okresu obserwacji [154]. Aktualnie nie ma specyficznej farmakoterapii, która zmniejszałaby objawy BPSD, a stosowane obecnie w tych stanach neuroleptyki mają ograniczoną skuteczność kliniczną, powodują poważne działania niepożądane, mogą pogłębiać upośledzenie funkcji poznawczych i są powiązane ze zwiększonym ryzykiem zgonu pacjentów w podeszłym wieku. Poza tym, należy podkreślić, że dostępne obecnie leki przeciwpsychotyczne zostały zatwierdzone do leczenia schizofrenii i choroby afektywnej dwubiegunowej, a więc schorzeń związanych z odmiennymi zaburzeniami neurobiologicznym niż BPSD. Pomimo wymienionych trudności w leczeniu BPSD, Davies i współautorzy [157] zaprojektowali i opracowali oparty na dowodach algorytm, który pomaga lepiej radzić sobie z objawami BPSD i kierować w zakresie wyboru odpowiedniego leku.

7.2. Neuroleptyki w leczeniu AD

Aktualne wytyczne zalecają stosowanie leków przeciwpsychotycznych, tylko w przypadku braku skuteczności wcześniejszych interwencji pierwszego rzutu i nie dłużej niż przez 12 tygodni, ponieważ długotrwałe stosowanie neuroleptyków wiąże się ze zwiększonym ryzykiem zgonu i zwiększoną częstością incydentów naczyniowo-mózgowych w pacjentów z otępieniem [162]. Długotrwałe podawanie leków przeciwpsychotycznych jest zalecane tylko u pacjentów ze skrajnie ciężkimi objawami BPSD [163].

Leki przeciwpsychotyczne, określane także jako neuroleptyki, stosowane są w leczeniu objawów wielu zaburzeń psychicznych. W większości przypadków działają uspokajająco i są stosowane w leczeniu psychoz lub zaburzeń afektywnych dwubiegunowych. Leki przeciwpsychotyczne ogólnie dzieli się na trzy grupy: leki przeciwpsychotyczne pierwszej generacji lub „typowe neuroleptyki”, leki przeciwpsychotyczne drugiej generacji (tzw. „atypowe”) oraz leki przeciwpsychotyczne trzeciej generacji (Tabela 8). Typowe leki przeciwpsychotyczne dzieli się ze względu na ich budowę chemiczną, natomiast leki atypowe ze względu na właściwości farmakologiczne [164].

Tabela 8. Ogólna klasyfikacja leków przeciwpsychotycznych. Opracowanie własne na podstawie [165].

<p>Typowe leki przeciwpsychotyczne (pierwsza generacja)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Pochodne fenotiazyny - Chlorpromazyna, Flufenazyna, Perfenazyna, Prochlorperazyna, Tiorydazyna, Trifluoperazyna, Mezorydazyna, Promazyna, Triflupromazyna, Prometazyna, Lewomepromazyna, Cyjamemazyna • Pochodne tioksantenu - Chlorprotiksen, Klopentyksol, Flupentyksol, Zuklopentyksol • Pochodne butyrofenonu - Haloperidol, Droperidol, Bromperidol, Benperidol • Pochodne difenylobutylopiperydyny - Pimozyd, Penfluridol
<p>Atypowe leki przeciwpsychotyczne (druga generacja)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Klozapina, Olanzapina, Risperidon, Kwetiapina, Zyprazydon, Amisulpiryd, Asenapina, Paliperydon, Illoperydol, Zotepina, Sertyndol, Lurazydon
<p>Trzecia generacja leków przeciwpsychotycznych</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Arypiprazol

Leki przeciwpsychotyczne pierwszej generacji hamują przekaźnictwo dopaminergiczne, podczas gdy leki przeciwpsychotyczne drugiej generacji to antagoniści receptorów dopaminergicznych D₂ i serotoninerdycznych (5-HT, 5-hydroxytryptamine). Wykazano, że leki przeciwpsychotyczne oddziałują z kilkoma receptorami serotoninerdycznymi, takimi jak receptory 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₆ [166].

Wszystkie leki przeciwpsychotyczne są stosowane w leczeniu różnych chorób neuropsychiatrycznych, w tym psychozy, zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD, attention deficit hyperactivity disorder), pobudzenia geriatrycznego, depresji, zaburzeń odżywiania, zaburzeń osobowości, bezsenności, zespołu lęku uogólnionego, zaburzeń obsesyjno-kompulsyjnych oraz zespołu stresu pourazowego (PTSD, post-traumatic stress disorder) [167]. Niektóre z tych wskazań są obecnie uważane za niezgodne z zaleceniami, a skuteczność leków przeciwpsychotycznych w ich leczeniu jest niejednoznaczna.

Jedynym lekiem dopuszczonym do leczenia BPSD w AD (tylko w Kanadzie i Europie) jest risperidon, którego zastosowanie ogranicza się do krótkotrwałego leczenia agresji. Risperidon jest antagonistą receptorów dopaminergicznych,

serotonergicznym i adrenergicznym, stosowanym w leczeniu epizodów maniakalnych i zaburzeń afektywnych dwubiegunowych. Lek ten jest także zarejestrowany do krótkoterminowego leczenia objawów behawioralnych w przebiegu demencji m.in. w Wielkiej Brytanii, ale nie w USA [157]. W Polsce zaleca się stosowanie tego leku z dużą ostrożnością jedynie w pobudzeniu spowodowanym obecnością psychozy, natomiast nie powinien być stosowany w otępieniu naczyniowym lub mieszanym. Wynika to z analizy badań kontrolowanych placebo, dotyczących stosowania rysperidonu w BPSD, które wykazały zwiększone ryzyko zgonu u chorych stosujących ten lek z powodu zaburzenia rytmu serca i zapalenia płuc [168].

Istnieje kilka badań klinicznych, które oceniły skuteczność rysperidonu w leczeniu BPSD. Znaczącą poprawę agresji, mierzoną za pomocą skali Oceny Zaburzeń Zachowania w Chorobie Alzheimera (BEHAVE-AD, Behavioral Pathology in Alzheimer's Disease Rating Scale), zaobserwowano po zastosowaniu rysperidonu w dawkach 1 i 2 mg w porównaniu z placebo [169]. Stwierdzono także korzystne działanie rysperidonu w dawce 1 mg w porównaniu z placebo w leczeniu psychozy [169]. Działanie rysperidonu w leczeniu BPSD oceniono także w wielośrodkowym badaniu Antipsychotic Discontinuation in Alzheimer's disease (ADAD), które objęło 180 pacjentów z AD i pobudzeniem lub psychozą. Cała kohorta otrzymywała rysperidon przez 16 tygodni, a następnie została losowo przydzielona do grupy otrzymującej rysperidon przez 32 tygodnie, rysperidon przez 16 tygodni i placebo przez kolejne 16 tygodni lub placebo przez 32 tygodni. Odstawienie leku doprowadziło do zwiększonego ryzyka nawrotu zaburzeń psychiatrycznych w początkowym okresie po odstawieniu leku, szczególnie w przypadku występowania ciężkich halucynacji na początku badania [170]. Inne leki przeciwpsychotyczne drugiej generacji, takie jak olanzapina, kwetiapina czy trzeciej generacji – aripiprazol, są powszechnie stosowane poza wskazaniami w leczeniu psychoz i pobudzenia u pacjentów z AD pomimo średniej skuteczności i poważnych obaw dotyczących bezpieczeństwa [163].

Olanzapina jest atypowym lekiem przeciwpsychotycznym zarejestrowanym do leczenia schizofrenii i choroby afektywnej dwubiegunowej u dorosłych. Skuteczność tego leku w leczeniu objawów behawioralnych w przebiegu AD została oceniona w kilku badaniach klinicznych. Korzystne działanie olanzapiny wykazało m.in. badanie z udziałem ponad 600 pacjentów z AD z urojeniami lub halucynacjami, losowo przydzielonych do grupy otrzymującej placebo lub określoną dawkę olanzapiny (1,0; 2,5; 5,0 lub 7,5 mg/dobę) przez 10 tygodni. Poprawę stanu psychicznego objawiającego

się zmniejszeniem częstości urojeń i halucynacji zaobserwowano w grupie leczonej, od dawki 2,5 mg, z wyższą skutecznością dla dawki 7,5 mg [171]. W innym badaniu Deberdt i współautorzy [172] porównali skuteczność i tolerancję olanzapiny i rysperidonu z placebo u pacjentów z AD doświadczających psychoz. Co ciekawe, poprawę w zakresie funkcjonowania neuropsychiatrycznego ocenianego w skali oceny neuropsychiatrycznej (NPI, Neuropsychiatric Inventory) oraz skali Ogólnej Oceny Klinicznej (CGI-S, Clinical Global Impression–Severity) zaobserwowano we wszystkich trzech grupach, z wyższym odsetkiem zdarzeń niepożądanych i odstawienia w grupie rysperidonu i olanzapiny [172].

Kwetiapina jest lekiem zarejestrowanym do leczenia schizofrenii i choroby afektywnej dwubiegunowej u dorosłych. Ponadto, stosowana jest „poza wskazaniami” w leczeniu lęku, bezsenności, zespołu stresu pourazowego i behawioralnych objawów w demencji. Przeprowadzone badania kliniczne wykazały, że kwetiapina stosowana w dawce 200 mg na dzień korzystnie wpływa na występowanie objawów behawioralnych u pacjentów z AD w porównaniu z placebo ocena w skali PANSS-EC (Positive and Negative Syndrome Scale - Excitement Component) oraz w skali CGI-C, (Clinical Global Impression of Change). Dawka 100 mg nie wykazała różnic w porównaniu do grupy placebo [173]. Z kolei Vigen i współautorzy [174] nie zaobserwowali korzystnego wpływu kwetiapiny w porównaniu z placebo lub innymi lekami przeciwpsychotycznymi w leczeniu BPSD (badanie CATIE-AD, Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness-Alzheimer's Disease) [174]. Także inne randomizowane badanie kliniczne wśród pacjentów chorujących na AD nie wykazało korzystnego wpływu leku na pobudzenie pacjentów oraz funkcje poznawcze w porównaniu z placebo [175].

Arypiprazol jest atypowym lekiem przeciwpsychotycznym zarejestrowanym w leczeniu schizofrenii u dorosłych i młodzieży, manii w chorobie afektywnej dwubiegunowej u dzieci, młodzieży i dorosłych, autyzmu oraz ciężkich zaburzeń depresyjnych (MDD, major depressive disorder) u dorosłych. Ze względu na bezpieczniejszy profil lek ma szersze zastosowanie, do którego należą psychozy u starszych pacjentów z otępieniem [158]. W 10-tygodniowym, wieloośrodkowym badaniu klinicznym 208 pacjentów z AD z urojeniami lub halucynacjami przydzielono losowo do grupy otrzymującej arypiprazol w dawce początkowej 2 mg/dobę (dawka końcowa 10 mg/dobę) lub placebo. Wyniki badania mierzone w skali NPI wykazały poprawę w zakresie występowania psychoz w obu grupach (arypiprazol: -6,55; placebo:

- 5,52; $p = 0,17$ w punkcie końcowym badania). Ponadto, pacjenci leczeni aripiprazolem wykazywali znacznie większą poprawę w stosunku do wartości wyjściowych w wynikach skali BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale), m.in. w zakresie psychozy w punkcie końcowym w porównaniu z placebo [176]. Autorzy badania podsumowali, że aripiprazol wykazywał podobną do placebo poprawę objawów psychotycznych ocenianą na podstawie wyników skali NPI, ale lek miał znacznie większy wpływ na ocenę BPRS u pacjentów z AD z psychozą, którzy nie byli hospitalizowani. Zaobserwowano, że aripiprazol był bezpieczny i dobrze tolerowany w tej populacji pacjentów [176]. Skuteczność aripiprazolu w dawce 10 mg w zwalczaniu objawów behawioralnych u pacjentów z AD została także potwierdzona w innym wielośrodkowym, kontrolowanym placebo badaniu klinicznym [177].

Poza wyżej wymienionymi lekami antypsychotycznymi w badaniach klinicznych znajdują się także inne atypowe neuroleptyki, takie jak pimawanseryna, lumateperon i brekspiprazol. Pimawanseryna, lek zatwierdzony do leczenia halucynacji i urojeń w chorobie Parkinsona, wpływa na aktywność receptorów $5HT_{2A}$ oraz $5HT_{2C}$ bez antagonizowania receptorów D_2 . Podwójnie ślepe, kontrolowane badanie fazy II przeprowadzone w Wielkiej Brytanii wykazało znaczną poprawę wyników w skali NPI w zakresie psychozy w grupie leczonej w porównaniu z placebo po 6 tygodniach leczenia [178]. Pojawiły się jednak obawy co do wiarygodności wyników ze względu na niewielki efekt, obserwowany dopiero po 6 tygodniach oraz potencjalne problemy z bezpieczeństwem. Trwają także badania kliniczne nad zastosowaniem lumateperonu u pacjentów z AD wykazujących klinicznie istotne pobudzenie [153]. Brekspiprazol, modulator receptorów serotoninowych i dopaminowych o częściowym działaniu agonistycznym na receptory $5HT_{1A}$ i D_2 i D_3 oraz antagonistycznym względem receptorów $5HT_{2A/B}$ został zatwierdzony do leczenia schizofrenii i MDD [160,179]. Wyniki badań klinicznych z udziałem tego leku są niejednoznaczne, ale jednocześnie wskazują, że lek w dawce 2 mg na dobę jest bezpieczny i dobrze tolerowany u pacjentów z AD z łagodnymi lub umiarkowanymi działaniami niepożądanymi (ból głowy, zawroty głowy i senność). Trwają dalsze badania fazy III nad zastosowaniem brekspiprazolu w leczeniu BPSD u pacjentów z AD [160].

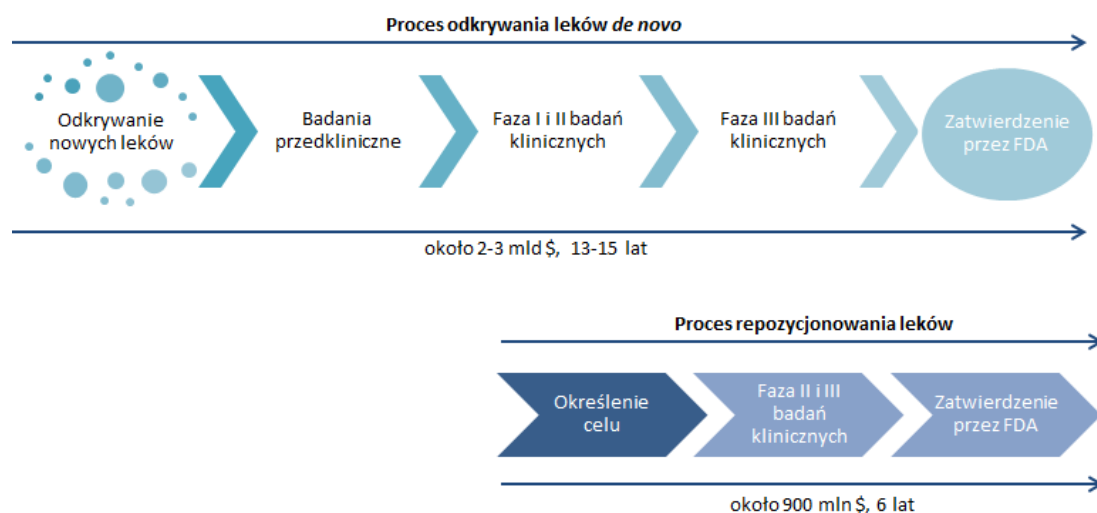
8. Repozycjonowanie leków

8.1. Koncepcja repozycjonowania

Proces odkrywania i opracowywania nowych wiodących cząsteczek o pożądanym właściwościach farmakologicznych i fizykochemicznych (*de novo drug development*), oparty jest o tradycyjne strategie ich poszukiwania, bazujące na screeningu fenotypowym (PDD, phenotypic drug discovery) lub podejściu ukierunkowanym na cel (TDD, target-based drug discovery). Screening fenotypowy to badanie przesiewowe leków w komórkowych lub zwierzęcych modelach chorób w celu poszukiwania związków aktywnych, które wykazują oczekiwany efekt biologiczny, a więc modulują znany proces i tym samym poprawiają zaburzone funkcjonowanie badanych komórek lub tkanek [180]. Z kolei opracowywanie leków na podstawie celu jest strategią ukierunkowaną na identyfikację i walidację celu molekularnego, tj. białka, kompleksu białkowego, genu odpowiedzialnego za inicjację, promocję czy progresję choroby, a następnie na poszukiwaniu aktywnych cząsteczek, które wykazują zdolność do modulowania lub całkowitego hamowania aktywności tego celu biologicznego [181].

Tradycyjne odkrywanie i opracowywanie leków jest niestety żmudnym oraz długotrwałym procesem, który obciążony jest dużymi kosztami badań i rozwoju (R&D, research and development) oraz wysokim ryzykiem niepowodzenia. Dostępne raporty wskazują, że przeciętny całkowity koszt odkrycia leku *de novo* wynosi około 2-3 miliardów dolarów. Całkowity proces opracowywania nowej cząsteczki leczniczej zajmuje od 13 do 15 lat [182]. Procedura tworzenia leków *de novo* oprócz tego, że jest procesem niezwykle kosztownym to jest również bardzo ryzykowna. Tylko nieliczne substancje przechodzą pozytywnie przez cały proces badawczy. Szacuje się, że wskaźnik sukcesu w opracowaniu nowego leku wynosi średnio tylko 2 % [183-185]. Ta niekorzystna sytuacja wymusza na koncernach farmaceutycznych znalezienie tańszych, szybszych i bardziej efektywnych metod odkrywania nowych substancji leczniczych, a jedną z takich metod jest tzw. repozycjonowanie leków. W literaturze naukowej można znaleźć również pojęcia zamienne dla repozycjonowania leków tj. „przekierowywanie leków” lub „znajdowanie nowych zastosowań dla starych leków” (drug repurposing, drug reprofiling, drug retasking, drug repositioning). Repozycjonowanie leków jest obiecującą ścieżką umożliwiającą znalezienie leków

o nowych wskazaniach terapeutycznych, która pozwala na skrócenie czasu jak i zmniejszenie kosztów związanych z badaniami wstępnymi, optymalizacją struktury chemicznej, przesiewową analizą *in vitro* i *in vivo*, badaniami toksykologicznymi czy klinicznymi (Rysunek 6) [186].



Rysunek 6. Porównanie procesu odkrywania leków de novo z koncepcją repozycjonowania leków wg [180-180].

Strategia repozycjonowania leków ma na celu znalezienie nowej aktywności biologicznej oraz weryfikację skuteczności leków już zarejestrowanych i będących na rynku farmaceutycznym, a także cząsteczek odrzuconych wcześniej w badaniach klinicznych, w nowych wskazaniach, które są całkowicie odmienne od wskazań, do których związki te zostały przewidziane. Repozycjonowanie, w porównaniu z tradycyjnym odkrywaniem leków, wymaga zdecydowanie mniej czasu, ponieważ pozwala ominąć początkowe etapy projektowania i syntezy cząsteczki, określania jej właściwości fizykochemicznych, pomija się również badania toksykologiczne i przedkliniczne. Jest to możliwe, ponieważ wszystkie te badania zostały już wykonane dla danej cząsteczki i wszystkie niezbędne dane i informacje dotyczące bezpieczeństwa i skuteczności są dostępne. Ponadto, ustalona została już skuteczna dawka danego leku oraz droga jego podania, co wpływa na szybsze rozpoczęcie badań klinicznych w celu ustalenia skuteczności danego leku w innym schorzeniu niż to, do którego została pierwotnie zaprojektowana [186].

Dostępne raporty wskazują, że repozycjonowanie leków może być szczególnie istotne dla rozwoju terapii chorób rzadkich, tj. takich, na które cierpi stosunkowo niewielki odsetek pacjentów w skali globalnej. Choroby rzadkie bardzo często są nieuleczalne, ponieważ w wielu przypadkach są to schorzenia o podłożu genetycznym, a także brakuje danych dotyczących samego przebiegu choroby oraz odpowiednich leków. Firmy farmaceutyczne rzadko podejmują się rozwoju nowych leków do leczenia chorób rzadkich, ponieważ badania wymagają ogromnych nakładów finansowych, a prawdopodobieństwo pomyślnego wprowadzenia farmaceutyku na rynek jest niewielkie. Stąd też firmy farmaceutyczne zdecydowanie chętniej sięgają po narzędzie, jakim jest repozycjonowanie leków, będące wyraźnie tańszą i szybszą alternatywą dla konwencjonalnego procesu rozwoju leków [187].

8.2. Strategie repozycjonowania

Repozycjonowanie leków zapoczątkowały przypadkowe obserwacje korzystnych efektów działania leków u ludzi, które nie zostały przewidziane przez badaczy. Ten sposób pozyskiwania nowych leków wciąż bywa wykorzystywany, szczególnie w IV fazie badań klinicznych, gdzie obserwuje się efekty działania leków już zarejestrowanych. Jednak ze względu na szybki rozwój technik bioinformatycznych i chemoinformatycznych, przypadkowe odkrycia nowych wskazań leków straciły na znaczeniu, a proces repozycjonowania aktualnie opiera się na racjonalnym podejściu wykorzystującym wiedzę nt. leków oraz chorób. Niebagatelną rolę w reprofilingu leków odgrywają także systemy komputerowe, które łączą dostępne dane w poszukiwaniu najbardziej obiecujących kandydatów na leki repozycjonowane [15,188].

Strategie repozycjonowania leków można podzielić na dwie grupy, tj. metody doświadczalne oraz metody obliczeniowe. W obrębie metod doświadczalnych wyróżniamy testy wiązania, które pozwalają określić powinowactwo związków chemicznych do określonych celów molekularnych oraz fenotypowe metody przesiewowe polegające na testowaniu w warunkach *in vitro* dużych bibliotek związków w poszukiwaniu tych, które najsilniej zmieniają fenotyp komórek [15,186]. Druga grupa metod, tj. metody obliczeniowe wykorzystują skomplikowane systemy komputerowe łączące dane o znanych celach molekularnych, lekach, biomarkerach chorobowych czy patogenezie schorzeń w celu identyfikacji tych leków,

które z wysokim prawdopodobieństwem okażą się efektywne klinicznie. Ta grupa metod, w porównaniu do metod doświadczalnych, jest zdecydowanie mniej kosztochłonna oraz stwarza mniej ograniczeń. W obrębie metod obliczeniowych można wyróżnić:

- metody skoncentrowane na leku, które wykorzystują fakt, że wiele leków oddziałuje nie z jednym, ale z kilkoma różnymi celami molekularnymi, co sprawia, że lek dysponuje potencjałem zastosowania go w innych jednostkach chorobowych;
- metody oparte na celu, w których przewiduje się oddziaływanie różnych leków z izolowanym celem molekularnym (np. receptorem);
- metody oparte na wiedzy, które pozwalają powiązać informacje nt. znanych leków tak, aby przewidzieć ich dotychczas niepoznane działanie. Wyniki mogą być oparte np. na identyfikacji nowych celów molekularnych lub podobieństwie lek-lek i mogą dać podstawy do zidentyfikowania nowych wskazań dla znanych leków.
- metody wykorzystujące sieci połączeń polegają na analizie interakcji leku z celem oraz różnych mechanizmów działania leków w celu odkrycia nowych, specyficznych dla choroby celów molekularnych;
- metody wykorzystujące geny pozwalają zidentyfikować nowe cele molekularne dla leków oraz określać mechanizmy przebiegu chorób na podstawie analizowania ekspresji wielu genów [15,189].

8.3. Przykłady repozycjonowanych leków

Według Parvathaneni i współautorów [15] usystematyzowana strategia polegająca na poszukiwaniu nowych wskazań dla zarejestrowanych leków przyczyniła się w ostatnich latach do dopuszczenia przez FDA około 30% leków [15,186]. Jednym z pierwszych leków, dla których „odkryto” nowe wskazania jest kwas acetylosalicylowy. Aspiryna początkowo sprzedawana była jako środek przeciwbólowy, jednak zaobserwowano, że w niskich dawkach działa również antyagregacyjnie na płytki krwi. Kolejnym z najczęściej podawanych przykładów leków repozycjonowanych jest sildenafil – inhibitor fosfodiesterazy typu 5 (PDE5, phosphodiesterase 5), opracowany w latach osiemdziesiątych XX wieku, który miał być alternatywą dla nitratów stosowanych w leczeniu dusznicy bolesnej i nadciśnienia.

W badaniach klinicznych okazało się jednak, że lek wywoływał erekcję i to właśnie leczenie zaburzeń wzwodu stało się jego pierwszym wskazaniem, w którym został zarejestrowany i dopuszczony do obrotu w 1998 roku [190]. Kolejnym przykładem repozycjonowania zakończonym sukcesem jest talidomid. Lek ten został opracowany w latach pięćdziesiątych XX wieku jako lek o działaniu uspokajającym, natomiast szersze zastosowanie znalazł w łagodzeniu porannych nudności i wymiotów u kobiet w ciąży. Kilka lat później, kiedy wykazano jego działanie teratogenne, został on wycofany z rynku farmaceutycznego, a jego ewentualny powrót wydawał się niemożliwy. Jednak pod koniec lat dziewięćdziesiątych talidomid ponownie został zatwierdzony do leczenia, tym razem szpiczaka mnogiego [191]. Dane z ostatnich kilku lat zaprezentowane przez Polamreddy i współautorów [192] wskazują, że dla większości (około 60%) repozycjonowanych leków nowe wskazanie znajdowało się w obrębie innego obszaru terapeutycznego. Z kolei pozostała część leków znajduje nowe zastosowania w tym samym obszarze terapeutycznym. Dominujące dziedziny, w których dokonuje się reprofilingu leków to onkologia i neurologia [192].

Istnieje szereg przykładów leków repozycjonowanych, z których jedne uzyskały już dopuszczenie do obrotu, inne zaś znajdują się w trakcie badań klinicznych. Wybrane przykłady zostały przedstawione w Tabeli 9.

Tabela 9. Przykłady leków repozycjonowanych [15,192-196].

Lek	Oryginalne wskazanie	Nowe wskazanie	Etap badań
<i>Kwas acetylosalicylowy</i>	lek przeciwbólowy i przeciwgorączkowy	czerniak złośliwy	II faza badań klinicznych
<i>Minoksydyl</i>	nadciśnienie	porost włosów	dopuszczony
<i>Pioglitazon</i>	DM2	ostra białaczka szpikowa	badania przedkliniczne
<i>Raloksyfen</i>	osteoporoza	rak piersi	dopuszczony
<i>Tamoksyfen</i>	przerzutowy rak piersi	zaburzenie afektywne dwubiegunowe	dopuszczony
<i>Itrakonazol</i>	lek przeciwgrzybiczy	rak prostaty	II faza badań klinicznych
<i>Metformina</i>	DM2	zaawansowany rak prostaty	II faza badań klinicznych
<i>Amfoterycyna B</i>	lek przeciwgrzybiczy	leiszmanioza	ukończona faza III badań klinicznych
<i>Bewacyzumab</i>	rak jelita grubego	rak jajnika wrażliwy na platynę	dopuszczony
<i>Topiramata</i>	padaczka	otyłość	dopuszczony
<i>Fumaran dimetylu</i>	łuszczyca	stwardnienie rozsiane	dopuszczony
<i>Sorafenib</i>	rak wątroby i nerki	rak tarczycy	dopuszczony
<i>Fosmidomycyna</i>	infekcje dróg moczowych	malaria	ukończona faza II badań klinicznych
<i>Auranofina</i>	lek przeciwreumatyczny	giardioza; białaczka i chłoniak; HIV; gruźlica; rak płuc	I/II faza badań klinicznych
<i>Rasagilina</i>	choroba Parkinsona	synukleinoopatie; zaburzenia zachowania podczas snu REM; stwardnienie zanikowe boczne	II/III faza badań klinicznych

8.4. Repozycjonowanie leków w leczeniu AD

W związku z coraz większą wiedzą dotyczącą patomechanizmu powstawania AD dominuje pogląd, że drogą do skutecznej terapii jest oddziaływanie leków na więcej niż jeden ściśle określony cel molekularny [197,198]. Stąd też duże nadzieje wiąże się z lekami, które wpływają na kilka mechanizmów leżących u podłoża choroby, ponieważ przypuszcza się, że leki takie wykażą większą skuteczność terapeutyczną oraz nie będą indukowały swoistej oporności na leczenie [197].

Jedną z grup leków, których podjęto próby repozycjonowania w AD są leki przeciwnadciśnieniowe, z grupy blokerów receptora angiotensyny (ARB, angiotensin receptor blockers) oraz blokery kanału wapniowego. W badaniach przedklinicznych wykazano ich aktywność neuroprotekcyjną oraz przeciwzapalną. Z grupy ARB zbadano

m.in. telmisartan, losartan, walsartan, kandesartan oraz olmesartan. Część z nich, jak telmisartan czy losartan, zostały włączone do badań klinicznych. Badaniami *in vitro* objęto także szereg pochodnych dihydropirydyny (np. nimodypinę, amlodypinę, nitrendypinę oraz nilwadypinę), a także diltiazem i werapamil. Spośród tych związków na podstawie uzyskanych wyników do badań klinicznych zakwalifikowane zostały nitrendypina i nilwadypina [197].

Ze względu na molekularne powiązania AD z DM2, kolejną grupą leków podlegających repozycjonowaniu są leki przeciwcukrzycowe. Fazę badań klinicznych osiągnęły zarówno różne analogi insuliny, jak i leki syntetyczne, wśród których można wymienić metforminę, pioglitazon, a także analogi GLP-1 takie jak liraglutyd czy eksenatyd [197]. Przykłady leków, które badano pod kątem repozycjonowania w AD przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Przykłady leków, nad którymi były badania zmiany zastosowania ukierunkowane na terapię AD [199,200].

Lek	Grupa leków	Oryginalne wskazanie
<i>Niwaldypina i nimodypina</i>	Blokery kanału wapniowego	Nadciśnienie
<i>Dantrolen</i>	Bloker kanału wapniowego	Spastyczność mięśni
<i>Liraglutyd</i>	analog GLP-1	DM2
<i>Diclofenak</i>	NLPZ	Lek przeciwbólowy
<i>Acyklowir</i>	Analog nukleozydowy	Lek przeciwwirusowy
<i>Minocyklina</i>	Antybiotyk tetracyklinowy	Lek przeciwbakteryjny

Jak podaje Bauzon i współautorzy [201] w 2020 roku w Stanach Zjednoczonych prowadzono 53 badania kliniczne, w których badano 58 leków repozycjonowanych. Większość z tych leków znajduje się w II fazie badań klinicznych. Największy odsetek leków repozycjonowanych w AD stanowią leki hematologiczno-onkologiczne (20%), leki stosowane w chorobach układu sercowo-naczyniowego (18%), leki stosowane w psychiatrii (14%), leki przeciwcukrzycowe (12%) oraz leki stosowane w schorzeniach neurologicznych (10%). Pozostałe leki reprezentują inne obszary terapeutyczne (tj. kannabinoidy, witaminy, alkaloidy czy nutraceutyki). Autorzy dokonali także podziału leków będących w trakcie badań klinicznych ze względu na mechanizm działania, na leki modyfikujące przebieg choroby oraz leki objawowe. Zdecydowana większość z nich, bo aż 78%, to leki modyfikujące przebieg choroby

(DMT, disease-modifying therapy), do których zaliczono leki onkologiczne, leki kardiologiczne oraz przeciwcukrzycowe. Natomiast leki zwalczające objawy AD to głównie leki stosowane w zaburzeniach psychiatrycznych [201].

W fazie badań przedklinicznych znajdują się także leki przeciwdepresyjne. W modelach zwierzęcych, w których stosowano fluoksetynę i wortioksetynę, wykazano ich właściwości w kierunku pobudzania neurogenezy, a tym samym poprawę zapamiętywania i uczenia się [197]. Szereg badań wskazuje także na związek dysbiozy jelitowej z zapadalnością na AD. Zainicjowało to poszukiwania potencjalnych leków na AD w grupie antybiotyków. Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że nieliczne antybiotyki, takie jak ryfampicyna, rapamycyna i minocyklina, posiadają działanie przeciwzapalne i polepszają funkcje poznawcze. Jednak ich zastosowanie u ludzi pozostaje kontrowersyjne [197].

Założenia i cel pracy

AD manifestuje się nie tylko utratą pamięci i pogorszeniem funkcji poznawczych, ale także często towarzyszą jej objawy neuropsychiatryczne - BPSD, obejmujące m.in. pobudzenie, agresję czy lęk, które zwykle leczone są za pomocą leków przeciwpsychotycznych. Udowodniono, że obecność BPSD, zwłaszcza objawów psychotycznych, pogarsza naturalny przebieg demencji, powodując szybsze narastanie deficytów poznawczych, nasilenie funkcjonalnej niepełnosprawności, a w konsekwencji śmierci. Wszystkie te następstwa zaburzeń psychicznych u osób cierpiących na AD wskazują na kluczowe znaczenie proponowanych interwencji terapeutycznych, w tym stosowania leków psychotropowych. Jednak, jak do tej pory, nie podjęto prób oszacowania potencjalnego zastosowania neuroleptyków jako adiuwantów do klinicznie zatwierdzonych AChEIs. Wydaje się to szczególnie istotne w kontekście potencjalnych interakcji, w tym synergizmu bądź antagonizmu, zachodzących pomiędzy zarejestrowanymi lekami w leczeniu AD a neuroleptykami. Potencjalny efekt synergistyczny, mogący skutkować wyższym poziomem ACh w mózgu, może stanowić dodatkowe uzasadnienie klinicznej korzyści dla pacjenta chorującego na AD z jednocześnie występującymi BPSD.

Podstawą do rozpoczęcia badań podjętych w ramach rozprawy doktorskiej były wyniki badań *in silico*, które wskazują, że niektóre leki przeciwpsychotyczne mogą wykazywać potencjał w leczeniu AD. Badania tego typu prognozują potencjalną aktywność leków w odniesieniu do wybranych biochemicznych aspektów i hipotez rozwoju AD, m.in. hipotezy cholinergicznej, odkładania $A\beta$ czy teorii oksydacyjnej. Kumar i współautorzy [16] zastosowali metodę obliczeniową opartą na interakcji ligand-białko w celu oceny potencjalnego zastosowania leków przeciwpsychotycznych do leczenia AD. Przeprowadzili oni przesiewowe badanie *in silico* 150 leków przeciwpsychotycznych względem pięciu głównych celów białkowych (AChE, BuChE, BACE 1, MAO i NMDA) za pomocą dokowania molekularnego. Autorzy stwierdzili, że niektóre leki przeciwpsychotyczne mogą wykazywać działanie przeciwko kilku celom związanym z AD [16]. Spośród przebadanych leków sulmepryd, chlorowodorek promazyny, bromperidol, anizopirrol, melperon, pimozyd, benperidol, azabuperon i anisoperydon istotnie oddziaływały z wybranymi celami białkowymi AD. W oparciu o otrzymane wyniki dokowania, pimozyd wykazywał najlepszą interakcję z AChE,

bromperidol z BuChE, melperon z MAO A, anizopirrol z NMDA, anisoperydon i benperidol z BACE 1 [16]. Niemniej jednak, dane oparte na modelowaniu komputerowym oraz obliczeniach matematycznych nie dostarczają informacji na temat realnych konsekwencji repozycjonowania leków. W przypadku zmiany przeznaczenia *in silico* może istnieć możliwość fałszywie dodatnich wyników podczas badań przesiewowych, a także aktywność potencjalnych cząsteczek leku może się różnić w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*.

W oparciu o dane literaturowe i wyniki badania *in silico* [16] wytypowano 7 leków przeciwpsychotycznych należących do grupy N 05 wg klasyfikacji anatomiczno-terapeutyczno-chemicznej (ATC), o różnej budowie chemicznej (Tabela 11) w celu weryfikacji hipotezy badawczej dotyczącej nowej, potencjalnej aktywności tych związków w leczeniu AD. Umożliwi to także ustalenie zależności między budową, a aktywnością biologiczną neuroleptyków, w tym działaniem hamującym aktywność ludzkich esteraz czy agregację A β .

Tabela 11. *Badane związki z podziałem na generację i przynależność do grupy ATC.*

Generacja	Nazwa związku	Kod ATC	Struktura chemiczna
I	Promazyna	N 05 AA 03	Pochodne fenotiazyny z łańcuchem alifatycznym
	Haloperidol	N 05 AD 01	Pochodne butyrofenonu
	Bromperidol	N 05 AD 06	
	Benperidol	N 05 AD 07	
	Pimozyd	N 05 AG 02	Pochodne difenylobutylopiperydyny
	Penfluridol	N 05 AG 03	
II	Kwetiapina	N 05 AH 04	Pochodne diazepiny, oksazepiny i tiazepiny

Szczegółowe cele badawcze rozprawy doktorskiej obejmują:

1. ocenę stopnia hamowania aktywności ludzkich AChE i BuChE przez badane związki oraz wyznaczenie wartości stężenia hamującego aktywność enzymów w 50% (IC₅₀, half maximal inhibitory concentration),
2. wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznych i wskazanie typu inhibicji,

3. ocenę potencjalnego synergizmu wymienionych substancji leczniczych z donepezilem/rywastygminą w stosunku do AChE i BuChE oraz komputerową symulację synergizmu i antagonizmu badanych leków przy użyciu programu CompuSyn.
4. określenie wpływu badanych leków na agregację $A\beta$,
5. ocenę potencjału antyoksydacyjnego leków przeciwpsychotycznych w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego badanego w erytrocytarnym oraz komórkowym modelu *in vitro*.

Podsumowując, przeprowadzone badania mogą przyczynić się do zgłębienia wiedzy na temat synergizmów/antagonizmów wybranych leków przeciwpsychotycznych z potwierdzonymi klinicznie inhibitorami AChE i BuChE, co w przyszłości może okazać się istotne w leczeniu pacjentów z AD, u których wstępują BPSD. Na przykład, średnie stężenie terapeutyczne kwetiapiny, w badaniach *in vitro*, obniża aktywność BuChE o około 23% co może mieć znaczenie kliniczne w przypadku pacjentów z otępieniem, u których zastosowano skojarzone leczenie donepezilem i kwetiapiną [202]. Ponadto, rezultaty niniejszej dysertacji umożliwiają ocenę wyników prognozowanych w testach *in silico* oraz pozwalają oszacować nowy potencjał farmakologiczny badanych leków przeciwpsychotycznych, co może mieć istotne znaczenie dla dalszych kierunków badań tych związków, a także w praktyce klinicznej terapii AD.

Część badawcza

9. Materiały i odczynniki

9.1. Badane związki

Związki a – i (Rys. 5), o najwyższej czystości ($\geq 98\%$), zakupiono w Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, USA) i zastosowano bez dalszego oczyszczania.

a) Haloperidol

4-[4-(4-chlorofenylo)-4-hydroksy-1-piperidylo]-1-(4-fluorofenylo)-butan-1-on,
M = 375,9 g/mol, (Sigma Aldrich, USA, nr kat. H1512-5MG)

b) Bromperidol

4-[4-(4-bromofenylo)-4-hydroksypiperydyn-1-ylo]-1-(4-fluorofenylo)butan-1-on,
M = 420,3 g/mol, (Sigma Aldrich, USA, nr kat. B1152000)

c) Benperidol

1-{1-[4-(4-Fluorofenylo)-4-oksobutylo]-piperydyn-4-ylo}-1,3-dihydrobenzimidazol-2-on,
M = 381,4 g/mol, (Sigma Aldrich, USA, nr kat. B0470000)

d) Penfluridol

1-[4,4-bis(4-fluorofenylo)butylo]-4-[4-chloro-3-(trifluorometylo)fenylo]piperydyn-4-ol,
M = 524,0 g/mol, (Sigma Aldrich, USA, nr kat. P3371-50MG)

e) Pimozyd

1-[1-[4,4-bis(4-fluorofenylo)butylo]-4-piperydynylo]-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-on,
M = 461,6 g/mol, (Sigma Aldrich, USA, nr kat. P1793-500MG)

f) Kwetiapiny fumaran

2-[2-(4-dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-ylo-1-piperazylo)etoksy]etanolu fumaran,
M = 441,5 g/mol, (Sigma Aldrich, USA, nr kat. PHR 1856-1G)

g) Promazyny chlorowoderek

10-(3-dimetyloaminopropylo)fenotiazyny chlorowoderek,
M = 320,9 g/mol, (Sigma Aldrich, USA, nr kat. P6656-25G)

h) Donepezilu chlorowodorek

2-[(1-benzylpiperidyn-4-ylo)metylo]-5,6-dimetoksy-2,3-dihydroinden-1-onu chlorowodorek,

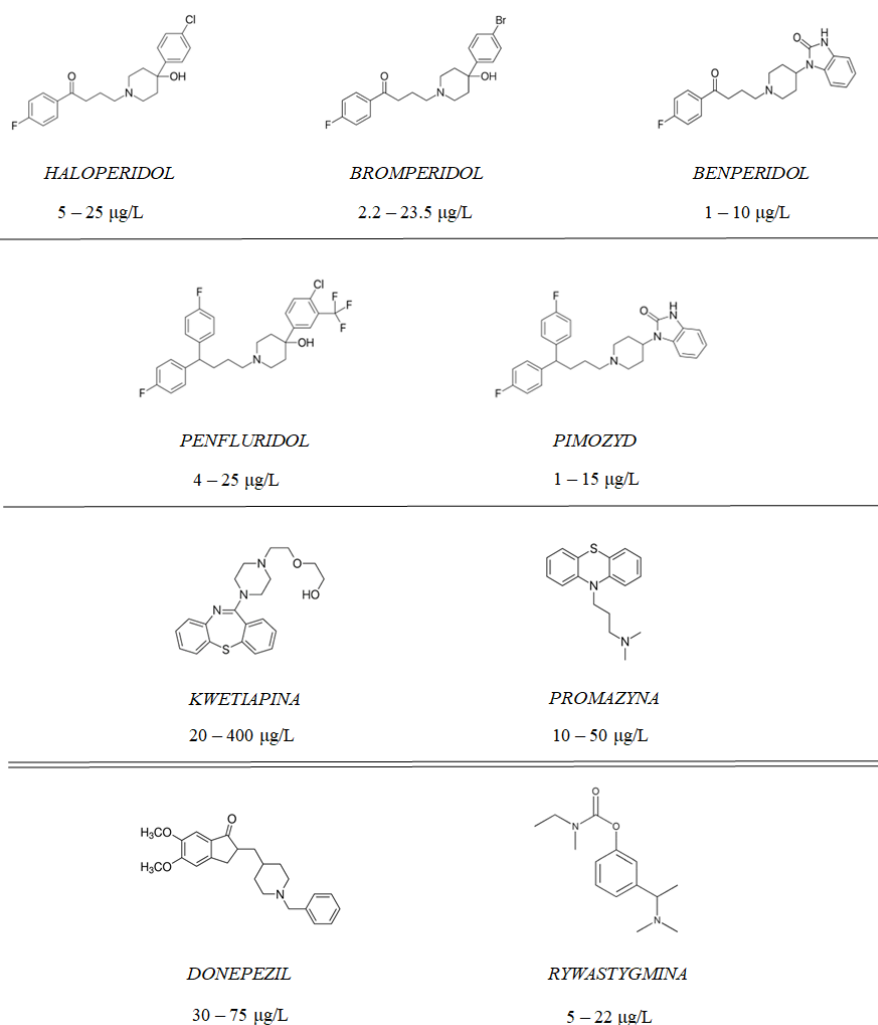
M = 415,9 g/mol, (Sigma Aldrich, USA, nr kat.D6821-10MG)

i) Rywastygminy winian

N-etylo-N-metylokarbaminian (S)-3-[1-(dimetyloamino)etylo]fenylu winian,

M = 400,4 g/mol, (Sigma Aldrich, USA, nr kat. SML0881-50MG)

Rysunek 7 przedstawia strukturę chemiczną oraz zakres stężeń terapeutycznych badanych leków przeciwpsychotycznych.



Rysunek 7. Budowa chemiczna badanych leków przeciwpsychotycznych oraz zatwierdzonych do stosowania klinicznego inhibitorów AChE: donepezilu i rywastygminy. Dla każdego związku podano zakres stężeń terapeutycznych w osoczu [203-214]. Wzory strukturalne opracowane zostały z wykorzystaniem programu ChemSketch.

9.2. Odczynniki

Reakcje enzymatyczne zostały wykonane z użyciem następujących odczynników:

- 0,1 mol/L bufor fosforanowy o pH = 7,0 i pH = 8,0 (fosforan dwusodowy, fosforan jednosodowy (J.T. Baker, USA));
- podstawowy roztwór jodku acetylotiocholiny w wodzie (ATC; 21,67 mg/mL) (Sigma Aldrich, USA);
- podstawowy roztwór jodku butyrylotiocholiny w wodzie (BTC; 20,50 mg/mL) (Sigma Aldrich, USA);
- roztwór podstawowy kwasu 5,5'-disulfanodiylobis(2-nitrobenzoesowego) (DTNB; 0,01 mol/L) (Sigma Aldrich, USA) przygotowany w buforze fosforanowym o pH = 7,0.

Roztwory: ATC, BTC oraz DTNB przechowywano w małych porcjach, w temperaturze -30 °C. Przed każdym eksperymentem odczynniki ogrzewano do temperatury 37 °C, przez 15 minut. Do określenia parametrów kinetycznych i typu inhibicji enzymatycznej wykorzystano odpowiednie rozcieńczenia roztworów podstawowych ATC i BTC (1:2 – 1:20).

Odczynniki stosowane do oceny potencjału antyoksydacyjnego leków przeciwpsychotycznych:

- 0,9% NaCl (0,15 mol/L) (Chempur, Polska);
- 2,0% obj./obj. Triton X-100 (Polskie Odczynniki Chemiczne, Polska);
- 50 g/L heksacyjanożelazian (II) potasu ($K_4[Fe(CN)_6]$) (Polskie Odczynniki Chemiczne, Polska);
- 15,0 mmol/L, 17,5 mmol/L, 50 mmol/L dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-metylopropionamidyny) (AAPH, Sigma Aldrich, USA).
- 10 µg/mL kwas askorbinowy (AA, Sigma Aldrich, USA)

Roztwory przygotowywano *ex tempore*.

Odczynniki zastosowane do badania agregacji A β 42:

- rekombinowany ludzki A β 1-42, ultra czysty (Sigma Aldrich, USA). Przygotowany w 1% NH₄OH roztwór podstawowy A β 42 o stężeniu 220 µmol/L przechowywano w małych porcjach w temperaturze -30 °C i przed każdym eksperymentem ogrzewano w temperaturze pokojowej przez 15 min.

- Roztwór tioflawiny T (Thioflavin T, ThT; Sigma Aldrich, USA), o stężeniu 0,03 mol/L, przygotowany został w buforze fosforanowym o pH = 7,4 (fosforan dwusodowy, fosforan jednosodowy (J.T. Baker, USA)).

Hodowla komórkowa

Ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej (HUVEC, Human Umbilical Vein Endothelial Cells) zakupione zostały w Lonza (Lonza, Szwajcaria) i hodowane zgodnie z wytycznymi producenta, stosując odpowiednie odczynniki: EGM-2 — medium wraz z czynnikami wzrostu (Lonza, Szwajcaria). Komórki hodowano w inkubatorze (Heracell VIOS 160i, ThermoFisher Scientific, USA) w obecności 5,0% CO₂, w temperaturze 37 °C. Komórki hodowano w butelkach hodowlanych o powierzchni dna 75 cm², w objętości 10,0 mL pożywki (medium EGM-2, Lonza, Szwajcaria). W celu pasażowania komórek, po stwierdzeniu 80% konfluencji komórek, butelki hodowlane przepłukano buforem HEPES (Lonza, Szwajcaria), a następnie dodano 5,0 mL roztworu akutazy (Sigma Aldrich, USA) w celu oderwania ich od powierzchni butelki. Po 4 – 5 minutach inkubacji komórek w temperaturze 37 °C, za pomocą mikroskopu optycznego (Opta-Tech) sprawdzono czy komórki się odkleiły od powierzchni naczynia hodowlanego. Pipetą serologiczną przeniesiono zawiesinę komórek do probówki wirówkowej, a butelkę przepłukano buforem HEPES (5,0 mL). Zawiesinę komórek odwirowano (5 min, 220 x g; wirówka Sorvall ST 8R, ThermoFisher Scientific, USA). Pobrano roztwór znad osadu komórek i dodano 5,0 mL pożywki, po czym dokładnie zmieszano w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny. Liczba komórek została obliczona przy użyciu komory Neubauera, a roztwór rozcieńczono do odpowiedniej objętości i wysiano komórki do kolejnych butelek hodowlanych (75 cm²).

Astrocyty zakupiono w Life Technologies (ThermoFisher Scientific, USA) jako Gibco Kit, stanowiący: Gibco Human Astrocytes Kit zawierający prawidłowe komórki ludzkie oraz Gibco Astrocyte Medium Kit składający się z: podłoża podstawowego (DMEM), suplementu N-2 i surowicy płodowej bydlęcej OneShot (FBS) (ThermoFisher Scientific, USA). Komórki hodowano w inkubatorze (Heracell VIOS 160i, ThermoFisher Scientific, USA) w obecności 5,0% CO₂, w temperaturze 37 °C, zgodnie z wytycznymi producenta w butelkach hodowlanych (75 cm²) pokrytych Geltrex (ThermoFisher Scientific, USA). Roztwór podstawowy Geltrex, przygotowano

zgodnie z zaleceniami producenta – rozcieńczono go w stosunku 1:1 w pożywce DMEM i przechowywano w małych porcjach w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bezpośrednio przed użyciem, roztwór rozmrożono i rozcieńczono 1:100 w DMEM, a następnie pokryto dno naczynia hodowlanego w ilości $200\text{ }\mu\text{l}$ matrycy Geltrex™ na cm^2 naczynia hodowlanego. Butelkę hodowlaną pokrytą Geltrex inkubowano w temperaturze $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 1 godzinę. W celu wysiania komórek, butelki hodowlane przepłukano wstępnie roztworem soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (DPBS) firmy Dulbecco z jonami wapnia i magnezu (ThermoFisher Scientific, USA), a następnie wysiano komórki do naczynia hodowlanego i dodano 10 mL pożywki DMEM. W celu pasażowania komórek, po stwierdzeniu 80% konfluencji komórek, butelki hodowlane przepłukano buforem DPBS (ThermoFisher Scientific, USA), następnie dodano 5,0 mL roztworu akutazy (Sigma Aldrich, USA) w celu oderwania ich od powierzchni butelki. Po 4 – 5 minutach inkubacji komórek w temperaturze $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, za pomocą mikroskopu optycznego (Opta-Tech) sprawdzono czy komórki się odkleiły od powierzchni naczynia hodowlanego. Pipetą serologiczną przeniesiono zawiesinę komórek do probówki wirówkowej, a butelkę przepłukano buforem HEPES (5,0 mL). Zawiesinę komórek odwirowano (5 min, $220 \times g$; wirówka Sorvall ST 8R, ThermoFisher Scientific, USA). Pobrano roztwór z nad osadu komórek i dodano 5,0 mL pożywki, po czym dokładnie zmieszano w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny. Liczba komórek została obliczona przy użyciu komory Neubauera, a roztwór rozcieńczono do odpowiedniej objętości i wysiano komórki do kolejnych butelek hodowlanych (75 cm^2).

10. Materiał biologiczny

Materiał biologiczny uzyskano od zdrowych dawców z Wojewódzkiego Specjalistycznego Szpitala im. dr W. Biegańskiego w Łodzi. Krew pobierano do próbek próżniowych zawierających cytrynian sodu w stosunku 1:9. Badania wykonywane z użyciem materiału biologicznego w ramach niniejszego doktoratu uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (RNN/278/19/KE) (załącznik 2).

10.1. Przygotowanie osocza

Oddzielenie erytrocytów (RBC, red blood cells) od osocza przeprowadzono przez odwirowanie (3000 x g, 10 min, 20°C) w wirówce Micro 22 R (Hettich Zentrifugen, Niemcy). Osocze zamrażano i przechowywano w temperaturze -30 °C maksymalnie do dwóch miesięcy. Przed eksperymentami osocze rozmrażano w temperaturze 37 °C przez 15 min i stosowano do oznaczenia aktywności BuChE.

10.2. Przygotowanie zawiesiny erytrocytów

Krew w próbkach próżniowych zawierających cytrynian sodu odwirowano (3000 x g, 10 min, 20 °C) w wirówce Micro 22 R (Hettich Zentrifugen, Niemcy). Zebrano osocze z nad erytrocytów i przystąpiono do procesu ich mycia. Do próbek dodano 0,9% roztwór NaCl w objętości dwukrotnie większej niż objętość erytrocytów i wirowano zachowując te same warunki wirowania. Proces mycia wykonano trzykrotnie. Z tak przygotowanych erytrocytów sporządzono 2% zawiesinę w NaCl (0,9%), którą wykorzystano do badań oceny morfologii oraz erytrotoksyczności bezpośrednio po jej przygotowaniu. Pozostałą masę erytrocytarną zamrażano w próbkach typu Eppendorf o pojemności 2 mL i przechowywano w temperaturze -30 °C maksymalnie do dwóch miesięcy. Bezpośrednio przed eksperymentami masę erytrocytarną rozmrażano w temp. 37 °C przez 15 min i stosowano do oznaczenia aktywności AChE.

10.3. Przygotowanie komórek na płytkach 96-dółkowych

Po uzyskaniu 80% konfluencji komórki pasażowano i wysiano na płytki 96-dółkowe. W tym celu butelki hodowlane przepłukano buforem HEPES (Lonza,

Szwajcaria) i dodano akutazę (Sigma Aldrich, USA) w objętości 5 mL. Po około 4 – 5 minutowej inkubacji komórek w temperaturze 37 °C sprawdzono przy użyciu mikroskopu optycznego (OptaTech) czy komórki odkleiły się od powierzchni butelki i dodano 5 mL roztworu HEPES (Lonza, Szwajcaria) w celu neutralizacji akutazy (Sigma Aldrich, USA). Roztwór przeniesiono do probówki wirówkowej i odwirowano (5 min, 22 x g; wirówka Sorvall ST 8R, ThermoFisher Scientific, USA). Roztwór z osadu komórek został usunięty i dodano kilka mililitrów pożywki. Po policzeniu liczby komórek przy użyciu komory Neubauera, zawiesinę komórek rozcieńczono do właściwej objętości i wysiano komórki na 96-dołkowe płytki. Liczba komórek HUVEC w dołku wynosiła 7500, natomiast astrocytów 5000.

11. Metody

11.1. Ocena stopnia hamowania aktywności AChE i BuChE przez badane związki oraz wyznaczenie wartości IC₅₀

11.1.1. Przygotowanie odczynników

0,9% NaCl (0,15 mol/L)

Masa cząsteczkowa = 58,44 g/mol

Na wadze Radwag typ AS 2220/C/2 (Radwag, Polska) odważono 9,0 g NaCl (Chempur, Polska) i rozpuszczono w 991,0 mL wody destylowanej.

0,2 mol/L NaH₂PO₄

Masa cząsteczkowa = 119,98 g/mol

Na wadze Radwag typ AS 2220/C/2 (Radwag, Polska) odważono 24,0 g NaH₂PO₄ (Chempur, Polska), przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 1000,0 mL i rozpuszczono w wodzie destylowanej. Uzyskany roztwór w kolbie miarowej uzupełniono wodą destylowaną do kreski i dokładnie wymieszano.

0,2 mol/L Na₂HPO₄

Masa cząsteczkowa = 141,96 g/mol

Na wadze Radwag typ AS 2220/C/2 (Radwag, Polska) odważono 28,32 g Na₂HPO₄ (Chempur, Polska), przeniesiono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 1000,0 mL

i rozpuszczono w wodzie destylowanej. Uzyskany roztwór w kolbie miarowej uzupełniono wodą destylowaną do kreski i dokładnie wymieszano.

Bufor fosforanowy pH = 8,0 (0,1 mol/L)

Do kolby miarowej o pojemności 1000,0 mL odmierzone:

- 53,0 mL roztworu 0,2 mol/L NaH_2PO_4
- 943,0 mL roztworu 0,2 mol/L Na_2HPO_4

i uzupełniono wodą destylowaną do kreski. Uzyskany roztwór dokładnie wymieszano i doprowadzono do pH = 8 przy pomocy pehametru (Scott z elektrodą szklaną Blue-line pH = 14,0; Scott) stosując roztwór NaOH (40,0 g/L) lub/oraz H_3PO_4 (86%).

Bufor fosforanowy pH = 7,0 (0,1 mol/L)

Do kolby miarowej o pojemności 500,0 mL odmierzone:

- 195,0 mL roztworu 0,2 mol/L NaH_2PO_4
- 305,0 mL roztworu 0,2 mol/L Na_2HPO_4

i uzupełniono wodą destylowaną do kreski. Uzyskany roztwór dokładnie wymieszano i doprowadzono do pH = 7 przy pomocy pehametru (Scott z elektrodą szklaną Blue-line pH = 14,0; Scott) stosując roztwór NaOH (40,0 g/L) lub/oraz H_3PO_4 (86%).

0,01 mol/L kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy) (DTNB)

Masa cząsteczkowa = 396,35 g/mol

396,0 mg DTNB (Sigma Aldrich, USA) rozpuszczono w 100,0 mL buforu fosforanowego o pH = 7,0. Uzyskany roztwór podzielono na mniejsze porcje (500 μL) i przechowywano w temperaturze – 20 °C.

21,67 mg/mL roztwór jodku acetylotiocholiny – roztwór podstawowy

Masa cząsteczkowa = 289,18 g/mol

Odważono 541,7 mg jodku acetylotiocholiny (Sigma Aldrich, USA) i rozpuszczono w 25,0 mL wody destylowanej. Uzyskany roztwór podzielono na mniejsze porcje (500 μL) i przechowywano w temperaturze – 20 °C.

23,77 mg/mL roztwór jodku butyrylotiocholiny – roztwór podstawowy

Masa cząsteczkowa = 317,23 g/mol

Odważono 594,2 mg jodku butyrylotiocholiny (Sigma Aldrich, USA) i rozpuszczono w 25,0 mL wody destylowanej. Uzyskany roztwór podzielono na mniejsze porcje (500 μ L) i przechowywano w temperaturze – 20 °C.

11.1.2. Przygotowanie roztworów badanych związków

Haloperidol

Stężenie w próbce = 100 μ g/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM, OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 μ L metanolu. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy rozcieńczono 200 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 10 μ L tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 100 μ g/L (objętość próby wynosi 500 μ L). Przygotowano również rozcieńczenia związku o stężeniach: 0,1 μ g/L, 1 μ g/L, 10 μ g/L, 25 μ g/L i 50 μ g/L w próbce.

Bromperidol

Stężenie w próbce = 200 μ g/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM, OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 μ L metanolu. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy rozcieńczono 100 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 10 μ L tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 200 μ g/L (objętość próby wynosi 500 μ L). Przygotowano również rozcieńczenia związku o stężeniach: 0,1 μ g/L, 1 μ g/L, 5 μ g/L, 10 μ g/L, 25 μ g/L, 50 μ g/L, 75 μ g/L i 100 μ g/L w próbce.

Benperidol

Stężenie w próbce = 100 μ g/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM, OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 μ L etanolu. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy rozcieńczono 200 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 10 μ L tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie

stężenia 100 µg/L (objętość próby wynosi 500 µL). Przygotowano również rozcieńczenia związku o stężeniach: 1 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L, 25 µg/L, 50 µg/L i 75 µg/L w próbce.

Penfluridol

Stężenie w próbce = 50 µg/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM, OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL etanolu. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy rozcieńczono 400 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 10 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 50 µg/L (objętość próby wynosi 500 µL). Przygotowano również rozcieńczenia związku o stężeniach: 0,01 µg/L, 0,1 µg/L, 1 µg/L, 10 µg/L i 25 µg/L w próbce.

Pimozyd

Stężenie w próbce = 100 µg/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM, OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL wody destylowanej. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy należy rozcieńczyć 200 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 10 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 100 µg/L (objętość próby wynosi 500 µL). Przygotowano również rozcieńczenia związku o stężeniach: 0,1 µg/L, 1 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L, 25 µg/L, 50 µg/L i 75 µg/L w próbce.

Kwetiapiny fumaran

Stężenie w próbce = 100 µmol/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM, OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) odważono 2,2 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL wody destylowanej. Uzyskano w ten sposób roztwór podstawowy. Dodanie 10 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 100 µmol/L (objętość próby wynosi 500 µL). Przygotowano również rozcieńczenia związku o stężeniach: 0,01 µmol/L, 0,1 µmol/L, 1 µmol/L, 10 µmol/L, 25 µmol/L i 50 µmol/L w próbce.

Promazyny chlorowodorek

Stężenie w próbce = 200 µg/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM, OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL wody destylowanej. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy należy rozcieńczyć 100 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 10 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 200 µg/L (objętość próby wynosi 500 µL). Przygotowano również rozcieńczenia związku o stężeniach: 2,5 µg/L, 5 µg/L, 7,5 µg/L, 10 µg/L, 50 µg/L, 100 µg/L i 150 µg/L w próbce.

Donepezilu chlorowodorek

Masa cząsteczkowa = 415,9 g/mol

1. Stężenie w próbce = 100 nmol/L (dla oznaczeń wykonywanych dla AChE)

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM, OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL wody destylowanej. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy należy rozcieńczyć 500 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 10 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 100 nmol/L (objętość próby wynosi 500 µL). Przygotowano również rozcieńczenia związku o stężeniach: 1 nmol/L, 5 nmol/L, 10 nmol/L, 20 nmol/L, 25 nmol/L, 50 nmol/L i 75 nmol/L w próbce.

2. Stężenie w próbce = 100 µmol/L (dla oznaczeń wykonywanych dla BuChE)

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM, OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) odważono 2 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL wody destylowanej. Uzyskano w ten sposób roztwór podstawowy. Dodanie 10 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 100 µmol/L (objętość próby wynosi 500 µL). Przygotowano również rozcieńczenia związku o stężeniach: 2 µmol/L, 5 µmol/L, 10 µmol/L, 20 µmol/L i 50 µmol/L w próbce.

Rywastygminy winian

1. Stężenie w próbce = 100 $\mu\text{mol/L}$ (dla oznaczeń wykonywanych dla AChE)

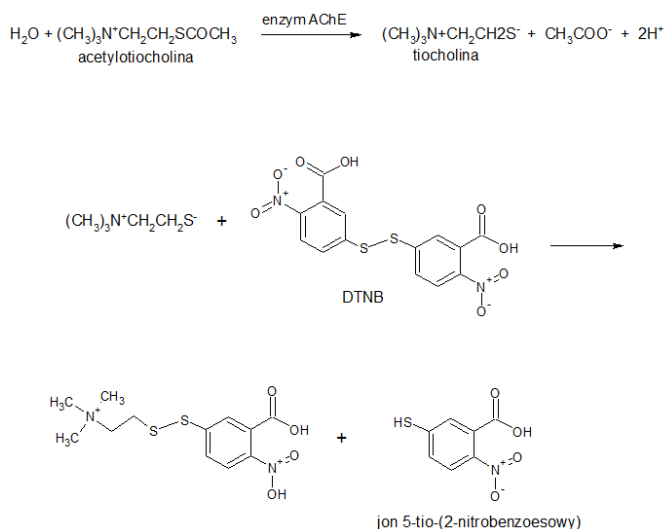
Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM, OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) odważono 2 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 μL wody destylowanej. Uzyskano w ten sposób roztwór podstawowy. Dodanie 10 μL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 100 $\mu\text{mol/L}$ (objętość próby wynosi 500 μL). Przygotowano również rozcieńczenia związku o stężeniach: 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 15 $\mu\text{mol/L}$, 25 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$ i 75 $\mu\text{mol/L}$ w próbce.

2. Stężenie w próbce = 5 $\mu\text{mol/L}$ (dla oznaczeń wykonywanych dla BuChE)

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM, OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) odważono 2 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 μL wody destylowanej. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy należy rozcieńczyć 20 razy, aby otrzymać roztwór podstawowy. Dodanie 10 μL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 5 $\mu\text{mol/L}$ (objętość próby wynosi 500 μL). Przygotowano również rozcieńczenia związku o stężeniach: 0,05 $\mu\text{mol/L}$, 0,1 $\mu\text{mol/L}$, 0,25 $\mu\text{mol/L}$, 0,5 $\mu\text{mol/L}$, 0,75 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$, i 2,5 $\mu\text{mol/L}$ w próbce.

11.1.3. Zmodyfikowana metoda Ellmana

Aktywność AChE oraz BuChE została oceniona spektrofotometrycznie z zastosowaniem zmodyfikowanej metody Ellman'a [215,216]. Jest to metoda kolorymetryczna pozwalająca na oznaczenie aktywności esteraz, opierająca się na pochłanianiu przez produkt reakcji, jakim jest jon 5-tio-(2-nitrobenzoesowy) $[\text{TNB}^-]$, promieniowania świetlnego o odpowiedniej długości fali. Jon $[\text{TNB}^-]$ powstaje na drodze reakcji odczynnika Ellmana ((kwasu 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowego), DTNB)) z tiocholimą, która jest produktem hydrolizy acetylotiocholiny (ATC) lub butyrylotiocholiny (BTC) pod wpływem odpowiednich dla nich enzymów: AChE lub BuChE (Rysunek 8). Metoda ta wykorzystuje również zależność między stężeniem jonu $[\text{TNB}^-]$, a intensywnością żółtej barwy, którą mierzy się przy użyciu spektrofotometru UV-Vis.



Rysunek 8. Szlak zachodzących reakcji w metodzie Ellmana. Opracowanie własne na podstawie [215,216], z wykorzystaniem programu ChemSketch.

Oryginalna metoda Ellmana wymagała wprowadzenia modyfikacji ze względu na pokrywanie się maksimum absorpcji dla wskaźnika [TNB] użytego w reakcji z absorbancją hemoglobiny zawartej w erytrocytach. Z tego względu zmieniono długość fali stosowaną pierwotnie w pomiarach ($\lambda = 412 \text{ nm}$) na $\lambda = 436 \text{ nm}$. Dzięki temu absorpcja wskaźnika pozostała na poziomie 80% przy jednoczesnym obniżeniu do 25% pasma absorpcji grup hemoglobiny [215,216]. Dzięki temu, możliwe było zwiększenie czułości metody poprzez zmniejszenie rozcieńczenia prób badanych. Dla AChE wynosiło ono 1:400 zamiast 1:600. Dodatkowo, ze względu na zależność aktywności enzymatycznej od temperatury, w celu zwiększenia precyzji wykonywanych pomiarów testy prowadzone były w kuwetach (Medlab Products) termostatowanych w temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Kolejne modyfikacje i usprawnienia przystosowujące metodę do badań *in vitro* dokonane były na podstawie licznych doświadczeń przeprowadzonych w Zakładzie Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji. Doświadczenia dla AChE nie były wykonywane z użyciem krwi lecz na wcześniej mytych i zamrożonych erytrocytach, natomiast dla BuChE przeprowadzane były w osoczu, dzięki czemu nie było konieczności stosowania inhibitora osoczowej AChE/BuChE. Tuż przed pomiarem, w celu zniwelowania wpływu spontanicznej reakcji DTNB z grupami sulfhydrylowymi białek zawartych w próbce, badany materiał inkubowano

z DTNB przez 10 minut (cieplarka Falk), a następnie wykonywano kalibrację przy przyjętej długości fali.

11.1.4. Wykonanie pomiarów

Badania przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru Cecil CE 2021 (CECIL Instruments Limited, UK) wyposażonego w termostatowany obieg wody (37 °C) oraz system mieszania. Pomiarów wykonywano w kuwetach Semi micro (Medlab Products, Polska). 200-krotnie rozcieńczone buforem fosforanowym (pH = 8,0) osocze (dla pomiarów aktywności BuChE) lub 400-krotnie rozcieńczona zawiesina erytrocytów (dla pomiarów aktywności AChE) były inkubowane w 37 °C przez 15 minut z 5 µL DTNB o stężeniu 0,01 mol/L oraz z 10 µL badanego związku. Związki testowano w szerszym zakresie stężeń niż zakres terapeutyczny w celu oceny całkowitego wpływu związku na ludzkie esterazy (AChE oraz BuChE). Przygotowano kontrolę bez leków przeciwpsychotycznych, zawierającą jedynie DTNB i odpowiedni rozcieńczony materiał biologiczny (osocze lub roztwór zhemolizowanych erytrocytów). Wykonano również pomiary dla związków wzorcowych – donepezylu i rywastygminy. Reakcję indukowano dodaniem substratu (ATC lub BTC; 0,75 µmol/mL) w objętości 5 µL. Końcowa objętość próby wynosiła 500 µL (Tabela 12,13).

Tabela 12. Skład próby kontrolnej w ocenie hamowania aktywności AChE lub BuChE.

Skład próby	Objętość
Materiał biologiczny	490 µL
DTNB	5 µL
ATC lub BTC	5 µL
Całkowita objętość próby	500 µL

Tabela 13. Skład próby badanej w ocenie hamowania aktywności AChE i BuChE.

Skład próby	Objętość
Materiał biologiczny	480 µL
Badany związek	10 µL
DTNB	5 µL
ATC lub BTC	5 µL
Całkowita objętość próby	500 µL

Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 436$ nm przez 3 minuty w sposób ciągły, stosując zintegrowany ze spektrofotometrem program komputerowy Data Stream CE 3000 5.0 (Cecil Instruments Ltd., UK).

11.1.5. Obliczanie % inhibicji aktywności enzymatycznej

Pojedyncze doświadczenia wykonane zostały w 2 - 3 powtórzeniach. Na podstawie otrzymanych wyników obliczono szybkość reakcji enzymatycznej. Przeprowadzono analizę różnic absorbancji w zależności od czasu i wyznaczono szybkość maksymalną każdej pojedynczej reakcji. Porównując szybkość maksymalną próby kontrolnej oraz próby z badanymi związkami wyznaczono % inhibicji aktywności enzymu, który został obliczony wg poniższego równania:

$$\% \text{ inhibicji} = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\bar{x}} * 100\%$$

gdzie:

\bar{x} – średnia arytmetyczna z 2-3 pomiarów absorbancji w próbie kontrolnej

\bar{y} - średnia arytmetyczna z 2-3 pomiarów absorbancji w próbie z badanym związkiem

Dla każdego związku wykonano co najmniej od 3 do 5 niezależnych eksperymentów (n = 3-5).

11.1.6. Walidacja metody badawczej

Przeprowadzone zostały próby kontrolne dla AChE i BuChE w celu walidacji metody badawczej. Otrzymane wyniki (Tabela 14) pozwoliły na obliczenie współczynnika zmienności (W), który odpowiednio wyniósł: $W_{\text{AChE}} = 1,91$ %; $W_{\text{BuChE}} = 1,96$ %.

Wartość W dla prób biologicznych nie powinna przekraczać 10 %.

Tabela 14. Wartości pomiarów hamowania AChE i BuChE wykonanych dla kontroli w celu walidacji metody. Wyniki przedstawiono dla czterech prób AChE oraz BuChE, przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach; odchylenie standardowe (SD), współczynniki zmienności (W) [%].

AChE	Pomiar 1 [A/min]	Pomiar 2 [A/min]	Pomiar 3 [A/min]	Średnie wartości (n=3)	
				Średnia [A/min]	W [%]
1	0,250	0,233	0,261	0,248 ± 0,011	1,91
2	0,246	0,235	0,257		
3	0,250	0,249	0,254		
4	0,253	0,230	0,258		
Średnia	0,250	0,237	0,258		
SD	0,003	0,008	0,003		
W [%]	1,20	3,37	1,16		
BuChE	Pomiar 1 [A/min]	Pomiar 2 [A/min]	Pomiar 3 [A/min]	Średnie wartości (n=3)	
				Średnia [A/min]	W [%]
1	0,222	0,254	0,246	0,241 ± 0,013	1,96
2	0,221	0,252	0,239		
3	0,234	0,246	0,249		
4	0,226	0,253	0,244		
Średnia	0,226	0,251	0,245		
SD	0,006	0,004	0,004		
W [%]	2,65	1,59	1,63		

11.1.7. Obliczanie wartości IC₅₀

Obliczenia wartości IC₅₀ wykonane zostały tylko dla rywastygminy, donepezylu, promazyny i kwetiapiny, ponieważ dla pozostałych związków w badanym zakresie stężeń hamowanie ChEs nie przekraczało 32%.

Wartość IC₅₀, zdefiniowaną jako stężenie związku powodujące zmniejszenie aktywności enzymu o 50%, wyznaczana była na podstawie równań prostych, otrzymanych po optymalnym dopasowaniu do punktów pomiarowych linii trendu, czyli graficznej reprezentacji trendu dla serii danych.

Wartość IC₅₀ obliczono na podstawie równania $y = a \times \ln(x) + b$, regresji liniowej ($y = a \times x + b$) lub równania kwadratowego ($y = a \times x^2 + b \times x + c$).

11.2. Wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej

W celu wyznaczenia parametrów kinetycznych przeprowadzone zostały doświadczenia z użyciem malejących 2-, 3-, 5-, 10-, 20-krotnie stężeń substratu ATC lub BTC (0,75 μmol/mL), które wynosiły odpowiednio: 0,375 μmol/mL, 0,25 μmol/mL,

0,15 $\mu\text{mol/mL}$, 0,075 $\mu\text{mol/mL}$ i 0,0375 $\mu\text{mol/mL}$. Parametry kinetyczne donepezylu, rywastygminy, kwetiapiny i promazyny oszacowano na podstawie trzech indywidualnych eksperymentów przeprowadzonych na trzech różnych materiałach biologicznych. Stężenia związków odpowiadały ich wartościom IC_{50} oraz dodatkowo dla kwetiapiny i promazyny w stężeniach równych $\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$. Absorbancję rejestrowano przy długości fali $\lambda = 436 \text{ nm}$ stosując spektrofotometr CECIL 2021 (Cecil Instruments Ltd., UK) z termostatowanym przepływem wody (temperatura 37 °C).

Parametry kinetyczne wyznaczono na podstawie równania Hanesa-Woolfa, które jest graficzną prezentacją kinetyki enzymatycznej, w której stosunek początkowego stężenia substratu $[\text{S}]$ do szybkości reakcji enzymatycznej v jest wykreślany względem $[\text{S}]$. Równanie to opiera się na przekształceniu równania Michaelisa-Menten do postaci liniowej oraz użyciu regresji liniowej do wyznaczenia parametrów kinetycznych reakcji i przyjmuje następującą formę:

$$\frac{[\text{S}]}{v} = \frac{[\text{S}]}{V_{\text{max}}} + \frac{K_m}{V_{\text{max}}}$$

gdzie:

$[\text{S}]$ – początkowe stężenie substratu

v – szybkość reakcji

V_{max} – połowa szybkości maksymalnej reakcji

K_m – stała Michaelisa-Menten

11.3. Wyznaczenie synergizmu działania leków

Potencjalny efekt synergiczny między lekami przeciwpsychotycznymi a donepezilem/rywastygminą hamujący ChE przeprowadzono za pomocą zmodyfikowanej metody Ellmana [215,216]. Próbki ($v = 470 \mu\text{L}$) 400-krotnie rozcieńczonego roztworu zhemolizowanych erytrocytów (hamowanie AChE) lub 200-krotnie rozcieńczonego osocza (hamowanie BuChE) wstępnie inkubowano z 5 μL DTNB (0,01 mol/L), donepezilem lub rywastygminą ($v = 10 \mu\text{L}$) oraz wybranym lekiem przeciwpsychotycznym ($v = 10 \mu\text{L}$) przez 15 min. Następnie dodano substrat (odpowiednio BTC lub ATC, w końcowym stężeniu 0,75 $\mu\text{mol/mL}$) otrzymując skład prób podany w Tabelach 16 i 17. Stężenie donepezylu wynosiło od 0,01 do 100 nmol/L dla inhibicji AChE oraz 0,2 do 100 $\mu\text{mol/L}$ dla pomiarów BuChE. Stężenie rywastygminy było w zakresie 5 - 100 $\mu\text{mol/L}$ dla hamowania AChE i 0,05 - 5 $\mu\text{mol/L}$

dla pomiarów BuChE. Z kolei stężenia leków przeciwpsychotycznych były stałe w każdym pomiarze i odpowiadały maksymalnym ich stężeniom terapeutycznym w osoczu (therapeutic plasma concentration, TPC_{max}). Ocenę potencjalnych synergizmów dokonywano przy użyciu programu komputerowego CompuSyn (ComboSyn, USA; <http://www.combosyn.com/>).

Tabela 15. Stężenia badanych związków w ocenie synergistycznego działania leków.

Substancja	Stężenie w badaniu	
	AChE	BuChE
Haloperidol	25 µg/L	25 µg/L
Bromperidol	25 µg/L	25 µg/L
Benperidol	10 µg/L	10 µg/L
Penfluridol	25 µg/L	25 µg/L
Pimozyd	15 µg/L	15 µg/L
Kwetiapiny fumaran	400 µg/L	400 µg/L
Promazyny HCl	50 µg/L	50 µg/L
Donepezilu HCl	0,01 – 100 nmol/L	0,2 – 100 µmol/L
Rywastygminy winian	5 – 100 µmol/L	0,05 - 5 µmol/L

Tabela 16. Skład próby kontrolnej w ocenie synergistycznego działania leków.

Skład próby	Objętość
Materiał biologiczny	490 µL
DTNB	5 µL
ATC lub BTC	5 µL
Całkowita objętość próby	500 µL

Tabela 17. Skład próby badanej w ocenie synergistycznego działania leków.

Skład próby	Objętość
Materiał biologiczny	470 μL
Donepezil lub rywastygmina	10 μL
Badany związek	10 μL
DTNB	5 μL
ATC lub BTC	5 μL
Całkowita objętość próby	500 μL

11.3.1. Ocena interakcji mieszaniny binarnej z użyciem programu ComboSyn

Zasada efektu mediany opisana przez Chou et al. [217] pozwala na zbadanie wpływu leków na ChEs. Metoda obejmuje wykreślenie krzywych skutecznej dawki dla każdego leku i ich binarnych mieszanin w różnych dawkach. Automatyczna symulacja synergizmu i antagonizmu przy wszystkich dawkach lub poziomach efektu jest możliwa dzięki oprogramowaniu komputerowemu opartemu na odpowiednich algorytmach. Obliczenie wskaźnika kombinacji (CI) i analizy izobologramu pozwalają na ilościowe określenie interakcji leków, gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazuje odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm. Do wykonania wszystkich obliczeń wykorzystano oprogramowanie CompuSyn (ComboSyn, USA; <http://www.combosyn.com/>). Oprogramowanie umożliwia również wyświetlanie krzywej dawka–skutek, wykresu mediany–efektu oraz wykresu wskaźnika redukcji dawki (DRI) [217].

11.4. Agregacja β -amyloidu

11.4.1. Przygotowanie odczynników

Rekombinowany ludzki $A\beta$ 1-42, ultra czysty (Sigma Aldrich, USA, nr kat. AG968-1MG)

Masa cząsteczkowa = 4514,2 Da

1 mg peptydu rozpuszczono w 1 mL 1% NH_4OH . Roztwór poddano działaniu ultradźwięków przez 30-60 sekund w celu dokładnego rozpuszczenia $A\beta$. Roztwór wirowano przy 10000 obr./min przez 5 min w 4 °C w celu odseparowania

jakiegokolwiek wytrąconego materiału. Roztwór o stężeniu 220 $\mu\text{mol/L}$ przechowywano w małych porcjach w temperaturze $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ i przed każdym eksperymentem ogrzewano do $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 15 minut. Dodanie 9,1 μL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 20 $\mu\text{mol/L}$ (v próby wynosi 100 μL).

Tioflawina T (Thioflavin T, ThT), (Sigma-Aldrich, nr kat. 596200-500MG)

Masa cząsteczkowa = 318,86 g/mol

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM, OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) odważono 9,56 mg tioflawiny T i rozpuszczono w 1 mL buforu fosforanowego pH = 7,4. Otrzymany w ten sposób roztwór podstawowy rozcieńczono 1000 razy (10 μL roztworu podstawowego + 10000 μL buforu fosforanowego pH = 7,4), aby dodając 20 μL ThT do próby badanej uzyskać stężenie końcowe 5 $\mu\text{mol/L}$ (objętość próby wynosi 120 μL).

Kwas taninowy (TA), (Sigma-Aldrich, nr kat. 403040)

Masa cząsteczkowa = 1701,2 g/mol

Stężenie w próbce = 100 $\mu\text{mol/L}$

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM, OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) 1,7 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 μL buforu fosforanowego pH = 7,4 aby otrzymać roztwór podstawowy. Dodanie 10 μL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 100 $\mu\text{g/L}$ (objętość próby wynosi 100 μL).

Przygotowano również rozcieńczenie związku o stężeniu 10 $\mu\text{g/L}$ w próbce.

Bufor fosforanowy pH = 7,4 (0,1 mol/L)

Do kolby miarowej o pojemności 1000,0 mL odmierzono:

- 190,0 mL roztworu 0,2 mol/L NaH_2PO_4
- 810,0 mL roztworu 0,2 mol/L Na_2HPO_4

i uzupełniono wodą destylowaną do kreski. Uzyskany roztwór dokładnie wymieszano i doprowadzono do pH = 7,4 przy pomocy pehametru (Scott z elektrodą szklaną Blue-line pH = 14,0; Scott) stosując roztwór NaOH (40,0 g/L) lub/oraz H_3PO_4 (86%).

11.4.2. Przygotowanie roztworów badanych związków

Haloperidol

Stężenie w próbce = 25 µg/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM, OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL metanolu. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy rozcieńczono 4000 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 10 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 25 µg/L (objętość próby wynosi 100 µL). Przygotowano również rozcieńczenie związku o stężeniu 12,5 µg/L w próbce.

Bromperidol

Stężenie w próbce = 25 µg/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL metanolu. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy rozcieńczono 4000 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 10 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 25 µg/L (objętość próby wynosi 100 µL). Przygotowano również rozcieńczenie związku o stężeniu 12,5 µg/L w próbce.

Benperidol

Stężenie w próbce = 10 µg/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL etanolu. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy rozcieńczono 10000 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 10 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 10 µg/L (objętość próby wynosi 100 µL). Przygotowano również rozcieńczenie związku o stężeniu 5 µg/L w próbce.

Penfluridol

Stężenie w próbce = 25 µg/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL etanolu. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy rozcieńczono 4000 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 10 µL

tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 25 µg/L (objętość próby wynosi 100 µL). Przygotowano również rozcieńczenie związku o stężeniu 12,5 µg/L w próbce.

Pimozyd

Stężenie w próbce = 15 µg/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL wody destylowanej. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy należy rozcieńczyć 6666,67 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 10 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 15 µg/L (objętość próby wynosi 100 µL). Przygotowano również rozcieńczenie związku o stężeniu 7,5 µg/L w próbce.

Kwetiapiny fumaran

Stężenie w próbce = 400 µg/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM) odważono 2,2 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL wody destylowanej. Uzyskano w ten sposób roztwór podstawowy, który należy rozcieńczyć 250 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 10 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 400 µg/L (objętość próby wynosi 100 µL). Przygotowano również rozcieńczenie związku o stężeniu 200 µg/L w próbce.

Promazyny chlorowodorek

Stężenie w próbce = 50 µg/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL wody destylowanej. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy należy rozcieńczyć 1800 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 10 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 50 µg/L (objętość próby wynosi 100 µL). Przygotowano również rozcieńczenie związku o stężeniu 25 µg/L w próbce.

11.4.3. Wykonanie pomiarów

Wpływ leków przeciwpsychotycznych na agregację $A\beta$ zbadano przy użyciu właściwości fluorescencyjnych barwnika ThT. Próby badane zawierające roztwór $A\beta$ 42 o końcowym stężeniu 20 $\mu\text{mol/L}$ inkubowano z lekami przeciwpsychotycznymi w stężeniach równych ich maksymalnym terapeutycznym stężeniom w osoczu (Therapeutic Plasma Concentration, TPC_{max}) i połowie terapeutycznych stężeń w osoczu ($1/2 \text{TPC}_{\text{max}}$) ($v = 10 \mu\text{L}$). Ostateczna objętość prób badanych wynosiła 120 μL . Kontrolę stanowił roztwór $A\beta$ 42. Jako wzorcowy inhibitor agregacji $A\beta$ 42 zastosowano kwas taninowy w dwóch stężeniach: 0,1 $\mu\text{mol/L}$ i 10 $\mu\text{mol/L}$. Reakcję fibrylacji indukowano przez dodanie 20 μL ThT, którego stężenie końcowe w próbce wynosiło 5 $\mu\text{mol/L}$. Intensywność fluorescencji mierzono w temperaturze pokojowej przy $\text{Ex/Em} = 440/484 \text{ nm}$ (Synergy H1; BioTek, Winooski, VT, USA). Pomiar intensywności fluorescencji wyrażonej jako jednostki względnej fluorescencji (RFU) wykonywano po 10, 30, 60, 90 min od dodania ThT, a następnie po 24, 48 godzinach. Za 100 % agregacji $A\beta$ przyjęto intensywność fluorescencji zmierzoną dla próby kontrolnej, która została następnie wykorzystana do wyznaczenia stopnia inhibicji agregacji $A\beta$ pod wpływem badanych leków przeciwpsychotycznych.

Tabela 18. Stężenia leków przeciwpsychotycznych badanych w ocenie wpływu na agregację $A\beta$.

związek	$1/2 \text{TPC}_{\text{max}}$	TPC_{max}
Haloperidol	12,5 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$
Bromperidol	12,5 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$
Benperidol	5 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$
Penfluridol	12,5 $\mu\text{g/L}$	25 $\mu\text{g/L}$
Pimozyd	7,5 $\mu\text{g/L}$	15 $\mu\text{g/L}$
Kwetiapiny fumaran	200 $\mu\text{g/L}$	400 $\mu\text{g/L}$
Promazyny HCl	25 $\mu\text{g/L}$	50 $\mu\text{g/L}$

Tabela 19. Skład próby kontrolnej w ocenie wpływu leków przeciwpsychotycznych na agregację A β .

Skład próby	Objętość
Bufor fosforanowy pH = 7,4	90,9 μ L
β -amyloid	9,1 μ L
Całkowita objętość próby	100 μL

Tabela 20. Skład próby badanej w ocenie wpływu leków przeciwpsychotycznych na agregację A β .

Skład próby	Objętość
Bufor fosforanowy pH = 7,4	80,9 μ L
β -amyloid	9,1 μ L
Badany związek	10 μ L
Całkowita objętość próby	100 μL

Przegląd literatury opisującej różne metody i warunki badań prowadzonych z użyciem A β (Tabela 21), był podstawą do optymalizacji warunków, w których przeprowadzono badanie agregacji A β w obecności leków przeciwpsychotycznych.

Tabela 21. Przegląd literatury dotyczący warunków, w których przeprowadzane były badania agregacji A β [218-225].

Lp	A β 42 końcowe stężenie	Kontrola pozytywna (związek)	Stężenie badanych związków	Bufor/warunki inkubacji	ThT końcowe stężenie	Bufor ThT	Czas inkubacji z ThT	Odstępy czasu pomiędzy pomiarami	długości fal wzbudzenia/emisji	Poz. lit.
1	5 μ mol/L	kurkumina	5, 10, 20 μ mol/L	150 mmol/L NaCl i 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8,0), 37 °C, 48 h	10 μ mol/L	bd	5 min, temp. pokojowa	bd	420/485 nm	218
2	25 μ mol/L 5 μ mol/L	bd	80, 160 μ g/mL	37 °C	1 mmol/L	Roztwór ThT przygotowany w buforze glicyna-NaOH, pH 8,5	10 s z mieszaniem	0, 24, 48, 72, 96 h	450/480 nm	219
3	50 μ mol/L	kurkumina	20 μ mol/L	A β 1-42 rozp. w heksafluoroizopropanolu (HFIP), kolejne rozcieńczenia w 50 mmol/L buforze fosforanowym (pH 7,4), 37 °C, 48 h	bd	50 mmol/L bufor glicyna-NaOH (pH 8,0)	Po inkubacji próby rozcieńczono do 200 μ L buforem glicyna-NaOH (50 mmol/L, pH 8,0) z ThT	300-sek. skan intensywności fluorescencji	450/485 nm	220

bd – brak danych

Lp	A β 42 końcowe stężenie	kontrola- użyty związek	Stężenie badanych związków	Bufor/warunki inkubacji	ThT końcowe stężenie	Bufor ThT	Czas inkubacji z ThT	Odstępy czasu pomiędzy pomiarami	długości fal wzbudzenia/ emisji	Poz. lit.
4	50 $\mu\text{mol/L}$	moryna (100 mmol/L)	100, 200, 600 $\mu\text{mol/L}$	Bufor testowy (składu nie podano)	0,2 mmol/L	Bufor testowy	bd	5–90 min	440/484 nm	221
5	30 $\mu\text{mol/L}$	A β /PBS/ 2% HFIP/ 10%DMSO	100 $\mu\text{mol/L}$	PBS, 10% DMSO, 37 °C	25 $\mu\text{mol/L}$	bufor fosforanowy (0,025 mol/L, pH 6,0)	25 °C, 2 h	8, 24 h	440/485 nm	222
6	25 $\mu\text{mol/L}$	Kwas tanicowy	0, 10, 50 $\mu\text{mol/L}$	Mieszanina reakcyjna (600 μL): 10 $\mu\text{g/ml}$ (2,3 $\mu\text{mol/L}$) A β (1-40) lub A β (1- 42), 50 mmol/L bufor fosforanowy (pH 7,5), 100 mmol/L NaCl. Inkubacja: 37 °C przez 3-6 h, bez mieszania	5 $\mu\text{mol/L}$	Bufor glicyna- NaOH (50 mmol/L, pH 8,5)	37 °C	0-24 h	445/490 nm	223

bd – brak danych

Lp	Aβ42 końcowe stężenie	kontrola- użyty związek	Stężenie badanych związków	Bufor/warunki inkubacji	ThT końcowe stężenie	Bufor ThT	Czas inkubacji z ThT	Odstępy czasu z pomiędzy pomiarami	długości fal wzbudzenia/e misji	Poz. lit.
7	5 μmol/L	bd	0,5-20 μmol/L	Aβ w HFIP rozcieńczano do stężenia 10- 20μmol/L w wodzie z dodatkiem NH ₃ (0,02%)	5 μmol/L	roztwór podstawowy Aβ rozcieńczony w 20 mmol/L HEPES i NaCl (100 mmol/L, pH 7,4) zawierający 3,3 μmol/L ThT	400 μL próby inkubowane w 40 °C	0-20 min	445/480 nm	224
8	20 μmol/L	kurkumina	10 μmol/L	Inkubacja w 37 °C przez 48 h	5 μmol/L	Bufor glicyna- NaOH (50 mmol/L, pH 8,0)	bd	bd	450/485 nm	225

bd – brak danych

11.4.4. Walidacja metody badawczej

Przeprowadzone zostały próby kontrolne pomiaru fluorescencji w celu walidacji metody badawczej. Otrzymane wyniki (Tabela 22) pozwoliły na obliczenie współczynnika zmienności (W), który wyniósł: $W = 4,55 \%$.

Tabela 22. Wyniki pomiarów intensywności fluorescencji wykonane dla czterech kontroli, w trzech powtórzeniach, wyrażone jako względne jednostki fluorescencji (RFU) wraz ze średnią, odchyleniem standardowym (SD) oraz współczynnikiem zmienności (W); $Ex/Em = 440/484 \text{ nm}$.

$A\beta$	Pomiar 1 (RFU)	Pomiar 2 (RFU)	Pomiar 3 (RFU)	Średnie wartości (n=3)	
				Średnia (RFU)	W [%]
1	4536	4426	4316	4500,8 ± 116,8	4,55
2	4700	4280	4575		
3	4809	4690	4397		
4	4285	4072	4324		
Średnia	4582,5	4367	4403		
SD	227,9	259,7	120,3		
W [%]	4,97	5,95	2,73		

11.5. Hemoliza erytrocytów w warunkach stresu oksydacyjnego

11.5.1. Przygotowanie odczynników

2,0% Triton X-100

W celu przygotowania roztworu 2% pobrano do probówki 40 μL Tritonu X-100 (Polskie Odczynniki Chemiczne) i uzupełniono roztworem 0,9% NaCl (0,15 mol/mL) do objętości 2 mL.

50 g/L heksacyjanożelazian (II) potasu ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)

Masa cząsteczkowa = 368,34 g/mol

Odważono 2,5 g $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Polskie Odczynniki Chemiczne, Polska) i rozpuszczono w 50 mL wody destylowanej.

50 mmol/L dichlorowodorek 2,2'-azobis(2-metylopropionamidyny (AAPH)

Masa cząsteczkowa = 271,19 g/mol

Odważono 203,25 mg AAPH (Sigma-Aldrich) i rozpuszczono w 1,5 mL wody destylowanej. Roztwór przygotowano *ex tempore* przed każdym badaniem.

10 µg/mL kwas askorbinowy (AA)

Masa cząsteczkowa = 176,12 g/mol

Odważono 3 mg AA (Sigma-Aldrich, USA) i rozpuszczono w 2,0 mL 0,9% NaCl (0,15 mol/mL). Otrzymany roztwór podstawowy o stężeniu 150 µg/mL rozcieńczono 15-krotnie w celu uzyskania roztworu roboczego AA o stężeniu 10 µg/mL. Roztwór przygotowywano *ex tempore* przed każdym badaniem.

11.5.2. Przygotowanie roztworów badanych związków

Haloperidol

Stężenie w próbce = 125 µg/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM, OHAUS Europe GmbH, Szwajcaria) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL metanolu. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy rozcieńczono 400 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 100 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 125 µg/L (objętość próby wynosi 2000 µL). Przygotowano również rozcieńczenie związku o stężeniu 5 µg/L i 25 µg/L w próbce.

Bromperidol

Stężenie w próbce = 125 µg/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL metanolu. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy rozcieńczono 400 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 100 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 125 µg/L (objętość próby wynosi 2000 µL). Przygotowano również rozcieńczenie związku o stężeniu 5 µg/L i 25 µg/L w próbce.

Benperidol

Stężenie w próbce = 50 µg/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL etanolu. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy rozcieńczono 1000 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 100 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 50 µg/L (objętość próby

wynosi 2000 μL). Przygotowano również rozcieńczenie związku o stężeniu 2 $\mu\text{g/L}$ i 10 $\mu\text{g/L}$ w próbce.

Penfluridol

Stężenie w próbce = 125 $\mu\text{g/L}$

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 μL etanolu. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy rozcieńczono 400 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 100 μL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 125 $\mu\text{g/L}$ (objętość próby wynosi 2000 μL). Przygotowano również rozcieńczenie związku o stężeniu 5 $\mu\text{g/L}$ i 25 $\mu\text{g/L}$ w próbce.

Pimozyd

Stężenie w próbce = 75 $\mu\text{g/L}$

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 μL wody destylowanej. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy należy rozcieńczyć 666,67 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 100 μL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 75 $\mu\text{g/L}$ (objętość próby wynosi 2000 μL). Przygotowano również rozcieńczenie związku o stężeniu 3 $\mu\text{g/L}$ i 15 $\mu\text{g/L}$ w próbce.

Kwetiapiny fumaran

Stężenie w próbce = 2000 $\mu\text{g/L}$

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM) odważono 2,2 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 μL wody destylowanej. Uzyskano w ten sposób roztwór podstawowy, który należy rozcieńczyć 25 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 100 μL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 2000 $\mu\text{g/L}$ (objętość próby wynosi 2000 μL). Przygotowano również rozcieńczenie związku o stężeniu 80 $\mu\text{g/L}$ i 400 $\mu\text{g/L}$ w próbce.

Promazyny chlorowodorek

Stężenie w próbce = 250 µg/L

Na wadze analitycznej (waga OHAUS typ Pioneer PX125DM) odważono 1 mg związku i rozpuszczono w 1000,0 µL wody destylowanej. Uzyskany w ten sposób roztwór podstawowy należy rozcieńczyć 200 razy, aby otrzymać roztwór roboczy. Dodanie 100 µL tego roztworu do próby badanej powoduje uzyskanie stężenia 250 µg/L (objętość próby wynosi 2000 µL). Przygotowano również rozcieńczenie związku o stężeniu 10 µg/L i 50 µg/L w próbce.

W badaniu aktywności hemolitycznej podstawowej oraz indukowanej stresem oksydacyjnym użyto leki przeciwpsychotyczne w stężeniach równych ich maksymalnym stężeniom z zakresu terapeutycznego w osoczu (TPC_{max}), a także 5-krotnie wyższym ($5 \times TPC_{max}$) i 5-krotnie niższym niż TPC_{max} ($1/5 \times TPC_{max}$) (Tabela 23).

Tabela 23. Stężenia leków przeciwpsychotycznych badanych w ocenie aktywności hemolitycznej podstawowej oraz indukowanej stresem oksydacyjnym.

związek	$1/5 TPC_{max}$	TPC_{max}	$5 \times TPC_{max}$
Haloperidol	5 µg/L	25 µg/L	125 µg/L
Bromperidol	5 µg/L	25 µg/L	125 µg/L
Benperidol	2 µg/L	10 µg/L	50 µg/L
Penfluridol	5 µg/L	25 µg/L	125 µg/L
Pimozyd	3 µg/L	15 µg/L	75 µg/L
Kwetiapiny fumaran	80 µg/L	400 µg/L	2000 µg/L
Promazyny HCl	10 µg/L	50 µg/L	250/L

11.6. Ocena erytrotoksyczności badanych związków

11.6.1. Wykonanie pomiarów

Dwuprocentową zawiesinę RBC w 0,9% NaCl inkubowano w 37 °C przez 24 h z badanymi związkami w odpowiednich stężeniach. Kontrolę spontanicznej hemolizy stanowiły erytrocyty inkubowane w 0,9% NaCl. Za 100% hemolizę przyjęto absorbancję próby, w której erytrocyty inkubowano z 2,0% obj./obj. Triton X-100. Inkubacja erytrocytów z Triton X-100 i $K_4[Fe(CN)_6]$ (w stężeniu 50 g/L) odpowiadała 100 % zawartości methemoglobiny (MetHb). Leki przeciwpsychotyczne w stężeniach równych ich maksymalnym stężeniom z zakresu terapeutycznego w osoczu (TPC_{max}), a także 5-krotnie wyższym ($5 \times TPC_{max}$) i 5-krotnie niższym niż TPC_{max} ($1/5 \times TPC_{max}$) dodano do 2 % zawiesiny RBC. Próby kontrolne i badane inkubowano w temperaturze 37 °C. Pomiary absorbancji przeprowadzono po 5 i 24 godzinach inkubacji przy $\lambda=540$ nm w celu określenia uwalniania hemoglobiny z uszkodzonych erytrocytów oraz $\lambda=630$ nm w celu określenia utleniania hemoglobiny do methemoglobiny. Do każdego pomiaru pobierano 0,5 mL zawiesiny erytrocytów z inkubowanych próbek typu Eppendorf i wirowano (3000 rpm, 10 min). Absorbancję supernatantów mierzono przy użyciu spektrofotometru CECIL 2021 (CECIL Instruments Limited, UK). Procent hemolizy obliczono według poniższego wzoru:

$$\text{Hemoliza (\%)} = (A_{\text{próby}}/A_{\text{całkowita hemoliza}}) \times 100 \%$$

gdzie: $A_{\text{próby}}$ – absorbancja badanej próbki, $A_{\text{całkowita hemoliza}}$ – absorbancja próbki referencyjnej z 2% roztworem Triton X-100, odpowiadająca pełnej hemolizie lub absorbancja próbki referencyjnej z 2% roztworem Triton X-100 i roztworem $K_4[Fe(CN)_6]$ (w stężeniu 50 g/L) odpowiadająca 100 % zawartości MetHb.

Tabela 24. Skład próby kontrolnej w pomiarze erytrotoksyczności.

Skład próby	Objętość
2% zawiesina erytrocytów w 0,9% NaCl (0,15 mol/L)	1800 μ L
0,9% NaCl (0,15 mol/L)	200 μ L
Całkowita objętość próby	2000 μL

Tabela 25. Skład próby odniesienia w pomiarze erytrotoksyczności - hemoliza.

Skład próby	Objętość
2% zawiesina erytrocytów w 0,9% NaCl (0,15 mol/L)	1800 µL
0,9% NaCl (0,15 mol/L)	180 µL
2% roztwór Tritonu X-100	20 µL
Całkowita objętość próby	2000 µL

Tabela 26. Skład próby odniesienia w pomiarze methemoglobinotwórczości.

Skład próby	Objętość
2% zawiesina erytrocytów w 0,9% NaCl (0,15 mol/L)	1800 µL
0,9% NaCl (0,15 mol/L)	155 µL
2% roztwór Tritonu X-100	20 µL
K ₄ [Fe(CN) ₆]	25 µL
Całkowita objętość próby	2000 µL

Tabela 27. Skład próby badanej w pomiarze erytrotoksyczności oraz methemoglobinotwórczości.

Skład próby	Objętość
2% zawiesina erytrocytów w 0,9% NaCl (0,15 mol/L)	1800 µL
0,9% NaCl (0,15 mol/L)	100 µL
Badany związek	100 µL
Całkowita objętość próby	2000 µL

11.6.2. Walidacja metody badawczej

Przeprowadzone zostały próby kontrolne pomiaru absorbancji w celu walidacji metody badawczej. Otrzymane wyniki (Tabela 28) pozwoliły na obliczenie współczynnika zmienności (W), który wyniósł: $W = 2,04 \%$ dla pomiarów erytrotoksyczności oraz $W = 1,06 \%$ dla pomiarów methemoglobinotwórczości.

Tabela 28. Wartości absorbancji pomiarów erytrotoksyczności oraz methemoglobinotwórczości wykonanych dla kontroli w celu walidacji metody. Wyniki przedstawiono dla czterech prób erytrotoksyczności oraz methemoglobinotwórczości, przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach; odchylenie standardowe (SD), współczynniki zmienności (W) [%].

Erytrotoksyczność	Pomiar 1 [A/min]	Pomiar 2 [A/min]	Średnie wartości (n=3)	
			Średnia	W [%]
1	3,740	3,720	3,697 ± 0,049	2,04
2	3,786	3,741		
3	3,765	3,628		
4	3,636	3,560		
Średnia	3,732	3,662		
SD	0,067	0,084		
W [%]	1,79	2,29		
Methemoglobinotwórczość	Pomiar 1 [A/min]	Pomiar 2 [A/min]		
			Średnia	W [%]
1	0,528	0,518	0,519 ± 0,002	1,06
2	0,510	0,519		
3	0,517	0,513		
4	0,525	0,519		
Średnia	0,520	0,517		
SD	0,008	0,003		
W [%]	1,54	0,58		

11.7. Ocena działania ochronnego badanych związków na erytrocyty w warunkach stresu oksydacyjnego

Ocenę potencjalnego działania ochronnego badanych leków przeciwpsychotycznych przeciwko aktywności hemolitycznej indukowanej stresem oksydacyjnym przeprowadzono na ludzkich erytrocytach zgodnie z metodą opisaną przez Baldivia et al. [226]. Dwuprocentową zawiesinę RBC w 0,9% NaCl inkubowano w 37 °C przez 24 h z badanymi związkami w odpowiednich stężeniach. Kontrolę ze spontaniczną hemolizą stanowiły erytrocyty inkubowane w 0,9% NaCl. Za 100 % hemolizę przyjęto absorbancję próby, w której erytrocyty inkubowano z 2,0% obj./obj. Triton X-100. Inkubacja erytrocytów z Triton X-100 i K₄[Fe(CN)₆] (w stężeniu 50 g/L) odpowiadała 100 % zawartości methemoglobiny (MetHb). Przygotowano także kontrolę z wzorcowym antyoksydantem zawierającą kwas askorbinowy (AA)

w stężeniu 10 µg/mL. Czynnikiem indukującym stres oksydacyjny był AAPH w stężeniu 50 mmol/L. Leki przeciwpsychotyczne w stężeniach równych ich maksymalnym stężeniom z zakresu terapeutycznego w osoczu (TPC_{max}), a także 5-krotnie wyższym ($5 \times TPC_{max}$) i 5-krotnie niższym niż TPC_{max} ($1/5 \times TPC_{max}$) wraz z induktorem stresu oksydacyjnego AAPH w stężeniu 50 mmol/L dodano do 2% zawiesiny RBC. Próby kontrolne i badane inkubowano w temperaturze 37 °C. Pomiar absorpcji przeprowadzono po 5 i 24 godzinach przy $\lambda=540$ nm w celu określenia uwalniania hemoglobiny z uszkodzonych erytrocytów oraz $\lambda=630$ nm w celu określenia utleniania hemoglobiny do methemoglobiny. Do każdego pomiaru pobierano 0,5 mL zawiesiny erytrocytów z inkubowanych próbek typu Eppendorf i wirowano (3000 rpm, 10 min). Absorbancję supernatantów mierzono przy użyciu spektrofotometru CECIL 2021 (CECIL Instruments Limited, UK). Procent hemolizy obliczono według poniższego wzoru:

$$\text{Hemoliza (\%)} = (A_{\text{próby}}/A_{\text{całkowita hemoliza}}) \times 100 \%$$

gdzie: $A_{\text{próby}}$ – absorbancja badanej próbki, $A_{\text{całkowita hemoliza}}$ – absorbancja próbki referencyjnej z 2% roztworem Triton X-100, odpowiadająca pełnej hemolizie lub absorbancja próbki referencyjnej z 2% roztworem Triton X-100 i roztworem $K_4[Fe(CN)_6]$ (w stężeniu 50 g/L) odpowiadająca 100 % zawartości MetHb.

Tabela 29. Skład próby odniesienia z czynnikiem indukującym stres oksydacyjny dla spontanicznej hemolizy w ocenie działania ochronnego badanych związków na erytrocyty w warunkach stresu oksydacyjnego.

Skład próby	Objętość
2% zawiesina erytrocytów w 0,9% NaCl (0,15 mol/L)	1800 µL
0,9% NaCl (0,15 mol/L)	100 µL
AAPH (50 mmol/L)	100 µL
Całkowita objętość próby	2000 µL

Tabela 30. Skład próby kontrolnej z antyoksydantem (AA) w ocenie działania ochronnego badanych związków na erytrocyty w warunkach stresu oksydacyjnego.

Skład próby	Objętość
2% zawiesina erytrocytów w 0,9% NaCl (0,15 mol/L)	1800 μL
AAPH (50 mmol/L)	100 μL
AA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	100 μL
Całkowita objętość próby	2000 μL

Tabela 31. Skład próby odniesienia dla pomiaru methemoglobinotwórczości w ocenie działania ochronnego badanych związków na erytrocyty w warunkach stresu oksydacyjnego.

Skład próby	Objętość
2% zawiesina erytrocytów w 0,9% NaCl (0,15 mol/L)	1800 μL
0,9% NaCl (0,15 mol/L)	155 μL
2% roztwór Tritonu X-100	20 μL
$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	25 μL

Tabela 32. Skład próby badanej w ocenie działania ochronnego badanych związków na erytrocyty oraz na methemoglobinotwórczość w warunkach stresu oksydacyjnego.

Skład próby	Objętość
2% zawiesina erytrocytów w 0,9% NaCl (0,15 mol/L)	1800 μL
AAPH (50 mmol/L)	100 μL
Badany związek	100 μL
Całkowita objętość próby	2000 μL

11.7.1. Walidacja metody badawczej

Przeprowadzone zostały próby kontrolne pomiaru absorbancji w celu walidacji metody badawczej. Otrzymane wyniki (Tabela 33) pozwoliły na obliczenie współczynnika zmienności (W), który wyniósł: $W = 2,93 \%$ dla pomiarów erytrotoksyczności w warunkach stresu oksydacyjnego oraz $W = 5,04 \%$ dla pomiarów methemoglobinotwórczości w warunkach stresu oksydacyjnego.

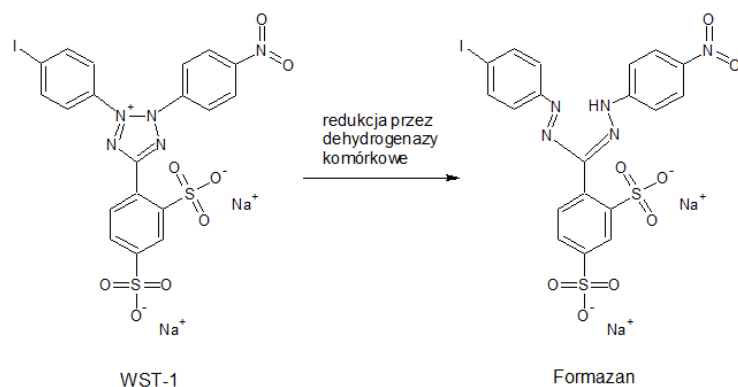
Tabela 33. Wartości absorbancji pomiarów erytrotoksyczności oraz methemoglobinotwórczości wykonanych dla kontroli w celu walidacji metody. Wyniki przedstawiono dla czterech prób erytrotoksyczności oraz methemoglobinotwórczości w warunkach stresu oksydacyjnego, przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach; odchylenie standardowe (SD), współczynniki zmienności (W) [%].

Erytrotoksyczność w warunkach stresu oksydacyjnego	Pomiar 1 [A/min]	Pomiar 2 [A/min]	Średnie wartości (n=3)	
			Średnia	W [%]
1	1,042	1,152	1,088 ± 0,024	2,93
2	1,068	1,074		
3	1,114	1,102		
4	1,060	1,092		
Średnia	1,071	1,105		
SD	0,031	0,033		
W [%]	2,89	2,98		
Methemoglobinotwórczość w warunkach stresu oksydacyjnego	Pomiar 1 [A/min]	Pomiar 2 [A/min]		
			Średnia	W [%]
1	0,598	0,538	0,530 ± 0,016	5,04
2	0,528	0,517		
3	0,510	0,502		
4	0,530	0,520		
Średnia	0,542	0,519		
SD	0,039	0,015		
W [%]	7,19	2,89		

11.8. Potencjał antyoksydacyjny leków przeciwpsychotycznych w modelu hodowli komórkowej

11.8.1. Ocena żywotności komórek HUVEC oraz astrocytów

Do oceny żywotności komórek HUVEC i astrocytów zastosowano test WST-1 (Takara, Takara Bio Europe, Francja). Zasada testu opiera się na redukcji soli tetrazoliowej WST-1 do formazanu przez dehydrogenazy komórkowe (Rysunek 9). Wytwarzanie ciemnożółtego formazanu mierzone jest przy długości fali $\lambda = 450 \text{ nm}$ i bezpośrednio koreluje z liczbą żywych komórek.



Rysunek 9. Redukcja soli tetrazoliowej WST-1 do formazanu przez dehydrogenazy komórkowe. Opracowanie własne na podstawie [227].

11.8.2. Ocena wpływu badanych związków na żywotność komórek

Komórki HUVEC i astrocyty wysiano na 96-dołkowych płytkach i hodowano przez 24 h. Następnie komórki inkubowano z badanymi związkami o stężeniach równych $\frac{1}{2}$ TPC_{max} i TPC_{max} lub czystą pożywką, stanowiącą kontrolę ($v = 100 \mu\text{L}$), przez kolejne 24 godziny (37°C , $5\% \text{CO}_2$). Komórki przemyto pożywką hodowlaną ($100 \mu\text{L}$) i dodano odczynnik WST-1 rozcieńczony w pożywce ($10 \mu\text{L}$ odczynnika + $90 \mu\text{L}$ medium). Płytki inkubowano w 37°C w $5\% \text{CO}_2$ przez kolejne 90 min w przypadku HUVEC i 60 min w próbach z astrocytami. Absorbancję odczytano przy $\lambda=450 \text{ nm}$ przy użyciu czytnika mikropłytek (iMARK, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Żywotność komórek wyrażono jako procent średniej absorbancji z prób kontrolnych, którą przyjmowano za 100% żywotności.

11.8.3. Walidacja metody badawczej

Przeprowadzone zostały próby kontrolne pomiaru absorbancji przeprowadzonej w badaniu żywotności komórek HUVEC oraz astrocytów w celu walidacji metody badawczej. Otrzymane wyniki (Tabela 34) pozwoliły na obliczenie współczynnika zmienności (W), który wyniósł: $W = 2,55 \%$ dla HUVEC oraz $W = 1,17 \%$ dla astrocytów.

Tabela 34. Wartości absorbancji pomiarów dla żywotności komórek HUVEC oraz astrocytów wykonanych dla kontroli w celu walidacji metody. Wyniki przedstawiono dla sześciu prób dla HUVEC oraz astrocytów, przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach; odchylenie standardowe (SD), współczynniki zmienności (W) [%].

HUVEC	Pomiar 1 [A/min]	Pomiar 2 [A/min]	Średnie wartości (n=3)	
			Średnia	W [%]
1	1,009	0,971	0,991 ± 0,015	2,55
2	1,052	0,996		
3	0,997	1,015		
4	1,037	0,937		
5	1,007	0,987		
6	0,985	0,973		
Średnia	1,015	0,980		
SD	0,025	0,026		
W [%]	2,46	2,65		
Astrocyty	Pomiar 1 [A/min]	Pomiar 2 [A/min]		
			Średnia	W [%]
1	1,536	1,534	1,512 ± 0,004	0,17
2	1,477	1,504		
3	1,528	1,503		
4	1,521	1,513		
5	1,509	1,512		
6	1,519	1,490		
Średnia	1,515	1,509		
SD	0,021	0,015		
W [%]	1,36	0,99		

11.8.4. Ocena działania badanych związków w warunkach stresu oksydacyjnego

Do oceny potencjalnego ochronnego działania leków przeciwpsychotycznych na wzrost komórek HUVEC i astrocytów w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego przez AAPH zastosowano test WST-1 (Takara, Takara Bio Europe, Francja). Warunki eksperymentalne były takie same jak w badaniach żywotności. Jako kontrolę antyoksydacyjną zastosowano AA w końcowym stężeniu 10 µg/mL. Po osiągnięciu konfluencji dodano leki przeciwpsychotyczne w stężeniach równych ½ TPC_{max} i TPC_{max}. Po 1 godzinie inkubacji w standardowych warunkach do dołków zawierających badane związki lub AA dodano AAPH w objętości 50 µL. Stężenie AAPH zostało wybrane na podstawie wstępnych eksperymentów (wpływ AAPH

na żywotność komórek) i wynosiło 17,5 mmol/L w eksperymentach HUVEC i 15,0 mmol/L w przypadku astrocytów.

11.8.5. Walidacja metody badawczej

Wykonane zostały próby kontrolne pomiaru absorbancji przeprowadzonej w badaniu żywotności komórek HUVEC oraz astrocytów w warunkach stresu oksydacyjnego w celu walidacji metody badawczej. Otrzymane wyniki (Tabela 35) pozwoliły na obliczenie współczynnika zmienności (W), który wyniósł: $W = 7,67\%$ dla HUVEC oraz $W = 4,71\%$ dla astrocytów.

Tabela 35. Wartości absorbancji pomiarów dla żywotności komórek HUVEC oraz astrocytów w warunkach stresu oksydacyjnego wykonanych dla kontroli w celu walidacji metody. Wyniki przedstawiono dla pięciu prób dla HUVEC oraz astrocytów, przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach; odchylenie standardowe (SD), współczynniki zmienności (W) [%].

HUVEC	Pomiar 1 [A/min]	Pomiar 2 [A/min]	Średnie wartości (n=3)			
			Średnia [A/min]	W [%]		
1	1,423	1,279	1,342 ± 0,082	7,67		
2	1,355	1,181				
3	1,319	1,472				
4	1,341	1,285				
5	1,559	1,202				
Średnia	1,399	1,284				
SD	0,097	0,115				
W [%]	6,39	8,95				
Astrocyty	Pomiar 1 [A/min]	Pomiar 2 [A/min]			Średnie wartości (n=3)	
					Średnia [A/min]	W [%]
1	2,167	1,977	1,961 ± 0,191	4,71		
2	2,027	1,850				
3	2,173	1,790				
4	2,122	1,705				
5	1,990	1,807				
Średnia	2,096	1,826				
SD	0,083	0,100				
W [%]	3,95	5,47				

11.8.6. Ocena mikroskopowa morfologii komórek

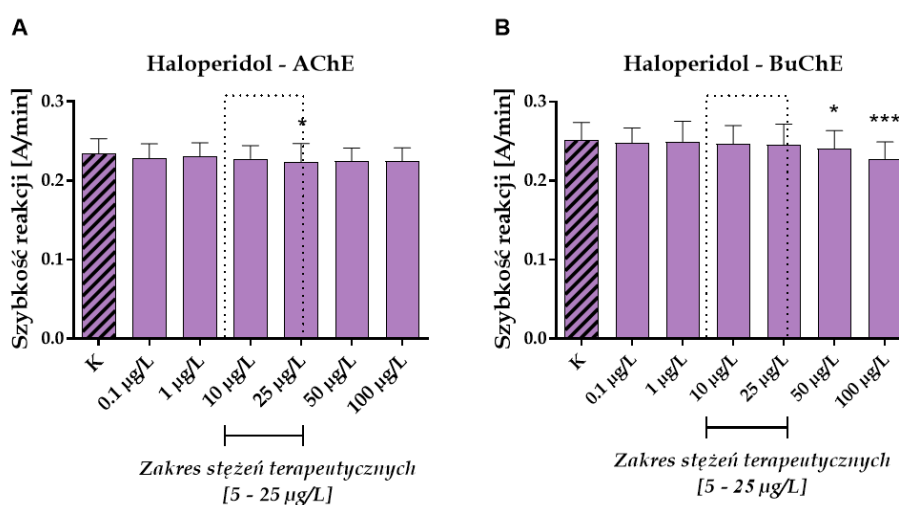
Oceny morfologii komórek HUVEC i astrocytów dokonano przy użyciu mikroskopu z kontrastem fazowym (powiększenie 100-krotne) zsynchronizowanym z komputerem, który jest wyposażony w program do analizy obrazu (Opta-Tech, oprogramowanie OptaView 7).

12. Wyniki

12.1. Ocena stopnia hamowania aktywności AChE i BuChE przez badane związki oraz wyznaczenie wartości IC₅₀

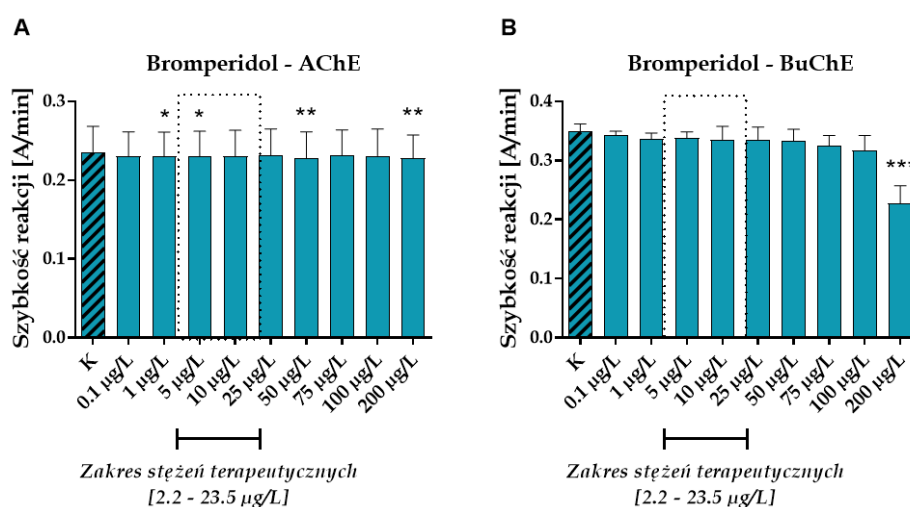
Pierwszy etap badań polegał na określeniu stopnia hamowania ludzkich esteraz (AChE, BuChE) przez wybrane leki przy zastosowaniu zmodyfikowanej metody Ellmana. Wykonane zostały pomiary dla leków przeciwpsychotycznych: haloperidolu, bromperidolu, benperidolu (pochodne butyrofenonu), pimozydu, penfluridolu (pochodne difenylbutylopiperydyny), kwetiapiny (pochodna tiazepiny) i promazyny (pochodna fenotiazyny) oraz dla związków wzorcowych, którymi były substancje odwracalnie hamujące cholinoesterazy (ChE) - donepezyl i rywastygmina.

Wpływ leków przeciwpsychotycznych na szybkość reakcji AChE i BuChE przedstawiono na Wykresach 1-7, natomiast dla związków odniesienia na Wykresach 8-9. Z przeprowadzonych badań wynika, że haloperidol w najwyższym stężeniu terapeutycznym (25 µg/L) hamuje aktywność AChE o 4,85% (szybkość reakcji wynosiła $0,223 \pm 0,024$ A/min, w porównaniu do kontroli $0,235 \pm 0,018$ A/min, $p < 0,05$). W przypadku BuChE można zauważyć zależność hamowania enzymu od stężenia haloperidolu w zakresie najwyższych jego stężeń (50 – 100 µg/L), które obniżają aktywność BuChE o odpowiednio: 4,63% (szybkość reakcji po inkubacji ze związkiem wyniosła $0,240 \pm 0,023$ A/min, dla kontroli $0,252 \pm 0,022$ A/min, $p < 0,05$) i 9,59% (szybkość reakcji po inkubacji ze związkiem wyniosła $0,228 \pm 0,021$ A/min, $p < 0,001$).



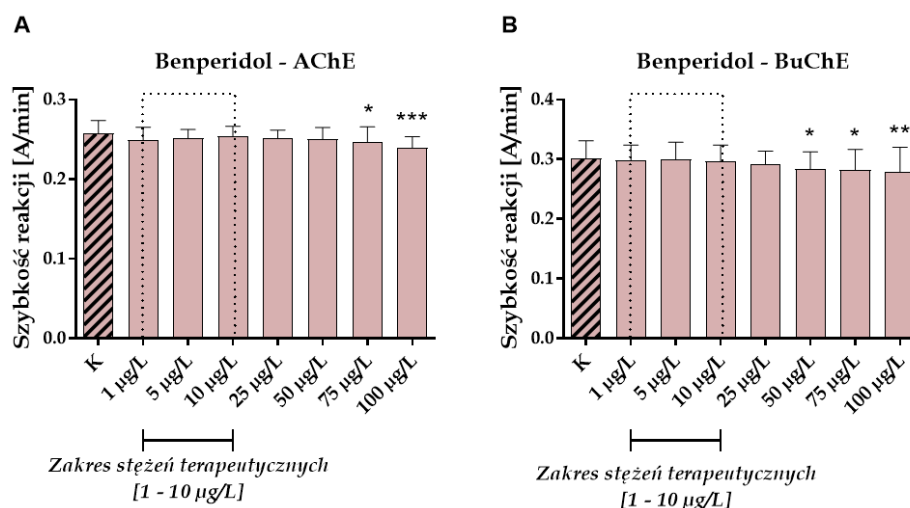
Wykres 1. Wpływ haloperidolu na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $*p < 0,05$, $***p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

W przypadku bromperidolu nie można zaobserwować zależności między działaniem anty-AChE, a stężeniem substancji. Różnice statystycznie istotne wynikają ze zmiennych odchyłeń standardowych. Dla stężeń: 1 µg/L i 5 µg/L aktywność zmniejszyła się o 2,54% (szybkość reakcji spadła z 0,236 A/min do 0,230 ± 0,031 A/min, $p < 0,05$), natomiast dla stężeń wyższych od TPC (2,2 – 23,5 µg/L): 50 µg/L i 200 µg/L aktywność enzymu zmniejszyła się w obu przypadkach o 3,46% (szybkość reakcji 0,228 ± 0,029 A/min, $p < 0,01$). Działanie anty-BuChE występuje jedynie przy największym badanym stężeniu bromperidolu: 200 µg/L, szybkość reakcji zmniejszyła się o 0,120 ± 0,023 A/min, $p < 0,001$, hamując enzym aż o 34,24%.



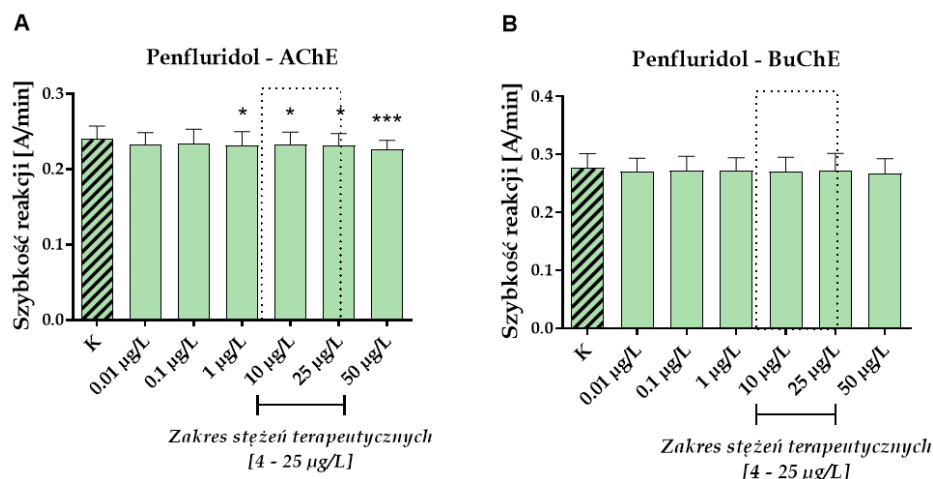
Wykres 2. Wpływ bromperidolu na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia ± SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Ostatnia badana pochodna butyrofenonu - benperidol wykazuje zależność siły inhibicji obu ChE od stężenia substancji. Istotne statystycznie działanie występuje jednak tylko w zakresach stężeń większych od TPC: 75 µg/L zmniejszyło aktywność AChE o 4,42% (0,246 ± 0,019 A/min, w porównaniu do kontroli 0,258 ± 0,016 A/min, $p < 0,05$), natomiast 100 µg/L o 7,14% (szybkość reakcji zmniejszyła się do 0,239 ± 0,014 A/min, $p < 0,001$). W przypadku BuChE, wystąpiło zahamowanie aktywności enzymu o 6,08% i 6,46% odpowiednio dla benperidolu w stężeniach: 50 µg/L oraz 75 µg/L (0,283 ± 0,029 A/min oraz 0,282 ± 0,034 A/min, w odniesieniu do kontroli 0,302 ± 0,030, $p < 0,05$), natomiast benperidol w stężeniu 100 µg/L zahamował szybkość reakcji o 7,55% (spadek szybkości reakcji o 0,023 ± 0,041 A/min, $p < 0,01$).

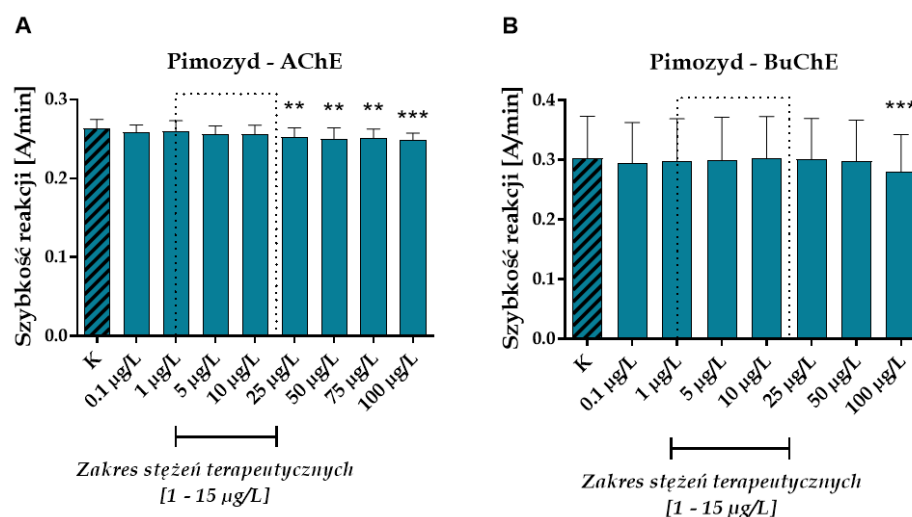


Wykres 3. Wpływ benperidolu na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Pochodne difenylbutylopiperydyny – penfluridol i pimozyd wykazały zależną od stężenia inhibicję AChE. Penfluridol działa w zakresie szerszym niż TPC (4 - 25 $\mu\text{g/L}$) i obejmuje stężenia 1 - 50 $\mu\text{g/L}$, dla których inhibicja enzymu mieści się w zakresie 3,53 - 5,89% (szybkość reakcji wynosiła $0,232 \pm 0,018$ A/min - $0,226 \pm 0,012$ A/min, w odniesieniu do kontroli $0,241 \pm 0,017$ A/min, $p < 0,05$, $p < 0.001$). Pimozyd w stężeniach wyższych od TPC (1 - 15 $\mu\text{g/L}$) mieszczących się w zakresie: 25 - 100 $\mu\text{g/L}$ zmniejszył szybkość reakcji o 4,11 – 5,70% (szybkość reakcji: $0,253 \pm 0,012$ A/min - $0,248 \pm 0,009$ A/min w odniesieniu do kontroli $0,263 \pm 0,011$ A/min, $p < 0.01$, $p < 0.001$). Aktywność BuChE zahamowana została jedynie przez pimozyd w stężeniu 100 $\mu\text{g/L}$, który zmniejszył szybkość reakcji o $0,023 \pm 0,062$ A/min (spadek o 7,62 %, $p < 0.001$).



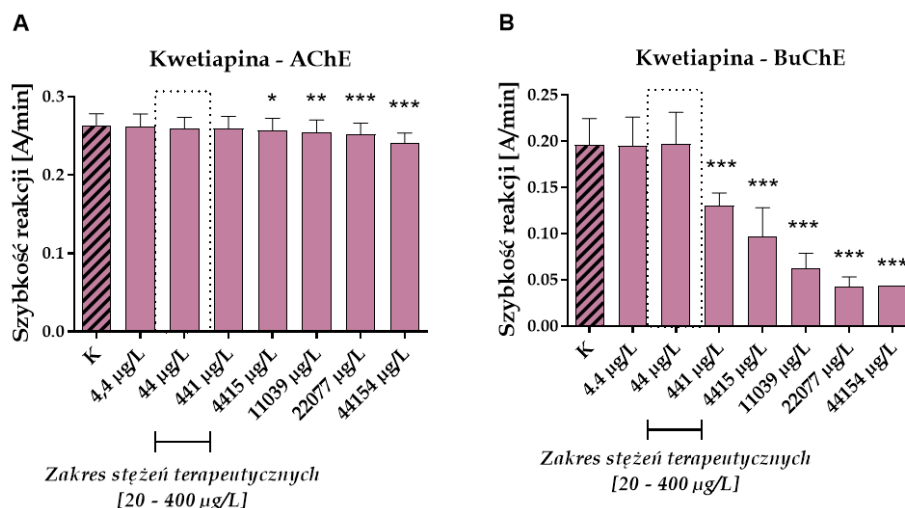
Wykres 4. Wpływ penfluridolu na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K).



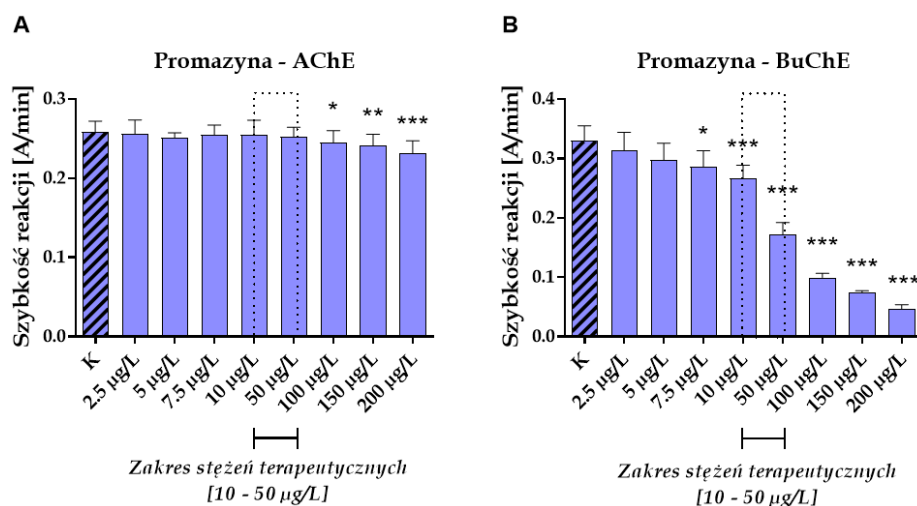
Wykres 5. Wpływ pimozydu na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Kwetiapina i promazyna zmniejszały aktywność AChE w zakresie stężeń powyżej TPC i jest to hamowanie enzymu zależne od stężenia substancji. Kwetiapina działała w zakresie 4415 - 44154 $\mu\text{g/L}$ zmniejszając szybkość reakcji o 2,71 – 8,84% (szybkość reakcji mieściła się w zakresie $0,257 \pm 0,016 - 0,241 \pm 0,013$ A/min, w odniesieniu do kontroli: $0,264 \pm 0,014$ A/min, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$). Promazyna natomiast w stężeniach 100 – 200 $\mu\text{g/L}$ przyczyniła się do inhibicji AChE w zakresie 5,28 – 10,42 % (szybkość reakcji zmniejszyła się o $0,014 \pm 0,015$ A/min –

0,027 ± 0,016 A/min, $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$). Ponadto, związki te wykazały największą zdolność do hamowania aktywności BuChE spośród badanych leków przeciwpsychotycznych. W przypadku kwetiapiny istotna statystycznie inhibicja wystąpiła powyżej TPC, obejmując stężenia 441 – 44154 µg/L, która zmniejszyła aktywność BuChE o 36,79 – 77,11% (szybkość reakcji spadła o 0,072 ± 0,020 A/min – 0,151 ± 0,001 A/min w odniesieniu do kontroli: 0,196 ± 0,029 A/min, $p < 0,001$). Promazyna wykazała działanie hamujące aktywność BuChE w zakresie znacznie szerszym niż TPC, obejmowało ono bowiem stężenia 7,5 - 200 µg/L, dla których inhibicja wynosiła 19,08 – 85,75 % (szybkość reakcji z tymi stężeniami była w zakresie odpowiednio: 0,267 ± 0,022 A/min - 0,047 ± 0,007 A/min, w porównaniu do kontroli: 0,330 ± 0,025 A/min, $p < 0,05$, $p < 0,001$).

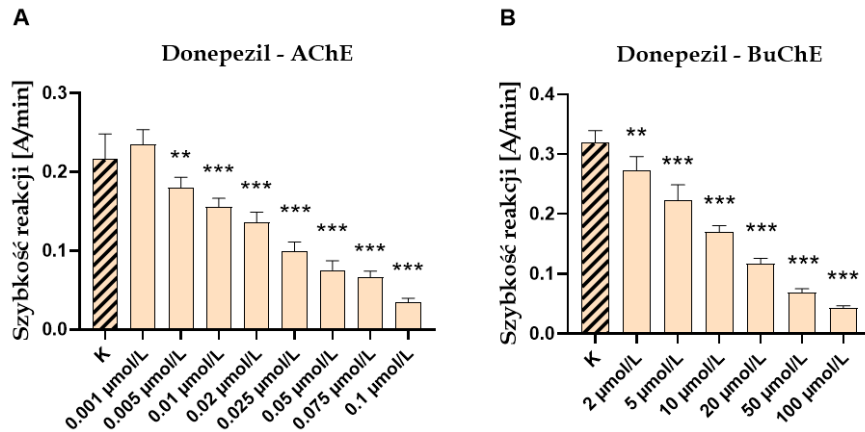


Wykres 6. Wpływ kwetiapiny na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia ± SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

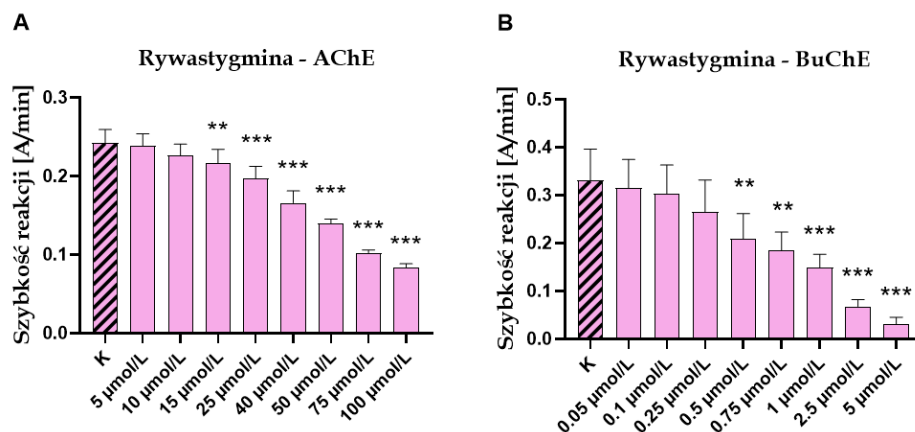


Wykres 7. Wpływ promazyny na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wykonano również badanie oceniające wpływ donepezylu oraz rywastygminy - związków odniesienia, na szybkość reakcji AChE i BuChE. Z przedstawionych poniżej wykresów (Wykres 8 i 9) wynika, że donepezyl hamuje AChE w zakresie stężeń 0,005 - 0,1 $\mu\text{mol/L}$ odpowiednio o 16,63 - 84,37 % (szybkość reakcji zmniejszyła się o $0,036 \pm 0,013$ A/min - $0,183 \pm 0,005$ A/min w porównaniu do kontroli $0,217 \pm 0,032$ A/min, $p < 0,01$, $p < 0,001$). Donepezyl hamował BuChE w zakresie 2 - 100 $\mu\text{mol/L}$, zmniejszając szybkość reakcji o 36,79 - 77,11% (szybkość reakcji wynosiła odpowiednio $0,274 \pm 0,023$ A/min - $0,043 \pm 0,004$ A/min, w odniesieniu do kontroli: $0,319 \pm 0,020$ A/min, $p < 0,01$, $p < 0,001$). Rywastygmina hamowała AChE w zakresie stężeń 15 - 100 $\mu\text{mol/L}$ o 6,59 - 65,32% (szybkość reakcji zmniejszyła się o $0,016 \pm 0,014$ A/min - $0,159 \pm 0,004$ A/min w porównaniu do kontroli $0,243 \pm 0,017$ A/min, $p < 0,01$, $p < 0,001$). Aktywność BuChE spadła o 36,93 - 90,73% (szybkość reakcji zmniejszyła się o $0,122 \pm 0,053$ A/min - $0,300 \pm 0,015$ A/min w porównaniu do kontroli $0,331 \pm 0,066$ A/min, $p < 0,01$, $p < 0,001$) dla rywastygminy w zakresie stężeń 0,5 - 5 $\mu\text{mol/L}$.



Wykres 8. Wpływ donepezylu na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K). Zakres stężeń terapeutycznych 30-75 $\mu\text{g/L}$ (0,072-0,180 $\mu\text{mol/L}$).



Wykres 9. Wpływ rywastygminy na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K). Zakres stężeń terapeutycznych 5-22 $\mu\text{g/L}$ (0,012-0,055 $\mu\text{mol/L}$).

Wyznaczona szybkość reakcji enzymatycznych posłużyła do obliczenia procentów inhibicji aktywności AChE oraz BuChE, które nie przekroczyły 11% dla badanych leków przeciwpsychotycznych, co przedstawia Tabela 36. Wyjątek stanowił bromperidol, który zahamował BuChE o 34,24% w najwyższym badanym stężeniu, które było prawie 10-krotnie wyższe od TPC oraz kwetiapina i promazyna, które wykazały ponad 50% stopień inhibicji BuChE, co pozwoliło na obliczenie wartości IC_{50} dla tych dwóch związków (Tabela 37). Obliczenia wskaźnika

selektywności (SI) potwierdziły, że zarówno kwetiapina jak i promazyna wykazują większą selektywność względem BuChE niż AChE.

Tabela 36. Maksymalne wartości inhibicji [%] AChE oraz BuChE dla leków przeciwpsychotycznych w badanych zakresach stężeń. Wartości statystycznie istotne na poziomie * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K), którą stanowiły próby nie traktowane lekami przeciwpsychotycznymi.

Związek	max. % inhibicji enzymu	
	AChE	BuChE
Haloperidol (0,1 - 100 µg/L)	4,85 % *	9,59 % ***
Bromperidol (0,1 - 200 µg/L)	3,46 % **	34,24 % ***
Benperidol (1 - 100 µg/L)	7,14 % **	7,55 % **
Penfluridol (0,01 - 50 µg/L)	5,89 % ***	3,60 %
Pimozyd (0,1 - 100 µg/L)	5,70 % ***	7,62 % ***
Kwetiapina (4,4 - 44154 µg/L)	8,84 % ***	77,11 % ***
Promazyna (2,5 - 200 µg/L)	10,42 % ***	85,75 % ***

Na podstawie danych doświadczalnych otrzymanych dla donepezylu i rywastygminy obliczono IC_{50} również dla związków wzorcowych. W przeprowadzonych badaniach, wykazano doświadczalnie, że donepezyl hamował 50% aktywności AChE i BuChE, odpowiednio w stężeniach $0,025 \pm 0,004$ µmol/L i $12,81 \pm 1,52$ µmol/L. Odnosząc się do danych literaturowych [213,228,229] opisujących TPC dla donepezylu: 30 – 75 µg/L (0,072 – 0,180 µmol/L), jedynie dwa najwyższe badane stężenia donepezylu dla AChE (0,075 – 0,1 µmol/L) mieszczą się w zakresie TPC, natomiast dla BuChE zakres TPC jest poniżej badanych stężeń. Rywastygmina z kolei powodowała 50% inhibicji aktywności AChE w stężeniu $64,29 \pm 2,97$ µmol/L oraz BuChE w stężeniu $0,95 \pm 0,09$ µmol/L. Zakres TPC dla rywastygminy wg literatury [229] mieści się w zakresie 5 – 22 µg/L (0,012 - 0,055 µmol/L), czyli dla AChE jest on poniżej badanych stężeń rywastygminy, natomiast dla BuChE obejmuje najniższe jej stężenie (0,05 µmol/L). Otrzymane wartości IC_{50} pokrywają się z referencyjnymi wartościami IC_{50} dla donepezylu i rywastygminy opisywanymi w literaturze, co przedstawia Tabela 37.

Tabela 37. Zestawienie wartości IC_{50} dla donepezylu, rywastygminy, promazyny i kwetiapiny uzyskanych w badaniach własnych i danych literaturowych [230-235].

Związek	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)		SI		Literatura
	AChE	BuChE	AChE	BuChE	
Donepezil – badania własne	$0,025 \pm 0,004$	$12,81 \pm 1,52$	512,40	0,002	Dane eksperymentalne
Donepezil – literaturowe wartości referencyjne	$0,323 \pm 0,126$	$12,80 \pm 0,70$	39,60	0,025	[230] ¹
	$0,020 \pm 0,001$	$4,60 \pm 0,28$	230,00	0,004	[231] ²
	$0,035 \pm 0,003$	$2,32 \pm 0,10$	66,30	0,015	[232] ²
Rywastygmina – badania własne	$64,29 \pm 2,97$	$0,95 \pm 0,09$	0,015	67,67	Dane eksperymentalne
Rywastygmina - literaturowe wartości referencyjne	$4,76 \pm 0,11$	$0,24 \pm 0,02$	0,05	19,83	[230] ¹
	$3,12 \pm 0,46$	$0,38 \pm 0,02$	0,12	8,21	[233] ¹
	$8,10 \pm 0,33$	$3,60 \pm 0,15$	0,44	2,25	[234] ¹
	$56,10 \pm 1,40$	$66,30 \pm 5,30$	1,18	0,85	[235] ²
Promazyna – badania własne	> 2 *	$0,19 \pm 0,02$	0,05*	19*	Dane eksperymentalne
Promazyna - literaturowe wartości referencyjne	bd*	bd*	-	-	
Kwetiapina – badania własne	> 100*	$6,08 \pm 1,63$	0,01*	113*	Dane eksperymentalne
Kwetiapina - literaturowe wartości referencyjne	bd*	bd*	-	-	

*wartości teoretyczne obliczone na podstawie wykresów ekstrapolowanych dla promazyny i kwetiapiny w kierunku AChE i BuChE. SI (wskaźnik selektywności, Selectivity Index) – dla AChE określa się jako stosunek powinowactwa IC_{50} BuChE/ IC_{50} AChE, dla BuChE jako IC_{50} AChE/ IC_{50} BuChE.

bd* - brak danych

¹ badania przeprowadzone na ludzkich AChE i BuChE

² badania przeprowadzone na AChE pozyskanym z węgorza elektrycznego i BuChE pozyskanym z surowicy końskiej

Porównanie wyznaczonych wartości IC_{50} dla promazyny i kwetiapiny z wartościami IC_{50} otrzymanymi dla wzorcowych inhibitorów tych enzymów wykazało, że promazyna ma aż 5-krotnie wyższą aktywność anty-BuChE w porównaniu z rywastygminą (wzorcowy, nieselektywny inhibitor ChE). Donepezil, który jest wysokoselektywnym inhibitorem o stosunkowo słabej aktywności anty-BuChE

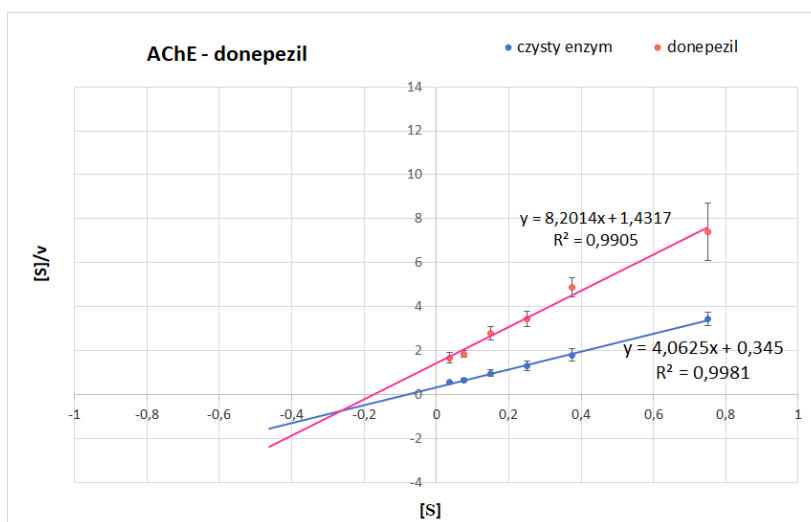
i silnej anty-AChE, zahamował ponad 67-krotnie słabiej w stosunku do promazyny aktywność BuChE. Inaczej sprawa wygląda w przypadku kwetiapiny, która wykazała się nieco słabszą aktywnością anty-BuChE niż rywastygmina (wartość IC_{50} dla kwetiapiny była ok. 6-krotnie wyższa w porównaniu do IC_{50} rywastygminy), natomiast dwa razy silniej hamowała aktywność BuChE w porównaniu z donepezilem. Wyniki przedstawiające silną inhibicję BuChE przez promazynę i kwetiapinę są korzystne w świetle badań przeprowadzonych przez Grossberga i współautorów [236], którzy donieśli, że aktywność BuChE w neuroprzekaznictwie cholinergicznym wzrasta w AD o 40 - 90%, chociaż BuChE stanowi tylko 10% całkowitej aktywności ChE w korze zdrowego ludzkiego mózgu. Otrzymana aktywność promazyny i kwetiapiny może być związana z obecnością w strukturze układu trójpierścieniowego zawierającego azot i siarkę. Potwierdzałyby to doniesienia Tasso i współautorów [237], którzy opisali wysoce selektywne hamowanie BuChE przez niektóre pochodne fenotiazyny, takie jak np. etopropazyna, a także przez niektóre pochodne i analogi fizostygminy (np. fenetylocymseryna). Dla etopropazyny wartość IC_{50} wynosiła 260 $\mu\text{mol/L}$ w odniesieniu do AChE, podczas gdy dla BuChE wynosiła 0,3 $\mu\text{mol/L}$ [238].

12.2. Wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej

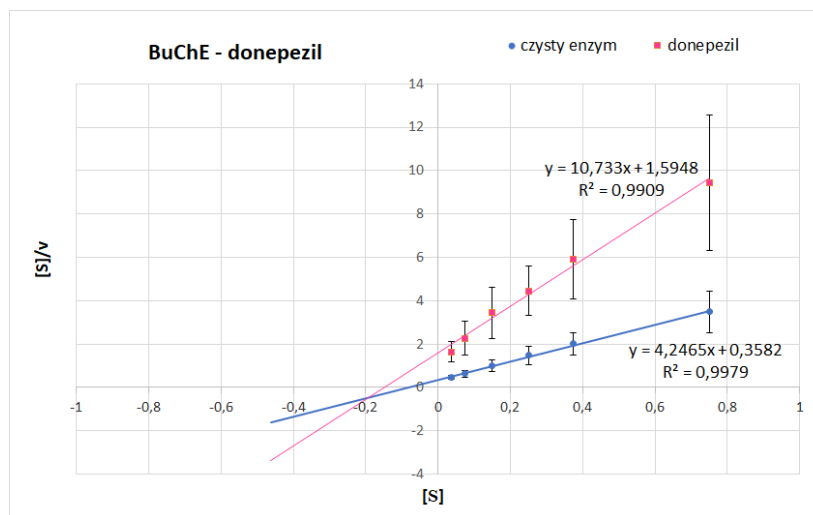
Parametry kinetyczne reakcji enzymatycznych wyznaczono na podstawie trzech indywidualnych eksperymentów przeprowadzonych z wykorzystaniem materiału biologicznego uzyskanego od różnych dawców. W celu oceny kinetyki enzymatycznej przeprowadzono doświadczenia z użyciem zmiennych stężeń substratów ATC (0,0375 – 0,75 $\mu\text{mol/mL}$), BTC (0,0375 – 0,75 $\mu\text{mol/mL}$). Typ hamowania i parametry kinetyczne reakcji wyliczono w oparciu o równanie Hanesa-Wolfa, stosując metodę regresji liniowej najlepszego dopasowania do zebranych danych pomiarowych. W otrzymanym równaniu prostej $y = ax + b$, wartość $y = [S]/v$, $a = 1/V_{\text{max}}$, $x = [S]$ i $b = K_m/V_{\text{max}}$. Wykresem równania jest prosta przecinająca oś 0Y w punkcie K_m/V_{max} , a oś 0X w punkcie $-K_m$. Wartości K_m , V_{max} otrzymane dla czystego enzymu i $K_{m(i)}$, $V_{\text{max}(i)}$ dla badanych związków przy stężeniach IC_{50} zastosowano do określenia typu inhibicji (Wykresy 10-15). Zestawienie otrzymanych wyników K_m i V_{max} przedstawiono w Tabeli 38. Ponadto, w celu potwierdzenia, że typ inhibicji nie zmienia się przy niższych stężeniach inhibitora, dla kwetiapiny i promazyny wyznaczono także

wartości $K_{m(i)}$ i $V_{max(i)}$ dla stężeń odpowiadających ok. 25% inhibicji ($1/2 IC_{50}$) (Wykresy 14-15, Tabela 38).

Uzyskane dane wskazują, że donepezil hamuje zarówno AChE, jak i BuChE w sposób mieszany. Doniesienia literaturowe [238-241] opisują donepezil jako selektywny, niekonkurencyjny i odwracalny inhibitor AChE. Hamowanie enzymu może następować poprzez wiązanie w centrum aktywnym lub też peryferyjnym. W inhibicji typu mieszanego oba parametry kinetyczne opisujące reakcję enzymatyczną ulegają zmianie ($K_{m(i)}$ jest większa niż K_m , a $V_{max(i)}$ zmniejsza się w porównaniu do V_{max}), natomiast miejsce przecięcia z osią OY odpowiada wartości równej $K_{m(i)}/V_{max(i)}$, podczas gdy przecięcie z osią OX odpowiada $-K_{m(i)}$ [242].

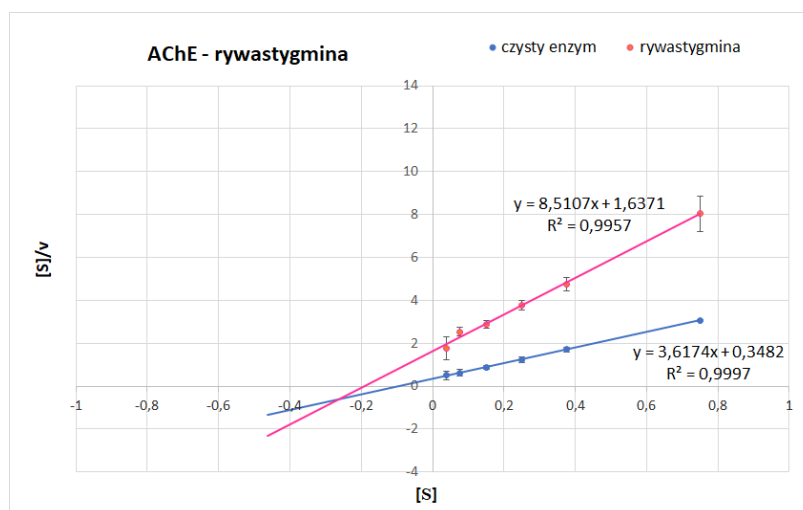


Wykres 10. Wykres Hanesa-Wolfa, przedstawiający stosunek początkowego stężenia substratu $[S]$ do prędkości reakcji v wykreślonej względem $[S]$. Donepezil w stężeniu równym wartości IC_{50} ($0,025 \mu\text{mol/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm SD$, $n = 3$.

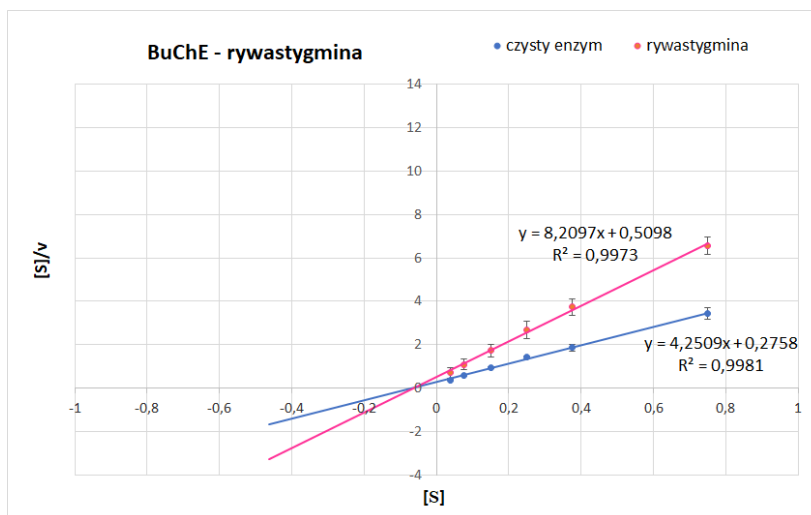


Wykres 11. Wykres Hanesa-Wolfa, przedstawiający stosunek początkowego stężenia substratu [S] do prędkości reakcji v wykreślonej względem [S]. Donepezil w stężeniu równym wartości IC_{50} ($12,81 \mu\text{mol/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD, $n = 3$.

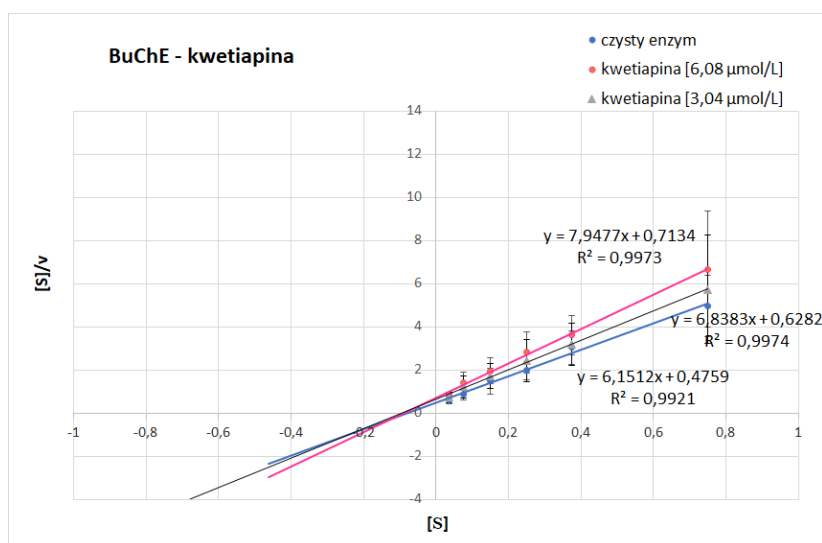
Inhibicję typu mieszanego wykazano również dla rywastygminy w stosunku do AChE oraz dla kwetiapiny i promazyny w odniesieniu do BuChE. Odmienny mechanizm inhibicji aktywności BuChE zaobserwowano w przypadku rywastygminy, dla której podczas hamowania aktywności BuChE wartość $K_{m(i)}$ pozostaje bez zmian (krzywe dla czystego enzymu i enzymu z inhibitorem przecinają oś 0X w tym samym punkcie wartości ujemnych), podczas gdy $V_{\max(i)}$ ulega zmniejszeniu (krzywa dla enzymu z inhibitorem przecina oś 0Y przy wyższych wartościach na osi rzędnych niż krzywa dla czystego enzymu) [242].



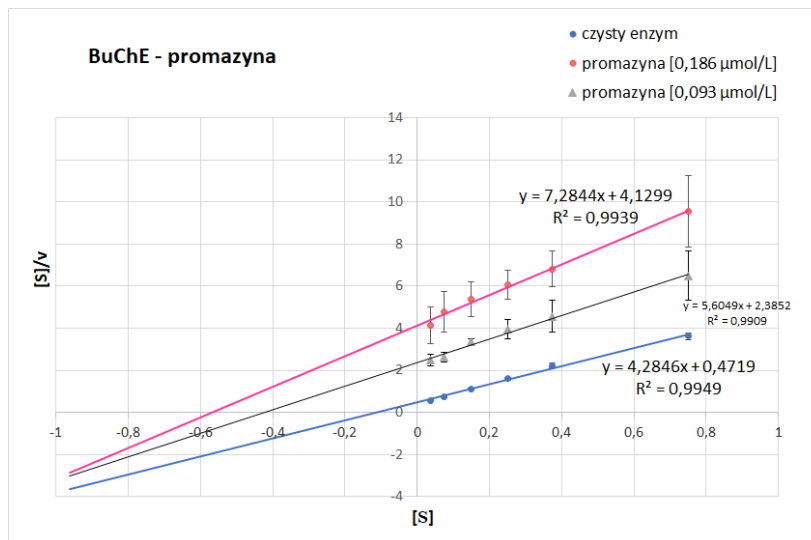
Wykres 12. Wykres Hanesa-Wolfa, przedstawiający stosunek początkowego stężenia substratu [S] do prędkości reakcji v wykreślonej względem [S]. Rywastygmina w stężeniu równym wartości IC_{50} ($64,29 \mu\text{mol/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD, $n = 3$.



Wykres 13. Wykres Hanesa-Wolfa, przedstawiający stosunek początkowego stężenia substratu $[S]$ do prędkości reakcji v wykreślonej względem $[S]$. Rywastygmina w stężeniu równym wartości IC_{50} ($0,95 \mu\text{mol/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm SD$, $n = 3$.



Wykres 14. Wykres Hanesa-Wolfa, przedstawiający stosunek początkowego stężenia substratu $[S]$ do prędkości reakcji v wykreślonej względem $[S]$. Kwetiapina w stężeniu równym wartości IC_{50} ($6,08 \mu\text{mol/L}$) oraz $\frac{1}{2} IC_{50}$ ($3,04 \mu\text{mol/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm SD$, $n = 3$.



Wykres 15. Wykres *Hanesa-Wolfa*, przedstawiający stosunek początkowego stężenia substratu $[S]$ do prędkości reakcji v wykreślonej względem $[S]$. Promazyna w stężeniu równym wartości IC_{50} (0,186 μmol/L) oraz $\frac{1}{2} IC_{50}$ (0,093 μmol/L). Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm SD$, $n = 3$.

Tabela 38. Wyznaczone parametry kinetyczne reakcji enzymatycznych dla AChE i BuChE: stała Michaelisa (K_m), pozorna stała Michaelisa ($K_{m(i)}$) oraz szybkość maksymalna reakcji (V_{max}) i szybkość maksymalna po inhibicji donepezilem, rywastygminą w stężeniach równych IC_{50} ($V_{max(i)}$) oraz kwetiapiną, promazyną w stężeniach równych $\frac{1}{2} IC_{50}$ oraz IC_{50} ($V_{max(i)}$). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm SD$, $n = 3$.

	Wartości parametrów kinetycznych AChE	Wartości parametrów kinetycznych BuChE
Donepezil (w stężeniu odpowiadającym IC_{50})		
K_m [$\mu\text{mol/mL}$]	$0,084 \pm 0,018$	$0,0853 \pm 0,007$
$K_{m(i)}$ [$\mu\text{mol/mL}$]	$0,180 \pm 0,054$ (\uparrow)	$0,1497 \pm 0,009$ (\uparrow)
V_{max} [A/min]	$0,247 \pm 0,019$	$0,2452 \pm 0,069$
$V_{max(i)}$ [A/min]	$0,125 \pm 0,027$ (\downarrow)	$0,0985 \pm 0,033$ (\downarrow)
Rywastygmina (w stężeniu odpowiadającym IC_{50})		
K_m [$\mu\text{mol/mL}$]	$0,099 \pm 0,060$	$0,066 \pm 0,015$
$K_{m(i)}$ [$\mu\text{mol/mL}$]	$0,200 \pm 0,084$ (\uparrow)	$0,062 \pm 0,030$ (b.z.)
V_{max} [A/min]	$0,277 \pm 0,022$	$0,236 \pm 0,023$
$V_{max(i)}$ [A/min]	$0,120 \pm 0,023$ (\downarrow)	$0,122 \pm 0,003$ (\downarrow)
Promazyna (w stężeniu odpowiadającym IC_{50})		
K_m [$\mu\text{mol/mL}$]	n.d.	$0,110 \pm 0,013$
$K_{m(i)}$ [$\mu\text{mol/mL}$]	n.d.	$0,600 \pm 0,224$ (\uparrow)
V_{max} [A/min]	n.d.	$0,234 \pm 0,012$
$V_{max(i)}$ [A/min]	n.d.	$0,144 \pm 0,036$ (\downarrow)
Promazyna (w stężeniu odpowiadającym $\frac{1}{2} IC_{50}$)		
K_m [$\mu\text{mol/mL}$]	n.d.	$0,106 \pm 0,031$
$K_{m(i)}$ [$\mu\text{mol/mL}$]	n.d.	$0,465 \pm 0,170$ (\uparrow)
V_{max} [A/min]	n.d.	$0,251 \pm 0,021$
$V_{max(i)}$ [A/min]	n.d.	$0,192 \pm 0,059$ (\downarrow)
Kwetiapina (w stężeniu odpowiadającym IC_{50})		
K_m [$\mu\text{mol/mL}$]	n.d.	$0,077 \pm 0,004$
$K_{m(i)}$ [$\mu\text{mol/mL}$]	n.d.	$0,097 \pm 0,033$ (\uparrow)
V_{max} [A/min]	n.d.	$0,169 \pm 0,046$
$V_{max(i)}$ [A/min]	n.d.	$0,138 \pm 0,058$ (\downarrow)
Kwetiapina (w stężeniu odpowiadającym $\frac{1}{2} IC_{50}$)		
K_m [$\mu\text{mol/mL}$]	n.d.	$0,106 \pm 0,031$
$K_{m(i)}$ [$\mu\text{mol/mL}$]	n.d.	$0,100 \pm 0,017$ b.z.
V_{max} [A/min]	n.d.	$0,251 \pm 0,021$
$V_{max(i)}$ [A/min]	n.d.	$0,239 \pm 0,026$ b.z.

n.d. (not determined) – nie określono (niewystarczające hamowanie AChE do określenia wartości IC_{50}).

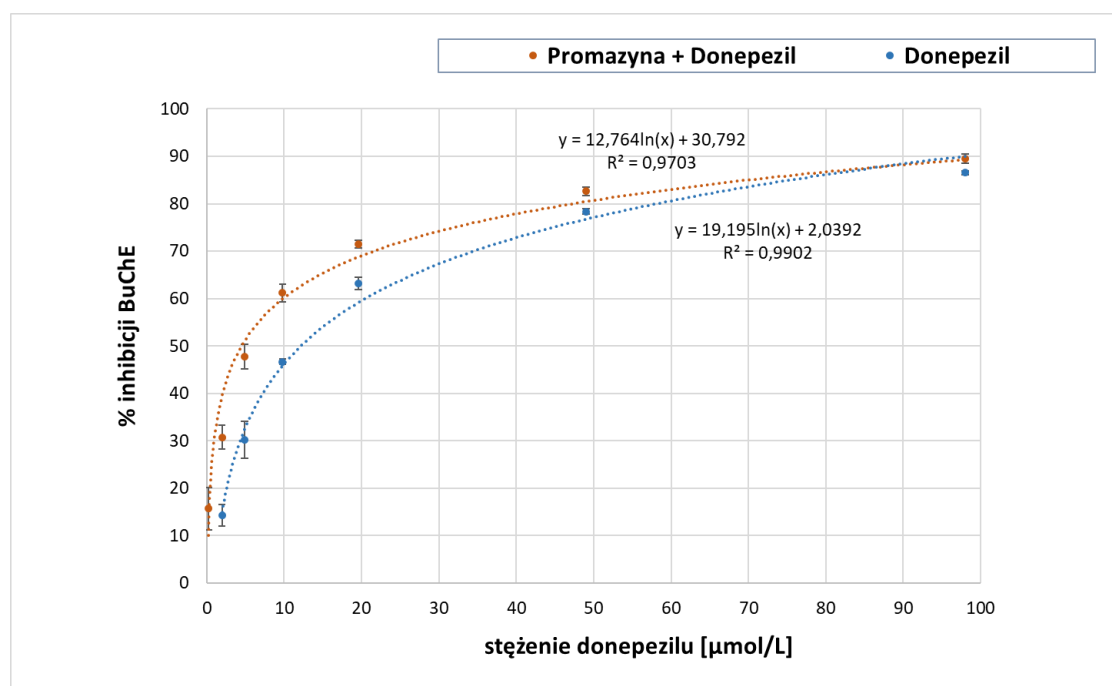
12.3 Wyznaczenie synergizmu działania leków

W kolejnych etapach badań, oceniono potencjalny synergizm działania leków przeciwpsychotycznych oraz wzorcowych inhibitorów cholinoesteraz (ChEI) – donepezilu i rywastygminy. W tym celu wykonano pomiary aktywności enzymów w obecności wzorcowego inhibitora oraz z użyciem mieszanin binarnych, a następnie wyznaczano wartości IC_{50} dla inhibitora AChE lub BuChE oraz mieszaniny związków. Mieszaninę binarną stanowiło połączenie inhibitora (donepezilu lub rywastygminy) użytego w zmiennych stężeniach ze stałym stężeniem danego leku przeciwpsychotycznego, które odpowiadało wartości TPC_{max} , ustalonej w oparciu o dane literaturowe. Stężenia inhibitorów użytych do badań były takie same zarówno w testach dla mieszaniny związków jak i dla prób z samym inhibitorem - dla donepezilu stosowano stężenia z zakresu 0,1 – 100 nmol/L do oceny aktywności AChE i 0,2 – 100 μ mol/L w przypadku BuChE, natomiast dla rywastygminy odpowiednio: 5 – 100 μ mol/L (AChE) oraz 0,05 – 5 μ mol/L (BuChE). Jak przedstawiono w Tabeli 39, badane leki przeciwpsychotyczne w większości przypadków zwiększają potencjał hamujący donepezilu względem BuChE. Wyjątek stanowią haloperidol i penfluridol, które nie wykazały istotnego statystycznie wpływu na BuChE. Najsilniejszy synergizm z donepezilem wykazała promazyna (Wykres 16), obniżając IC_{50} dla BuChE o 64,8% (IC_{50} mieszaniny: $4,51 \pm 0,19 \mu\text{mol/L}$) w odniesieniu do samego donepezilu (IC_{50} : $12,81 \pm 1,52 \mu\text{mol/L}$), $p < 0,05$. Bromperidol (Wykres 17), benperidol (Wykres 18), pimozyd (Wykres 19) i kwetiapina (Wykres 20) zmniejszyły IC_{50} mieszaniny binarnej względem wartości IC_{50} dla czystego donepezilu o 43,8 – 57,9% ($p < 0,05$). Badane leki przeciwpsychotyczne nie wpłynęły statystycznie istotnie na zmianę IC_{50} mieszaniny binarnej w porównaniu z czystym donepezilem dla AChE.

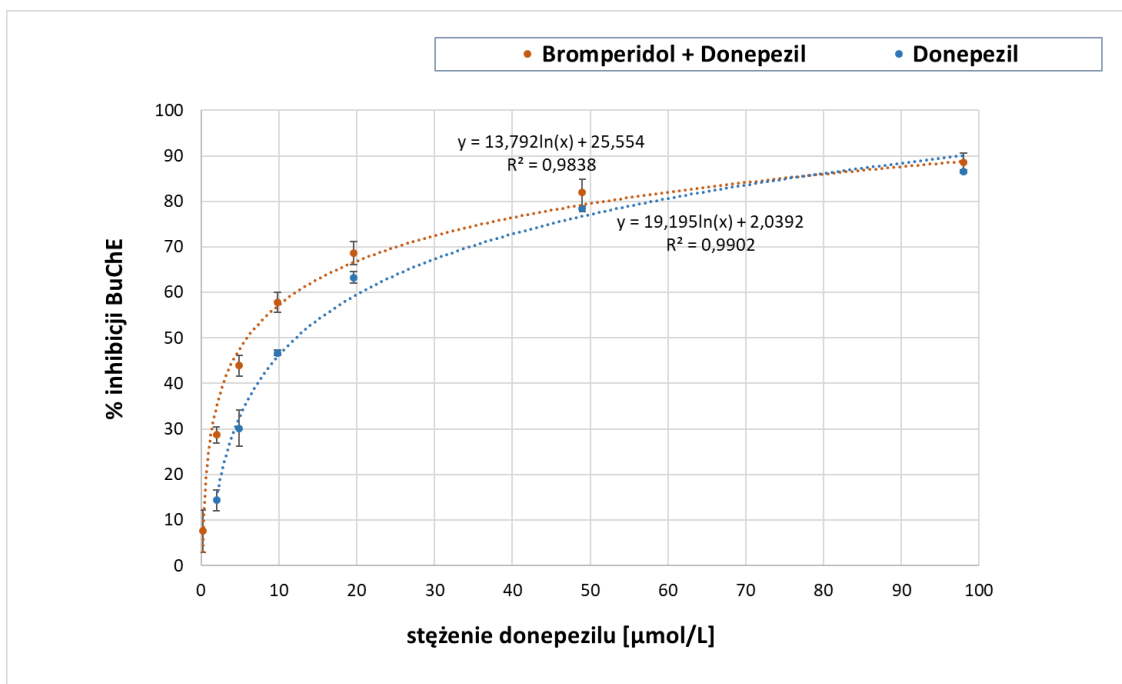
Tabela 39. Wpływ leków przeciwpsychotycznych na siłę hamowania aktywności AChE i BuChE przez donepezil.

Donepezil				
	IC ₅₀ AChE		IC ₅₀ BuChE	
Donepezil	25,58 ± 4,56 [nmol/L]		12,81 ± 1,52 [μmol/L]	
	IC ₅₀ binarnej mieszaniny [nmol/L]	Efekt	IC ₅₀ binarnej mieszaniny [μmol/L]	Efekt
Haloperidol (0,07 μmol/L)	25,08 ± 2,44	-	7,85 ± 0,53	↓ 38,7%
Bromperidol (0,06 μmol/L)	24,33 ± 1,43	↓ 4,9%	5,88 ± 0,49 *	↓ 54,1%
Benperidol (0,03 μmol/L)	28,66 ± 0,17	↑ 12,1%	5,39 ± 0,41 *	↓ 57,9%
Penfluridol (0,05 μmol/L)	25,37 ± 0,47	-	11,56 ± 0,86	↓ 9,8%
Pimozyd (0,03 μmol/L)	20,74 ± 2,26	↓ 18,9%	7,19 ± 0,19 *	↓ 43,8%
Kwetiapina (0,91 μmol/L)	34,32 ± 1,78	↑ 34,2%	6,18 ± 0,12 *	↓ 51,8%
Promazyna (0,15 μmol/L)	29,90 ± 2,24	↑ 16,9%	4,51 ± 0,19 *	↓ 64,8%

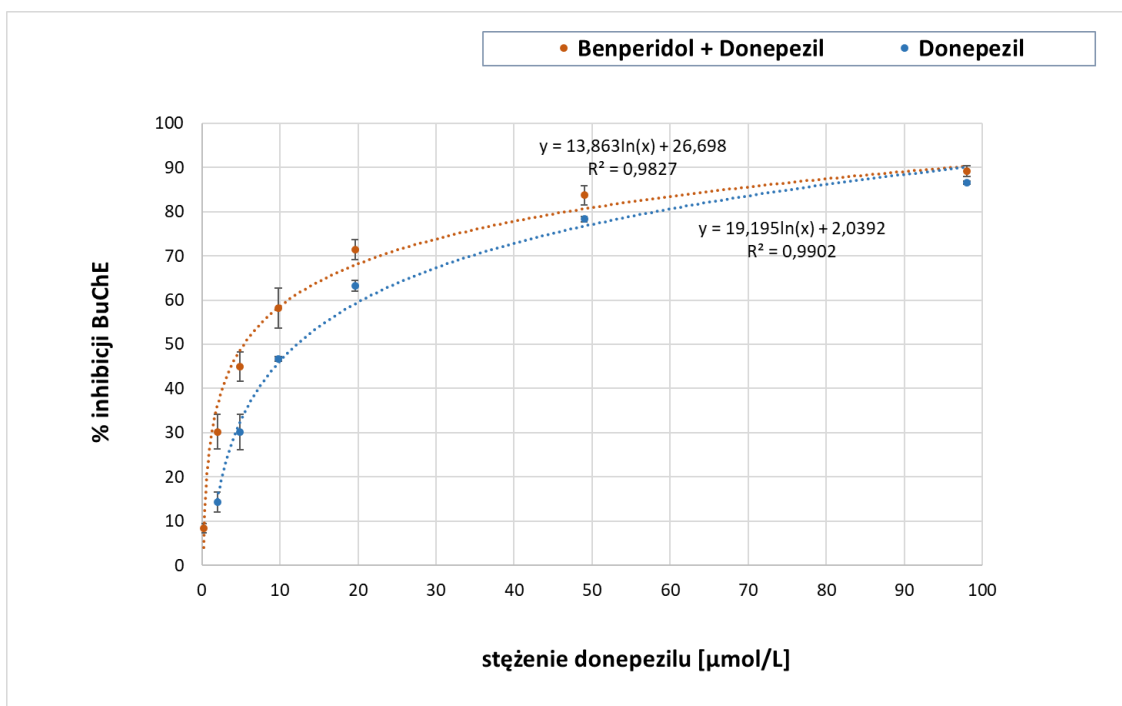
Leki przeciwpsychotyczne zastosowano w stężeniach odpowiadających TPC_{max}: haloperidol (50 μg/L), bromperidol (25 μg/L), benperidol (10 μg/L), penfluridol (25 μg/L), pimozyd (25 μg/L), kwetiapina (400 μg/L), promazyna (450 μg/L). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± SD, n = 6 – 9. Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie p < 0,05 wobec wartości IC₅₀ wyznaczonej dla samego donepezilu.



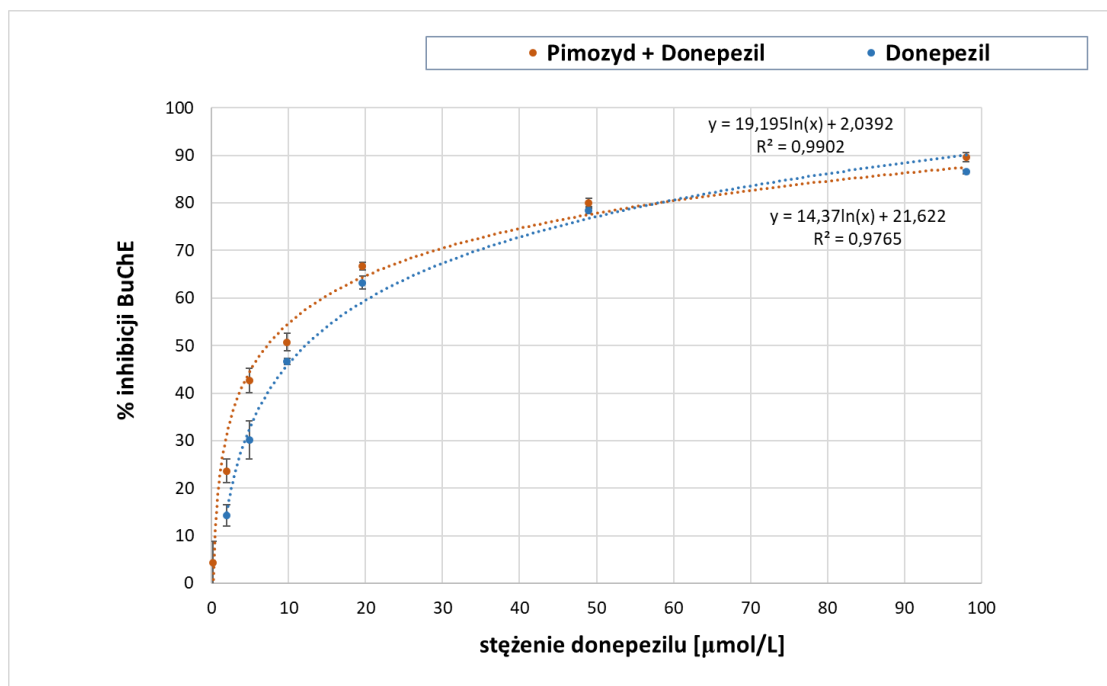
Wykres 16. Wpływ promazyny w stężeniu TPC_{max} (0,15 μmol/L; 450 μg/L) na siłę hamowania aktywności BuChE przez donepezil w zakresie stężeń 1,96 – 98 μmol/L. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± SD, n = 6 – 9. Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie p < 0,05 wobec wartości IC₅₀ wyznaczonej dla samego donepezilu.



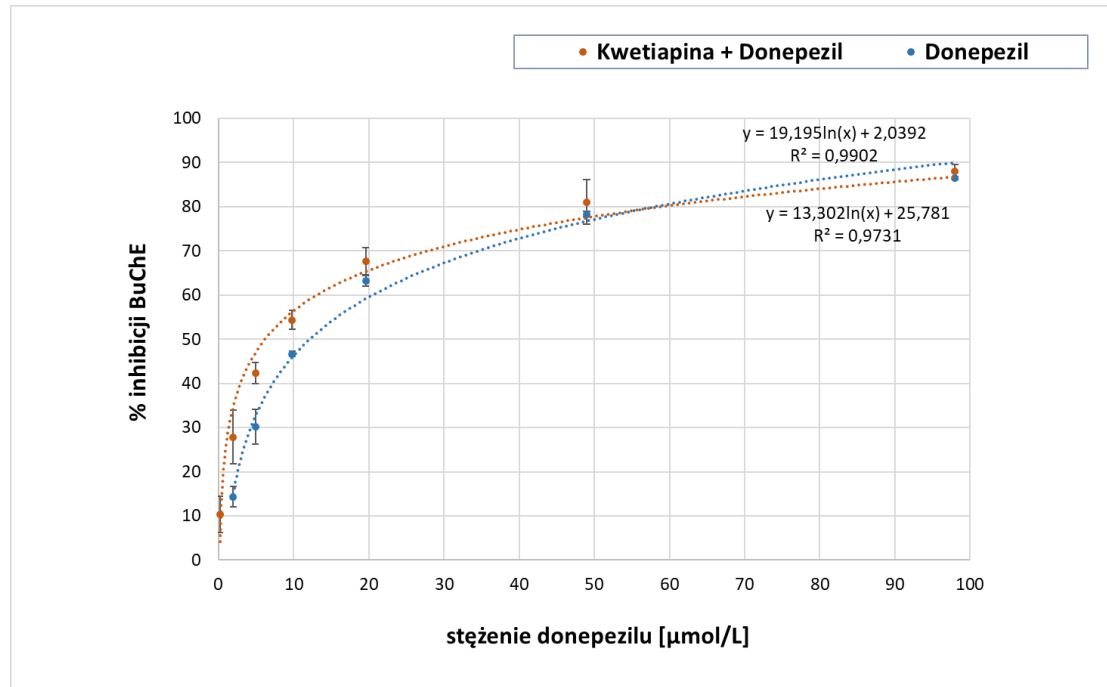
Wykres 17. Wpływ bromperidolu w stężeniu TPC_{max} ($0,06 \mu\text{mol/L}$; $25 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności BuChE przez donepezil w zakresie stężeń $1,96 - 98 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $n = 6 - 9$. Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samego donepezilu.



Wykres 18. Wpływ benperidolu w stężeniu TPC_{max} ($0,03 \mu\text{mol/L}$; $10 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności BuChE przez donepezil w zakresie stężeń $1,96 - 98 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $n = 6 - 9$. Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samego donepezilu.



Wykres 19. Wpływ pimozydu w stężeniu TPC_{max} ($0,03 \mu\text{mol/L}$; $25 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności BuChE przez donepezil w zakresie stężeń $1,96 - 98 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $n = 6 - 9$. Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samego donepezilu.



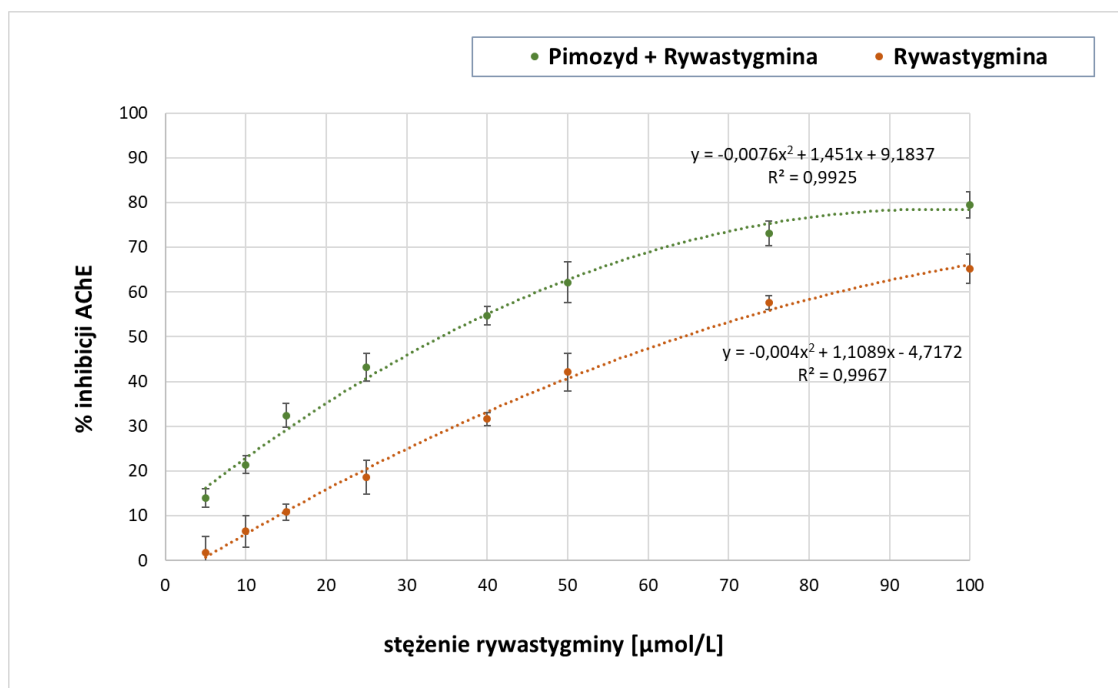
Wykres 20. Wpływ kwetiapiny w stężeniu TPC_{max} ($0,91 \mu\text{mol/L}$; $400 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności BuChE przez donepezil w zakresie stężeń $1,96 - 98 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $n = 6 - 9$. Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samego donepezilu.

W przypadku mieszanin binarnych z rywastygminą, dla których wyniki przedstawione są w Tabeli 40, największy wpływ na inhibicję AChE stwierdzono dla połączenia z pimozydem (Wykres 21) w porównaniu do samej rywastygminy (zmniejszenie IC_{50} o 51,0%, z $64,29 \pm 2,97 \mu\text{mol/L}$ do $32,81 \pm 2,99 \mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$). Kolejnymi związkami, które statystycznie istotnie obniżyły wartość IC_{50} rywastygminy wyznaczonej dla AChE są bromperidol (Wykres 22) i kwetiapina (Wykres 23), dla których wartości IC_{50} mieszanin binarnych wynosiły odpowiednio $33,26 \pm 1,39 \mu\text{mol/L}$ (spadek o 48,3%, $p < 0,05$) oraz $34,75 \pm 2,16 \mu\text{mol/L}$ (spadek o 45,9%, $p < 0,05$). Benperidol (Wykres 24) oraz promazyna (Wykres 25) zmniejszyły wartość IC_{50} mieszanin binarnych w stosunku do czystej rywastygminy wyznaczonej dla AChE ($64,29 \mu\text{mol/L}$) o odpowiednio 38,2% (IC_{50} mieszaniny $39,70 \pm 0,24 \mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$), 31,2% (IC_{50} mieszaniny $44,20 \pm 3,46 \mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$). W mieszaninie binarnej dodatek haloperidolu stosunkowo najslabiej obniżał wartość IC_{50} w stosunku do czystej rywastygminy (Wykres 26), powodując zmniejszenie tej wartości o 22,6% (IC_{50} mieszaniny $49,79 \pm 2,37 \mu\text{mol/L}$ w odniesieniu do samej rywastygminy $64,29 \pm 2,97 \mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$). Jedynym związkiem, który nie wpłynął na zmianę wartości IC_{50} w połączeniu z rywastygminą był penfluridol. Dla hamowania aktywności BuChE statystycznie istotne działanie wykazały mieszaniny binarne penfluridolu (Wykres 27) oraz promazyny (Wykres 28). Substancje te, w mieszaninie binarnej wykazały, w zależności od użytego stężenia inhibitora wzorcowego (rywastygminy), działanie addytywne (dla niskich stężeń rywastygminy) lub w wyższych zakresach stężeń - działanie antagonistyczne. W obu jednak przypadkach zaobserwowano statystycznie istotne zwiększenie wartości IC_{50} wyznaczonych w mieszaninach binarnych tych związków w porównaniu do IC_{50} czystej rywastygminy (IC_{50} $0,95 \pm 0,09 \mu\text{mol/L}$) odpowiednio o 23,7% ($1,18 \pm 0,07 \mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$) i 30,0% ($1,24 \pm 0,04 \mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$).

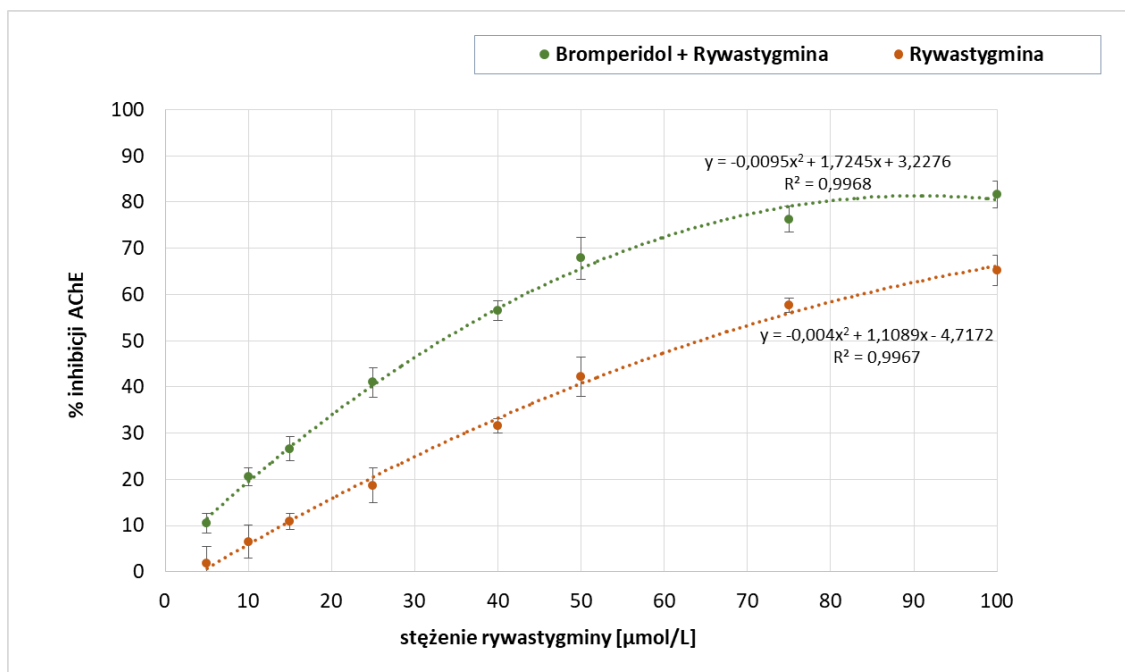
Tabela 40. Wpływ leków przeciwpsychotycznych na siłę hamowania aktywności AChE i BuChE przez rywastygminę.

Rywastygmina				
	IC ₅₀ AChE		IC ₅₀ BuChE	
Rywastygmina	64,29 ± 2,97 [µmol/L]		0,95 ± 0,09 [µmol/L]	
	IC ₅₀ binarnej mieszaniny [µmol/L]	Efekt	IC ₅₀ binarnej mieszaniny [µmol/L]	Efekt
Haloperidol (0,07 µmol/L)	49,79 ± 2,37 *	↓ 22,6%	1,08 ± 0,08	↑ 13,6%
Bromperidol (0,06 µmol/L)	33,26 ± 1,39 *	↓ 48,3%	0,91 ± 0,03	-
Benperidol (0,03 µmol/L)	39,70 ± 0,24 *	↓ 38,2%	1,01 ± 0,09	↑ 5,6%
Penfluridol (0,05 µmol/L)	64,51 ± 2,74	-	1,18 ± 0,07 *	↑ 23,7%
Pimozyd (0,03 µmol/L)	32,81 ± 2,99 *	↓ 51,0%	0,76 ± 0,06	↓ 20,3%
Kwetiapina (0,91 µmol/L)	34,75 ± 2,16 *	↓ 45,9%	1,01 ± 0,07	↑ 6,4%
Promazyna (0,15 µmol/L)	44,20 ± 3,46 *	↓ 31,2%	1,24 ± 0,04 *	↑ 30,0%

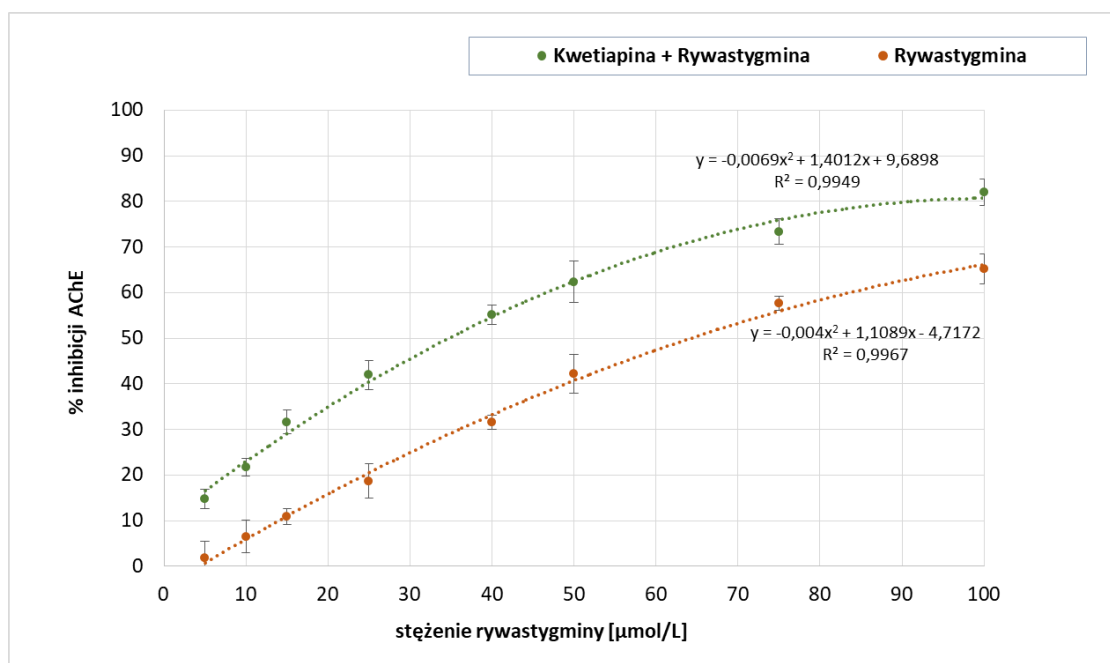
Leki przeciwpsychotyczne zastosowano w stężeniach odpowiadających TPC_{max}: haloperidol (50 µg/L), bromperidol (25 µg/L), benperidol (10 µg/L), penfluridol (25 µg/L), pimozyd (25 µg/L), kwetiapina (400 µg/L), promazyna (450 µg/L). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± SD, n = 6 – 9; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie p < 0,05 wobec wartości IC₅₀ wyznaczonej dla samej rywastygminy.



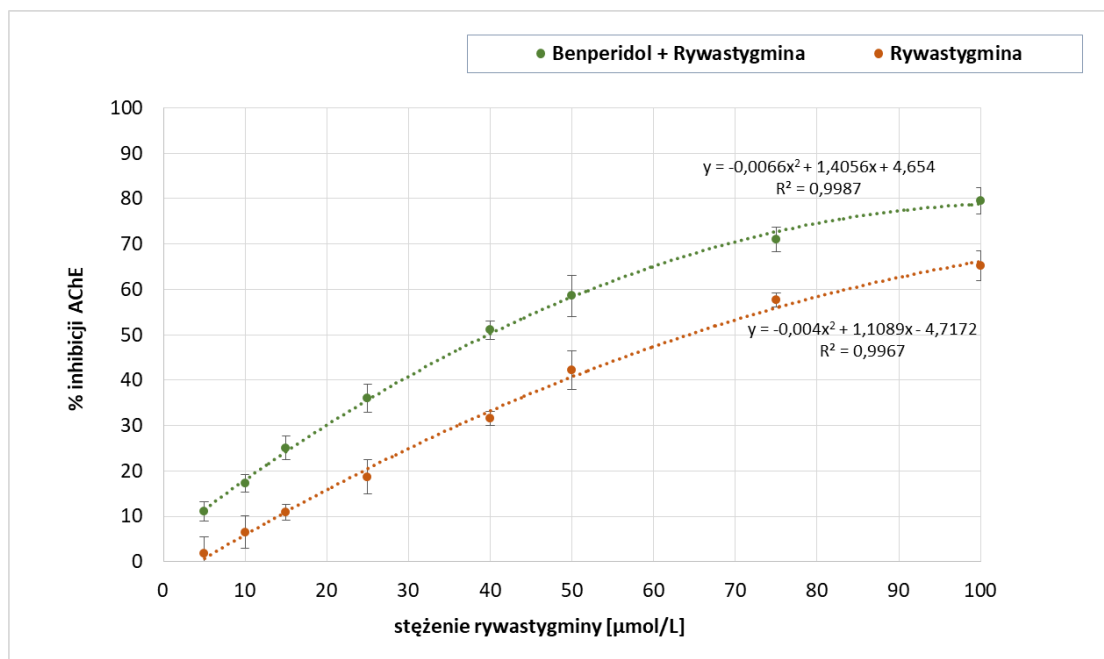
Wykres 21. Wpływ pimozydu w stężeniu TPC_{max} (0,03 µmol/L; 25 µg/L) na siłę hamowania aktywności AChE przez rywastygminę w zakresie stężeń 5 – 100 µmol/L. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± SD, n = 6 – 9; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie p < 0,05 wobec wartości IC₅₀ wyznaczonej dla samej rywastygminy.



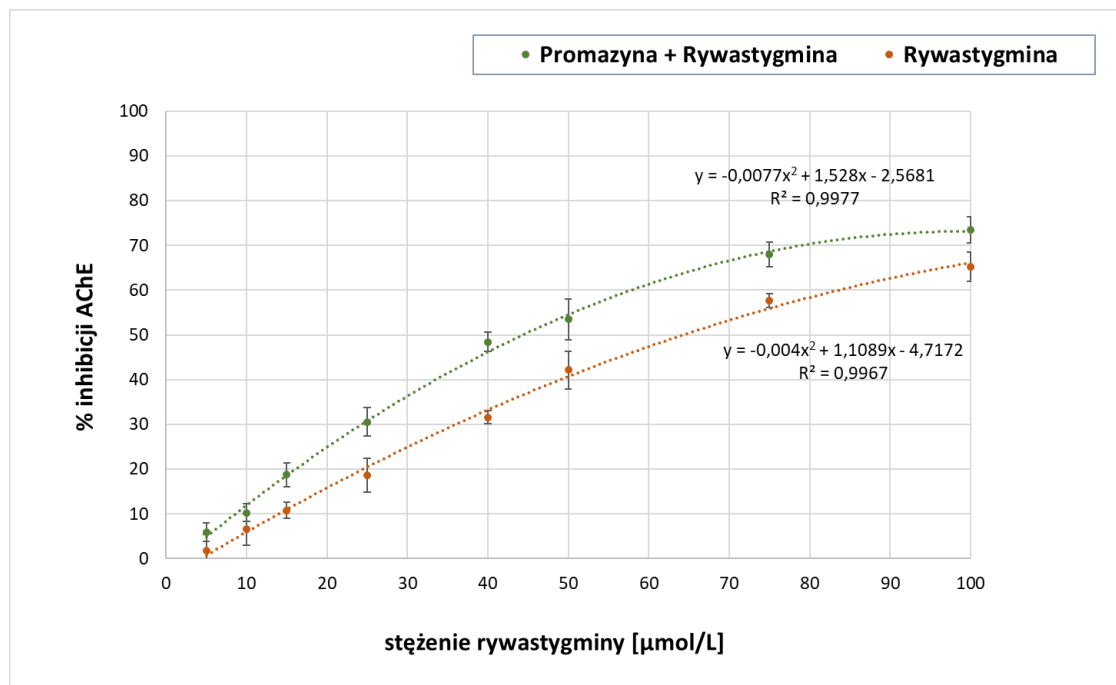
Wykres 22. Wpływ bromperidolu w stężeniu TPC_{max} ($0,06 \mu\text{mol/L}$; $25 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności AChE przez rywastygminę w zakresie stężeń $5 - 100 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $n = 6 - 9$; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samej rywastygminy.



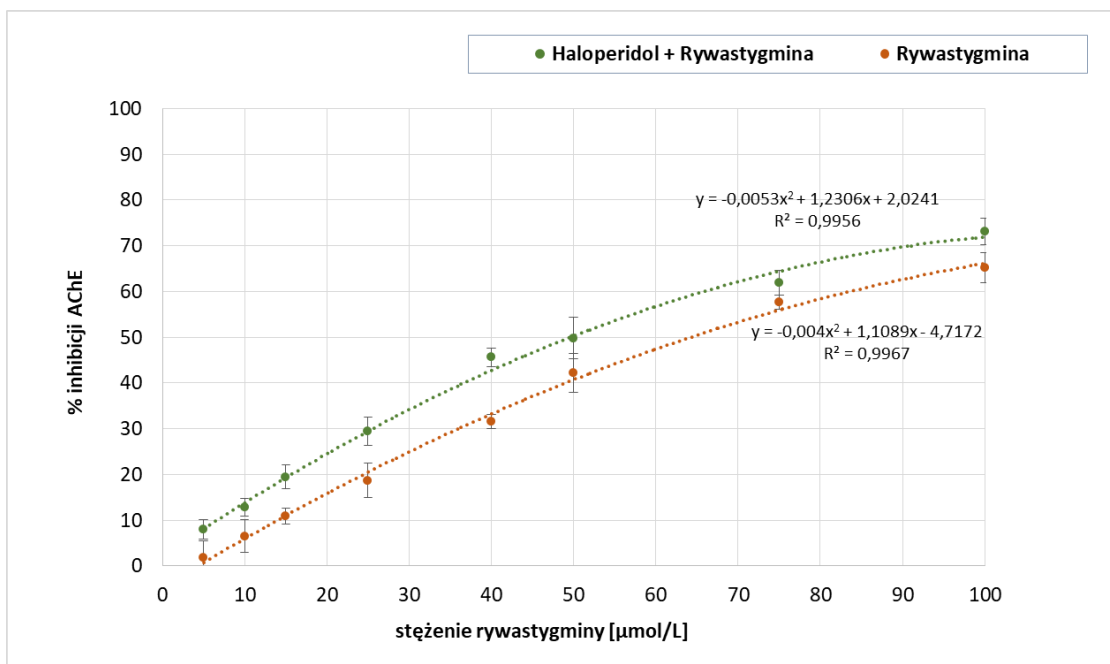
Wykres 23. Wpływ kwetiapiny w stężeniu TPC_{max} ($0,91 \mu\text{mol/L}$; $400 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności AChE przez rywastygminę w zakresie stężeń $5 - 100 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $n = 6 - 9$; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samej rywastygminy.



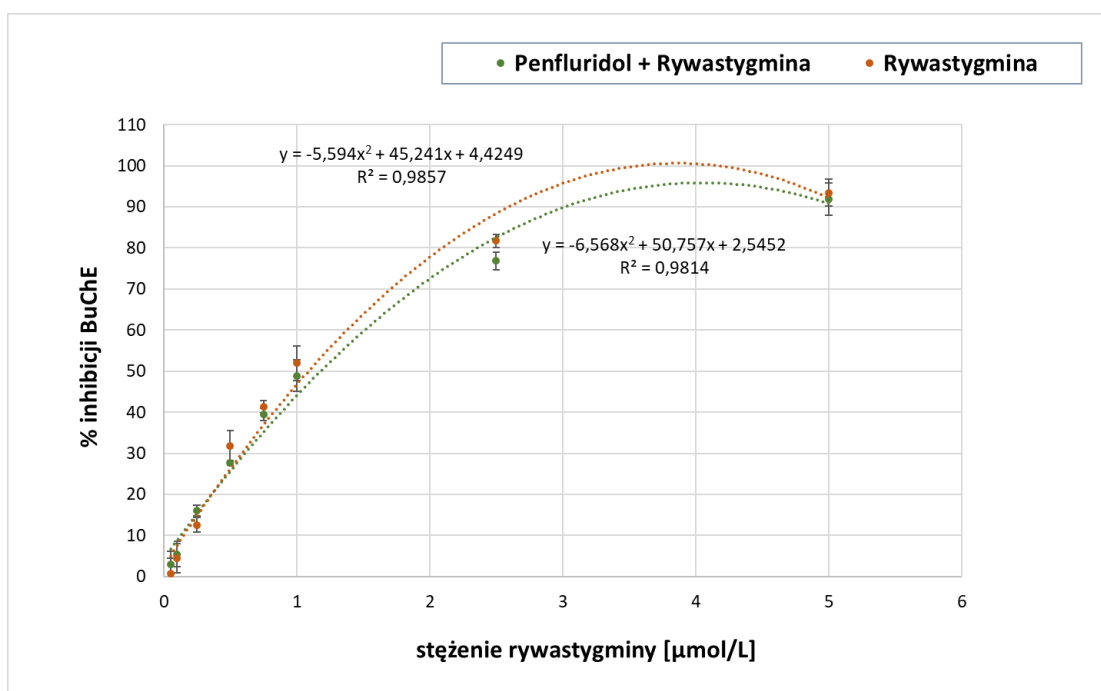
Wykres 24. Wpływ benperidolu w stężeniu TPC_{max} ($0,03 \mu\text{mol/L}$; $10 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności AChE przez rywastygminę w zakresie stężeń $5 - 100 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $n = 6 - 9$; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samej rywastygminy.



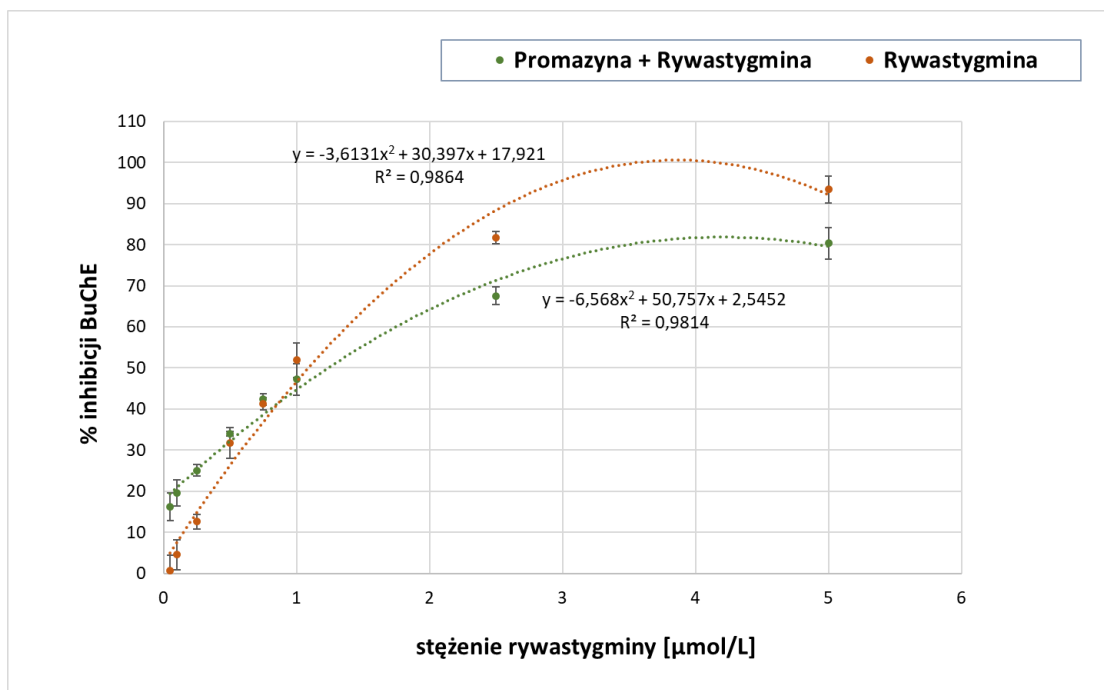
Wykres 25. Wpływ promazyny w stężeniu TPC_{max} ($0,15 \mu\text{mol/L}$; $450 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności AChE przez rywastygminę w zakresie stężeń $5 - 100 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $n = 6 - 9$; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samej rywastygminy.



Wykres 26. Wpływ haloperidolu w stężeniu TPC_{max} ($0,07 \mu\text{mol/L}$; $50 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności AChE przez rywastygminę w zakresie stężeń $5 - 100 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $n = 6 - 9$; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samej rywastygminy.



Wykres 27. Wpływ penfluridolu w stężeniu TPC_{max} ($0,05 \mu\text{mol/L}$; $25 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności BuChE przez rywastygminę w zakresie stężeń $0,05 - 5 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $n = 6 - 9$; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samej rywastygminy.



Wykres 28. Wpływ promazyny w stężeniu TPC_{max} ($0,15 \mu\text{mol/L}$; $450 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności BuChE przez rywastygminę w zakresie stężeń $0,05 - 5 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $n = 6 - 9$; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samej rywastygminy.

12.4 Ocena interakcji mieszaniny binarnej z użyciem programu ComboSyn

Otrzymane w badaniu doświadczalnym wyniki inhibicji aktywności ChEs poprzez zastosowanie binarnej mieszaniny leków zostały również zweryfikowane przy użyciu oprogramowania ComboSyn. Program ten pozwala na analizę interakcji związków zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* [217]. W 1983 roku, Chou i Talalay, na podstawie swoich badań i przeprowadzonych analiz matematycznych, wprowadzili termin „wskaźnik kombinacji” (CI) do ilościowego określenia synergizmu lub antagonizmu działania leków stosowanych łącznie. Zgodnie z zaproponowaną przez autorów interpretacją, wartość wskaźnika CI <1 , $=1$ i >1 wskazuje odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm. Istnieje możliwość zastosowania kombinacji dwóch substancji w stałych stosunkach stężeń lub też można badać mieszaniny leków, gdzie stężenie jednego związku jest stałe, natomiast stężenie drugiej substancji jest zmienne [217]. Dane otrzymane z eksperymentalnego badania potencjalnego synergizmu leków przeciwpsychotycznych z donepezilem

i rywastygminą posłużyły do wykonania analizy matematycznej w programie ComboSyn. Stężenia leków przeciwpsychotycznych były stałe i odpowiadały ich TPC_{max} , natomiast zastosowane stężenia donepezilu były w zakresie 0,1 – 100 nmol/L do oceny aktywności AChE i 2 – 100 $\mu\text{mol/L}$ w przypadku BuChE, zakres stężeń rywastygminy wynosił odpowiednio: 5 – 100 $\mu\text{mol/L}$ (AChE) oraz 0,05 – 5 $\mu\text{mol/L}$ (BuChE), co zaprezentowane jest w Tabelach 41-43 wraz z obliczonymi przez program wartościami CI. Graficzną prezentacją otrzymanych wyników są Wykresy 29-32.

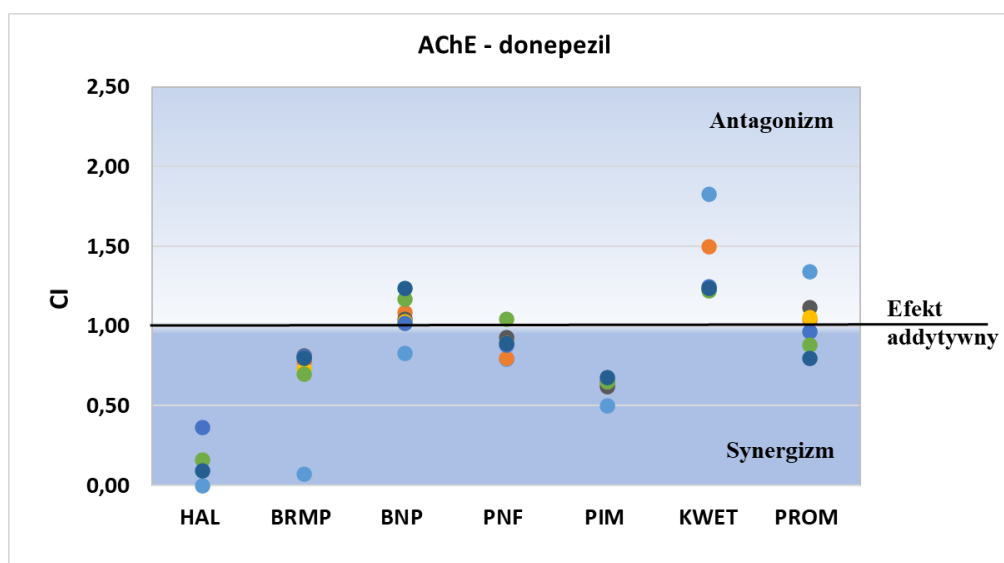
Wyniki analizy przeprowadzone dla mieszanin leków przeciwpsychotycznych z donepezilem (0,1 – 100 nmol/L) względem AChE (Tabela 41, Wykres 29) potwierdziły synergistyczne działanie bromperidolu i pimozydu, ponieważ wartości CI były < 1 , zarówno dla mieszanin donepezilu z bromperidolem oraz pimozydem. W badaniach eksperymentalnych IC_{50} mieszaniny obniżyło się o odpowiednio 4,9% oraz 18,9%. Jednak w obu przypadkach można mówić jedynie o tendencji w działaniu, ponieważ wyniki te nie były istotne statystycznie. W przypadku zastosowania mieszaniny binarnej z kwetiapiną wykazano antagonistyczne działanie mieszaniny związków, ponieważ wartości CI ze wszystkimi badanymi stężeniami donepezilu były powyżej 1. Potwierdzeniem tego jest obserwowany w badaniach eksperymentalnych 34,2% wzrost wartości IC_{50} dla mieszaniny kwetiapiny z donepezilem w porównaniu z czystym donepezilem.

Ponadto, analiza Chou-Talalay wykazała, że rodzaj interakcji pomiędzy związkami może mieć działanie zmienne i zależne od stężenia inhibitora wzorcowego. Przykładem jest mieszanina donepezilu z promazyną, dla której przy niższych stężeniach donepezilu w mieszaninie (0,005 – 0,025 $\mu\text{mol/L}$) obserwuje się efekt antagonistyczny ($CI > 1$) w przypadku inhibicji AChE, podczas gdy w wyższym zakresie stężeń donepezilu (0,05 – 0,1 $\mu\text{mol/L}$) efekt ten jest zmniejszony, a nawet przy najwyższych stężeniach można zaobserwować synergizm ($CI < 1$).

Tabela 41. Analiza potencjalnych interakcji między donepezilem i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi względem AChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm.

AChE	Wartości CI dla badanych leków przeciwpsychotycznych						
Stężenie donepezilu [$\mu\text{mol/L}$]	HAL [0,07 $\mu\text{mol/L}$]	BRMP [0,06 $\mu\text{mol/L}$]	BNP [0,03 $\mu\text{mol/L}$]	PNF [0,05 $\mu\text{mol/L}$]	PIM [0,03 $\mu\text{mol/L}$]	KWET [0,91 $\mu\text{mol/L}$]	PROM [0,15 $\mu\text{mol/L}$]
0,005	> 2,50	0,07	0,83	0,79	0,50	1,83	1,34
0,01	> 2,50	0,78	1,09	0,80	0,63	1,50	1,04
0,02	> 2,50	0,81	1,04	0,93	0,62	1,23	1,12
0,025	> 2,50	0,73	1,03	0,90	0,65	1,24	1,06
0,05	0,37	0,81	1,02	0,89	0,65	1,25	0,97
0,075	0,16	0,70	1,17	1,05	0,66	1,22	0,88
0,1	0,09	0,80	1,24	0,90	0,68	1,24	0,80

HAL-haloperidol; BRMP-bromperidol; BNP-benperidol; PNF-penfluridol; PIM-pimozyd; KWET-kwetiapina; PROM-promazyna



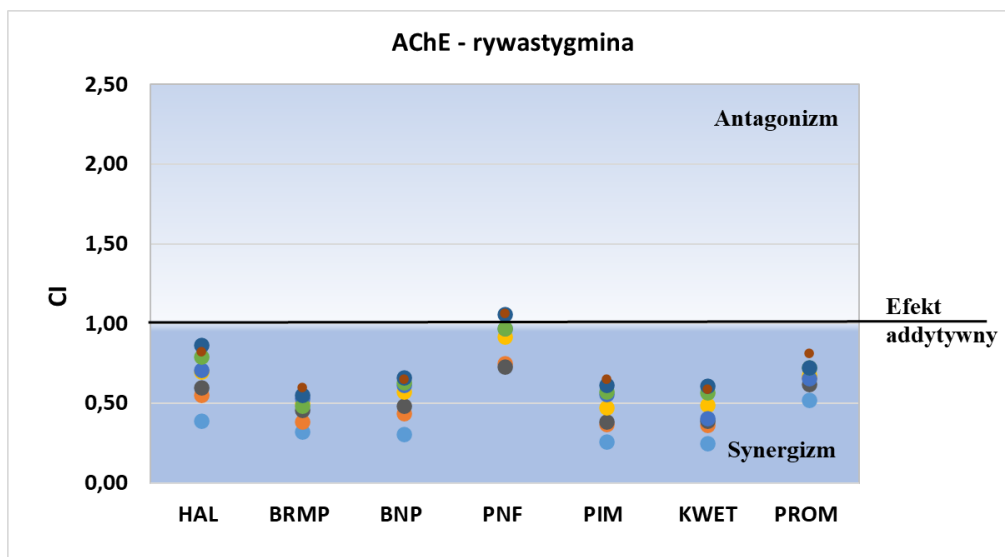
Wykres 29. Analiza graficzna potencjalnych interakcji między donepezilem i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi, względem AChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm. Wyniki przedstawiono jako wartości CI wyznaczone za pomocą oprogramowania ComboSyn dla mieszanin binarnych o zmiennym stężeniu donepezilu (5 – 100 $\mu\text{mol/L}$) oraz stałym TPC_{max} .

Wyniki analizy przeprowadzone dla mieszanin leków przeciwpsychotycznych z rywastygminą względem AChE (Tabela 42, Wykres 30) potwierdziły synergistyczne działanie wszystkich leków przeciwpsychotycznych, które w eksperymentalnym badaniu wykazały istotnie statystycznie ($p < 0.05$) obniżenie IC_{50} rywastygminy: haloperidolu, bromperidolu, benperidolu, pimozydu, kwetiapiny oraz promazyny. Wszystkie wartości CI dla tych związków są < 1 , natomiast wyniki badań eksperymentalnych wykazały obniżenie IC_{50} dla mieszanin binarnych względem samej rywastygminy o odpowiednio: 22,6%, 48,3%, 38,2%, 51,0%, 45,9% oraz 31,2% ($p < 0.05$).

Tabela 42. Analiza potencjalnych interakcji między rywastygminą i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi względem AChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm.

AChE	Wartości CI dla badanych leków przeciwpsychotycznych						
Stężenie rywastygminy [$\mu\text{mol/L}$]	HAL [0,07 $\mu\text{mol/L}$]	BRMP [0,06 $\mu\text{mol/L}$]	BNP [0,03 $\mu\text{mol/L}$]	PNF [0,05 $\mu\text{mol/L}$]	PIM [0,03 $\mu\text{mol/L}$]	KWET [0,91 $\mu\text{mol/L}$]	PROM [0,15 $\mu\text{mol/L}$]
5	0,39	0,32	0,31	> 2,50	0,26	0,25	0,52
10	0,55	0,38	0,44	0,75	0,37	0,37	0,66
15	0,60	0,46	0,48	0,73	0,38	0,39	0,62
25	0,70	0,50	0,57	0,92	0,47	0,49	0,68
40	0,71	0,53	0,62	0,97	0,56	0,40	0,66
50	0,79	0,49	0,63	0,97	0,57	0,57	0,72
75	0,86	0,55	0,66	1,06	0,62	0,61	0,72
100	0,82	0,60	0,65	1,06	0,65	0,59	0,81

HAL-haloperidol; BRMP-bromperidol; BNP-benperidol; PNF-penfluridol; PIM-pimozyd; KWET-kwetiapina; PROM-promazyna



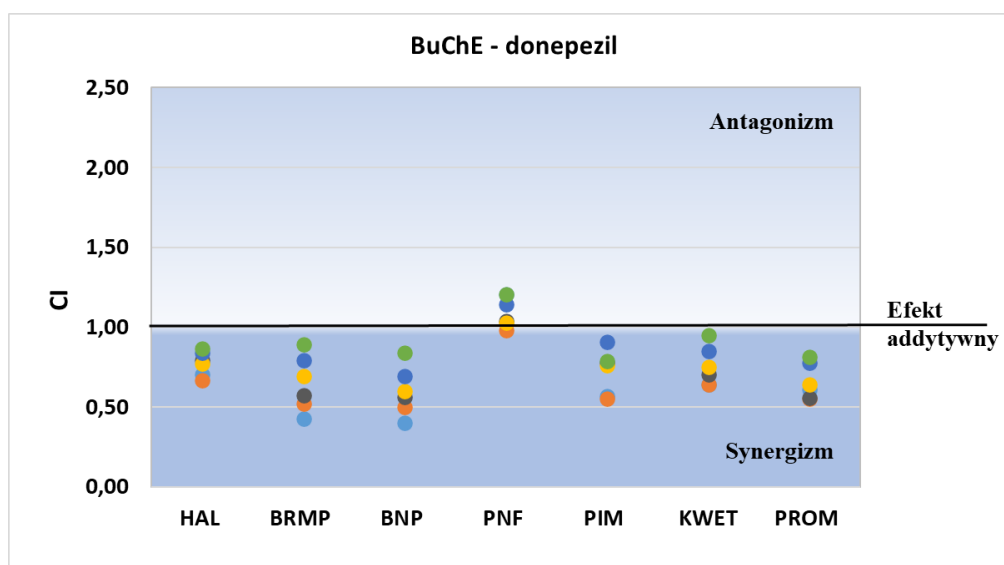
Wykres 30. Analiza graficzna potencjalnych interakcji między rywastygminą i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi, względem AChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm. Wyniki przedstawiono jako wartości CI wyznaczone za pomocą oprogramowania ComboSyn dla mieszanin binarnych o zmiennym stężeniu rywastygminy (5 – 100 $\mu\text{mol/L}$) oraz stałym TPC_{max} .

Wyniki analizy przeprowadzone dla mieszanin leków przeciwpsychotycznych z donepezilem względem BuChE (Tabela 43, Wykres 31) potwierdziły synergistyczne działanie bromperidolu, benperidolu, pimozydu, kwetiapiny, promazyny, które w eksperymentalnym badaniu wykazały istotne statystycznie ($p < 0.05$) obniżenie IC_{50} donepezilu odpowiednio o: 54,1%, 57,9%, 43,8%, 51,8%, 64,8% ($p < 0.05$). Dodatkowo na synergistyczne działanie w analizie Chou-Talalay wykazał również haloperidol, który w badaniu eksperymentalnym wykazał obniżenie IC_{50} donepezilu o 38,7%, jednak wynik ten nie jest statystycznie istotny.

Tabela 43. Analiza potencjalnych interakcji między donepezilem i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi względem BuChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm.

BuChE	Wartości CI dla badanych leków przeciwpsychotycznych						
Stężenie donepezilu [$\mu\text{mol/L}$]	HAL [0,07 $\mu\text{mol/L}$]	BRMP [0,06 $\mu\text{mol/L}$]	BNP [0,03 $\mu\text{mol/L}$]	PNF [0,05 $\mu\text{mol/L}$]	PIM [0,03 $\mu\text{mol/L}$]	KWET [0,91 $\mu\text{mol/L}$]	PROM [0,15 $\mu\text{mol/L}$]
1,96	0,71	0,43	0,40	1,21	0,57	0,64	0,61
4,9	0,67	0,52	0,50	0,98	0,55	0,64	0,56
9,8	0,79	0,57	0,57	1,04	0,78	0,71	0,56
19,6	0,77	0,70	0,60	1,03	0,76	0,75	0,64
49	0,84	0,79	0,69	1,14	0,91	0,85	0,78
98	0,87	0,89	0,84	1,21	0,79	0,95	0,81

HAL-haloperidol; BRMP-bromperidol; BNP-benperidol; PNF-penfluridol; PIM-pimozyd; KWET-kwetiapina; PROM-promazyna



Wykres 31. Analiza graficzna potencjalnych interakcji między donepezilem i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi, względem BuChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm. Wyniki przedstawiono jako wartości CI wyznaczone za pomocą oprogramowania ComboSyn dla mieszanin binarnych o zmiennym stężeniu donepezilu (2 – 100 $\mu\text{mol/L}$) oraz stałym TPC_{max} .

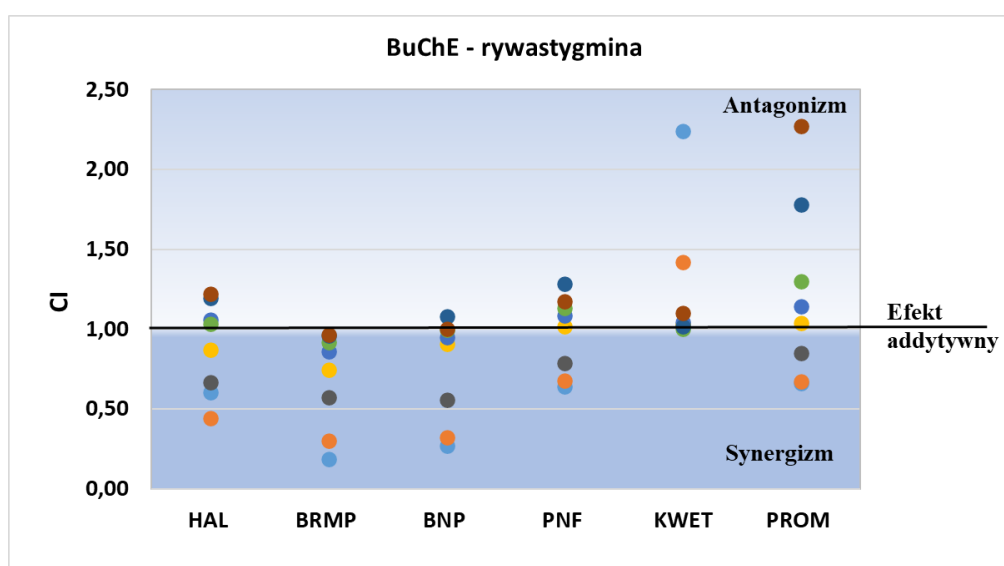
Tabela 44 oraz Wykres 32 przedstawiają wyniki analizy przeprowadzone dla mieszanin leków przeciwpsychotycznych z rywastygminą względem BuChE. Analiza Chou-Talalay wskazuje w przypadku niektórych substancji, np. bromperidolu, potencjał synergistyczny (wartości CI są < 1), jednak wartości IC_{50} mieszanin binarnych tych związków wyznaczone w badaniach empirycznych nie różniły się statystycznie istotnie w porównaniu z IC_{50} rywastygminy (Tabela 40). W przypadku penfluridolu i promazyny - związków dla których statystycznie istotnie wzrosła wartość IC_{50} dla mieszanin z rywastygminą, zaobserwowano wartości $CI > 1$ co potwierdza istnienie potencjału antagonistycznego mieszanin binarnych tych substancji.

Według przeprowadzonej analizy w programie ComboSyn, zróżnicowany wpływ na hamowanie BuChE ma mieszanina rywastygminy z haloperidolem ($CI < 1$ dla mieszaniny z rywastygminą w stężeniach 0,05- 0,5 $\mu\text{mol/L}$, natomiast dla 0,75 – 5 $\mu\text{mol/L}$ $CI > 1$), benperidolem ($CI < 1$ dla mieszaniny z rywastygminą w stężeniach 0,05- 0,75 $\mu\text{mol/L}$, natomiast dla 1 – 5 $\mu\text{mol/L}$ $CI > 1$), penfluridolem i promazyną (w obu przypadkach $CI < 1$ dla mieszaniny z rywastygminą w stężeniach 0,05- 0,25 $\mu\text{mol/L}$, natomiast dla 0,5 – 5 $\mu\text{mol/L}$ $CI > 1$), dla których wraz ze wzrostem stężenia rywastygminy zmienia się zależność z synergistycznej ($CI < 1$) na antagonistyczną ($CI > 1$). W badaniach eksperymentalnych, uzyskane wyniki nie były istotne statystycznie i wskazywały na zwiększenie IC_{50} tych mieszanin z rywastygminą o odpowiednio: 13,6%, 5,6%, 23,7%, 30,0%. Natomiast dla mieszaniny rywastygminy z pimozydem względem aktywności BuChE, wskaźnik kombinacji osiągnął wartości powyżej 2,50, co świadczy o potencjale antagonistycznym tych dwóch substancji. Jednak w badaniu eksperymentalnym nie wykazano statystycznie istotnej zmiany wartości IC_{50} .

Tabela 44. Analiza potencjalnych interakcji między rywastygminą i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi względem BuChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm.

BuChE	Wartości CI dla badanych leków przeciwpsychotycznych						
stężenie rywastygminy [$\mu\text{mol/L}$]	HAL [0,07 $\mu\text{mol/L}$]	BRMP [0,06 $\mu\text{mol/L}$]	BNP [0,03 $\mu\text{mol/L}$]	PNF [0,05 $\mu\text{mol/L}$]	PIM [0,03 $\mu\text{mol/L}$]	KWET [0,91 $\mu\text{mol/L}$]	PROM [0,15 $\mu\text{mol/L}$]
0,05	0,61	0,18	0,27	0,64	> 2,50	2,24	0,66
0,1	0,44	0,30	0,32	0,68	> 2,50	1,42	0,67
0,25	0,67	0,57	0,56	0,79	> 2,50	1,02	0,85
0,5	0,87	0,74	0,91	1,01	> 2,50	1,03	1,04
0,75	1,06	0,86	0,95	1,08	> 2,50	1,04	1,14
1	1,03	0,92	1,00	1,13	> 2,50	1,00	1,30
2,5	1,19	0,96	1,08	1,28	> 2,50	1,01	1,78
5	1,22	0,96	1,00	1,17	> 2,50	1,10	2,27

HAL-haloperidol; BRMP-bromperidol; BNP-benperidol; PNF-penfluridol; PIM-pimozyd; KWET-kwetiapina; PROM-promazyna



Wykres 32. Analiza graficzna potencjalnych interakcji między rywastygminą i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi, względem BuChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm. Wyniki przedstawiono jako wartości CI wyznaczone za pomocą oprogramowania ComboSyn dla mieszanin binarnych o zmiennym stężeniu rywastygminy (0,05 – 5 $\mu\text{mol/L}$) oraz stałym TPC_{max} .

12.5. Agregacja A β

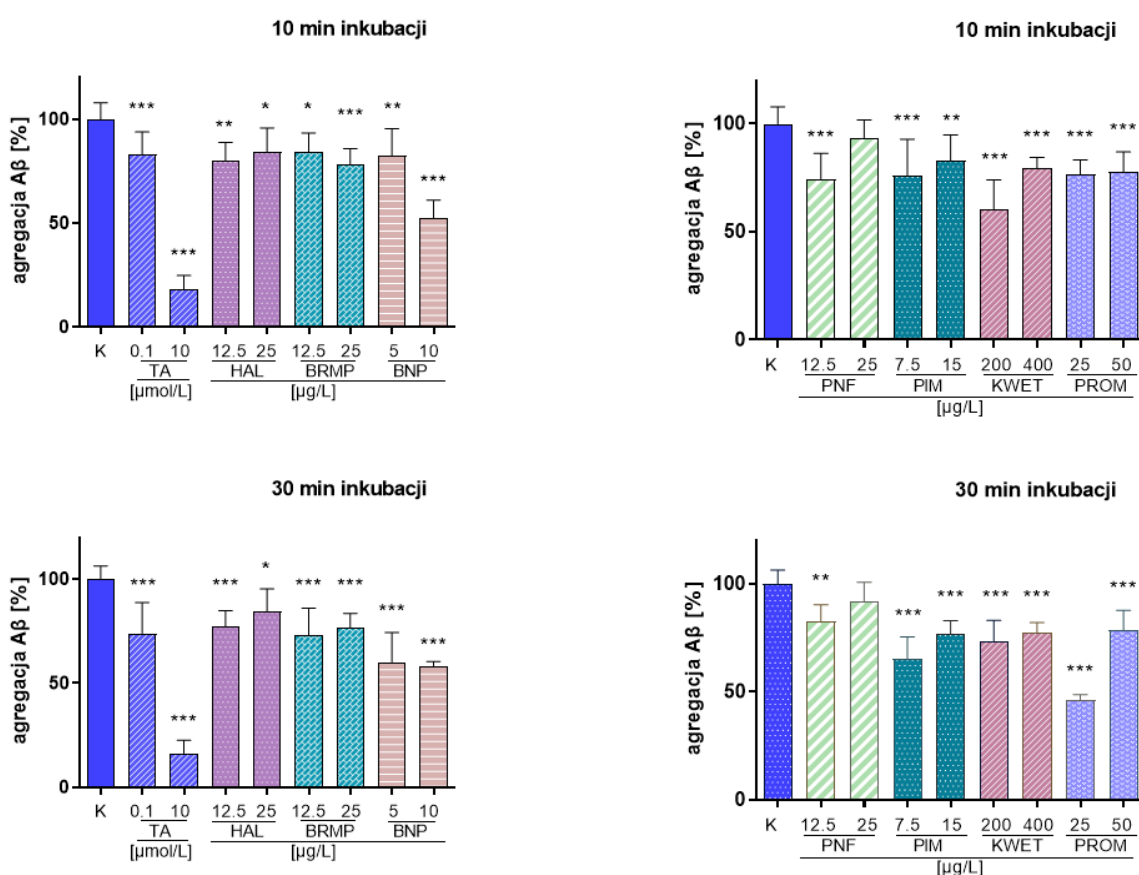
Wpływ leków przeciwpsychotycznych na proces agregacji A β , który stanowi podstawę kolejnej weryfikowanej hipotezy badawczej dotyczącej patogenezy AD, oceniono metodą fluorymetryczną wykorzystując właściwości fluorescencyjne barwnika tioflawiny (ThT). W warunkach *in vitro* ThT wiąże się specyficznie z powstającymi fibrylami amyloidu co powoduje wzrost intensywności mierzonego sygnału (długość fal ex/em 440/484 nm). W pierwszym etapie badań, w oparciu o dane literaturowe dobrano optymalne warunki przeprowadzenia analizy (pH, typ buforu, czas i temperatura inkubacji – Tabela 21. rozdział Materiały i Metody, strony 90-92), które w trakcie walidacji metody pozwoliły uzyskać zadawalające parametry współczynnika zmienności. Pomiary fluorescencji, po inkubacji A β z lekami przeciwpsychotycznymi zastosowanymi w stężeniach odpowiadających ich $\frac{1}{2}$ TPC_{max} oraz TPC_{max}, przeprowadzono w 6 punktach czasowych. Pierwsze cztery pomiary przeprowadzono w zakresie 10-90 min, ten etap wczesnej fazy agregacji jest efektem powstawania niewielkich form oligopeptydowych. Dwa kolejne pomiary przeprowadzono po 24 i 48 godzinach, co odzwierciedla późną fazę agregacji A β związaną z powstawaniem znacznie większych, uporządkowanych struktur fibrylarnych. Jako wzorcową substancję hamującą agregację A β zastosowano TA w dwóch stężeniach (0,1 i 10 μ mol/L). Wyniki przedstawiono jako procent agregacji A β (Wykresy 33-34), przyjmując za 100%, w danym punkcie czasowym, średnią wartość fluorescencji zmierzoną dla prób kontrolnych, jak również wyznaczono % inhibicji tworzenia agregatów A β przez badane związki w odniesieniu do kontroli (Tabela 45).

Tabela 45. Wyznaczony procent inhibicji tworzenia agregatów A β przez badane leki przeciwpsychotyczne w stężeniach $\frac{1}{2}$ TPC_{max} i TPC_{max}. Jako wzorcowy inhibitor agregacji A β zastosowano TA w stężeniu 0,1 μ mol/L i 10 μ mol/L (odpowiednio 170,12 μ g/L i 17012 μ g/L). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia \pm SD, n = 9. Wartości statystycznie istotne na poziomie *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 w odniesieniu do kontroli (K), którą stanowił roztwór A β 42.

Średni % inhibicji wyznaczony w kolejnych punktach czasowych [%]						
Związek	10 min	30 min	60 min	90 min	24 h	48 h
TA 0,1 [μ mol/L]	17,17 \pm 3,91 ***	26,06 \pm 3,51 ***	51,25 \pm 3,89 ***	26,69 \pm 4,07 ***	9,50 \pm 6,70	39,81 \pm 7,26 ***
TA 10 [μ mol/L]	81,95 \pm 3,48 ***	83,74 \pm 3,23 ***	84,63 \pm 3,37 ***	84,20 \pm 3,49 ***	90,02 \pm 5,72 ***	92,54 \pm 6,00 ***
HAL [12,5 μ g/L]	20,30 \pm 5,12 **	22,58 \pm 4,01 ***	16,23 \pm 4,92 *	11,31 \pm 4,23	-2,18 \pm 7,52	16,80 \pm 8,48
HAL [25 μ g/L]	15,87 \pm 4,78 *	15,43 \pm 4,43 *	9,18 \pm 4,36	10,39 \pm 4,42	14,17 \pm 7,53	23,03 \pm 7,82 **
BRMP [12,5 μ g/L]	15,63 \pm 4,78 *	26,88 \pm 4,43 ***	55,63 \pm 4,60 ***	19,00 \pm 4,97 **	14,31 \pm 7,06	51,18 \pm 9,49 ***
BRMP [25 μ g/L]	22,02 \pm 4,78 ***	23,57 \pm 4,43 ***	22,06 \pm 4,60 ***	20,89 \pm 4,65 ***	23,80 \pm 8,17 *	27,83 \pm 8,48
BNP [5 μ g/L]	17,78 \pm 4,78 **	39,90 \pm 3,86 ***	53,21 \pm 4,61 ***	20,14 \pm 4,97 **	6,80 \pm 7,52	-11,86 \pm 9,49
BNP [10 μ g/L]	47,55 \pm 4,33 ***	42,07 \pm 4,44 ***	42,76 \pm 4,61 ***	43,98 \pm 4,65 ***	53,33 \pm 7,53 ***	2,37 \pm 8,49
PNF [12,5 μ g/L]	25,59 \pm 4,78 ***	17,67 \pm 4,43 **	39,79 \pm 4,60 ***	8,13 \pm 4,97	16,12 \pm 8,17 *	8,71 \pm 8,48
PNF [25 μ g/L]	6,84 \pm 4,53	8,09 \pm 4,20	8,37 \pm 4,36	7,84 \pm 4,42	10,86 \pm 6,20	29,29 \pm 9,49 *
PIM [7,5 μ g/L]	24,13 \pm 4,33 ***	34,88 \pm 4,01 ***	28,71 \pm 5,36 ***	22,26 \pm 4,42 ***	22,92 \pm 9,16	37,92 \pm 6,99 ***
PIM [15 μ g/L]	16,97 \pm 4,33 **	23,42 \pm 4,75 ***	22,74 \pm 4,92 ***	23,06 \pm 4,97 ***	13,56 \pm 6,70	34,16 \pm 7,35 ***
QUET [200 μ g/L]	39,42 \pm 5,12 ***	26,91 \pm 4,75 ***	39,92 \pm 4,36 ***	27,12 \pm 4,66 ***	3,23 \pm 7,06	32,97 \pm 9,49 **
QUET [400 μ g/L]	20,56 \pm 4,78 ***	22,62 \pm 4,44 ***	19,18 \pm 4,60 **	18,87 \pm 4,65 **	25,39 \pm 7,52 *	27,79 \pm 8,48
PROM [25 μ g/L]	23,41 \pm 5,12 ***	53,72 \pm 5,18 ***	59,17 \pm 5,36 ***	44,21 \pm 5,41 ***	15,33 \pm 7,06	34,60 \pm 9,49 **
PROM [50 μ g/L]	22,22 \pm 4,33 ***	21,56 \pm 3,86 ***	23,66 \pm 4,17 ***	23,96 \pm 4,23 ***	27,40 \pm 7,52 **	44,31 \pm 7,82 ***

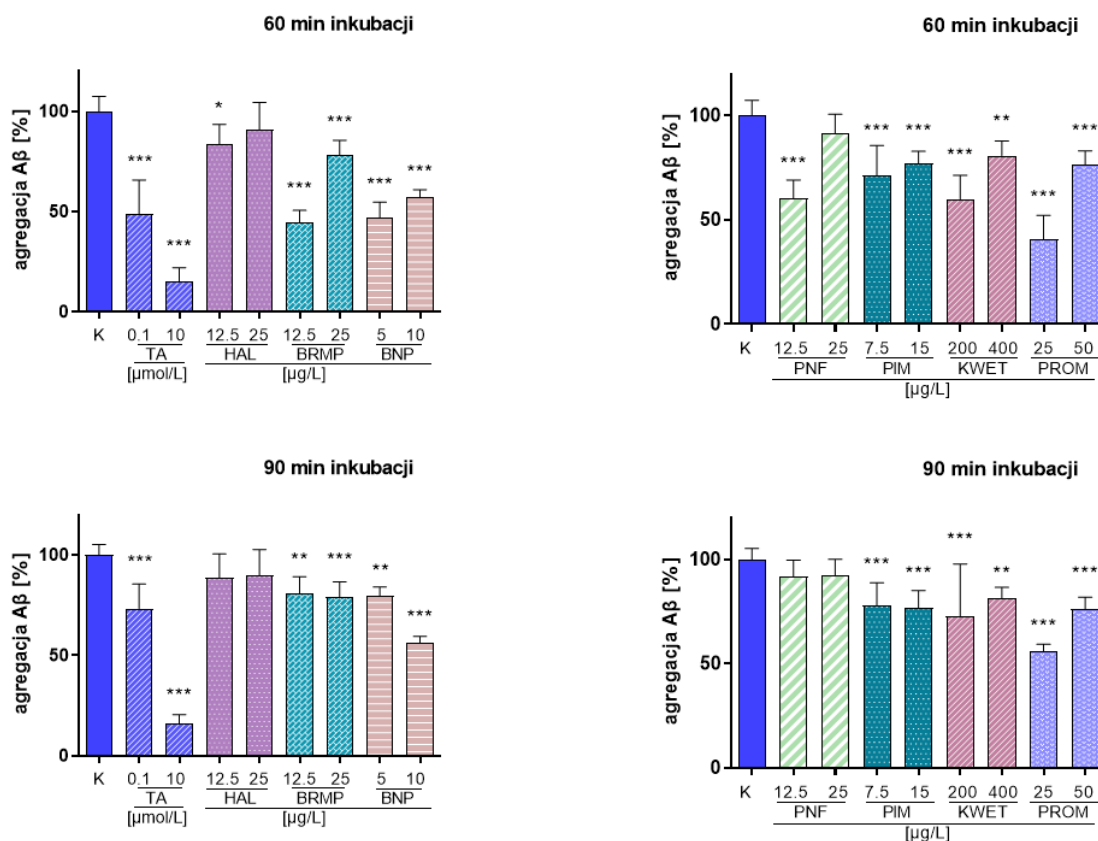
HAL-haloperidol; BRMP-bromperidol; BNP-benperidol; PNF-penfluridol; PIM-pimozyd; KWET-kwetiapina; PROM-promazyna;

Analizując otrzymane we wczesnej fazie agregacji (10-60 minut) dane (Tabela 45, Wykresy 33 i 34) można zauważyć statystycznie istotne spowolnienie tworzenia się agregatów $A\beta$ pod wpływem inkubacji z badanymi związkami. Większość związków w sposób umiarkowany, na poziomie ok. 16-39% (Tabela 45) hamowała agregację tego białka. Nieco silniejszą inhibicję zaobserwowano w przypadku obu stężeń benperidolu (ok. 40-53%), bromperidolu (56%) oraz stężenia 25 $\mu\text{g/L}$ promazyny (53-59%). Natomiast, w tej fazie tworzenia agregatów oligomerowych, nie zaobserwowano statystycznie istotnego działania penfluridolu w stężeniu TPC_{max} .



Wykres 33. Wpływ badanych leków przeciwpsychotycznych w stężeniach $\frac{1}{2} \text{TPC}_{\text{max}}$ i TPC_{max} na agregację $A\beta$. Pomiar wykonano po 10 i 30 min inkubacji odpowiednio z HAL-haloperidol; BRMP-bromperidol; BNP-benperidol; PNF-penfluridol; PIM-pimozyd; KWET-kwetiapina; PROM-promazyna. Jako wzorcowy inhibitor agregacji $A\beta$ zastosowano TA w stężeniu 0,1 $\mu\text{mol/L}$ i 10 $\mu\text{mol/L}$ (odpowiednio 170,12 $\mu\text{g/L}$ i 17012 $\mu\text{g/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD, $n = 9$. Istnieje różnica statystycznie znamiennej na poziomie $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

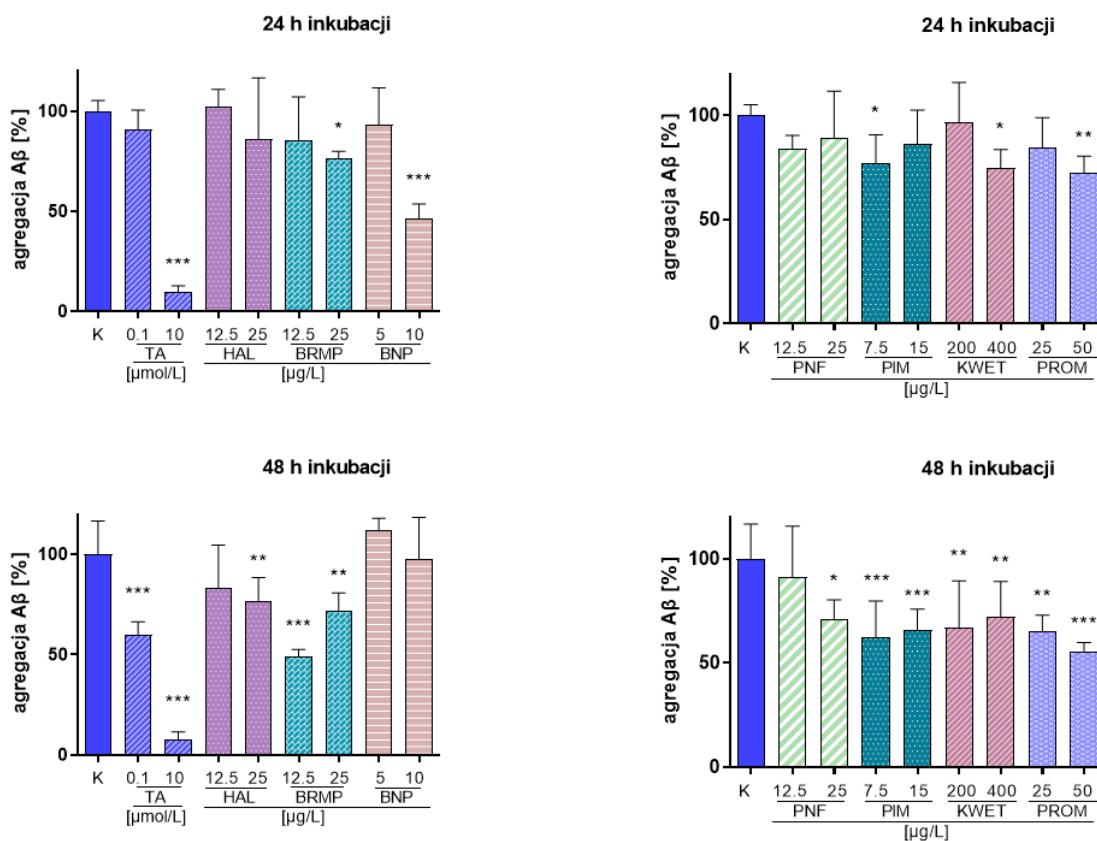
Na Wykresie 34 przedstawiono wyniki otrzymane po 60 i 90 minutach inkubacji $A\beta$ z badanymi lekami przeciwpsychotycznymi. W tym przypadku, także dla większości związków obserwowane było statystycznie istotne obniżenie % agregacji w stosunku do kontroli. W tym punkcie czasowym najsilniejsze działanie hamujące wykazała promazyne (25 $\mu\text{g/L}$) oraz benperidol (10 $\mu\text{g/L}$), które zahamowały agregację $A\beta$ o 44,21% i 43,98% ($p < 0,001$). Natomiast haloperidol i penfluridol, w tym punkcie czasowym, nie wykazały istotnego statystycznie wpływu na agregację $A\beta$.



Wykres 34. Wpływ badanych leków przeciwpsychotycznych w stężeniach $\frac{1}{2} TPC_{max}$ i TPC_{max} na agregację $A\beta$. Pomiary wykonane po 60 i 90 min inkubacji odpowiednio z HAL-haloperidol; BRMP-bromperidol; BNP-benperidol; PNF-penfluridol; PIM-pimozyd; KWET-kwetiapina; PROM-promazyne. Jako wzorcowy inhibitor agregacji $A\beta$ zastosowano TA w stężeniu 0,1 $\mu\text{mol/L}$ i 10 $\mu\text{mol/L}$ (odpowiednio 170,12 $\mu\text{g/L}$ i 17012 $\mu\text{g/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD, $n = 9$. Istnieje różnica statystycznie znamiennej na poziomie * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

W późnej fazie agregacji $A\beta$, ocenianej po 24 i 48 godzinach (Tabela 22, Wykres 35), tworzone są przede wszystkim duże fibryle, a dynamika tego procesu może się znacząco różnić w czasie. Potwierdzają to wyniki pomiaru fluorescencji uzyskane

w badaniu dla prób kontrolnych. Analiza wykonywana była w trzech niezależnych eksperymentach, w których każdy punkt pomiarowy wykonywany był w tryplikatach. Analiza szybkości tworzenia się agregatów na późnym etapie wykazuje pewne różnice, jak w przypadku kwetiapiny po 24 godzinach dla $\frac{1}{2} \times \text{TPC}_{\text{max}}$ inhibicja wynosiła 3,23% ($p > 0,05$), a dla TPC_{max} 25,39% ($p < 0,05$), natomiast po 48 godzinach poziom ten się wyrównał i wynosił odpowiednio 32,97% ($p < 0,01$) i 27,79% ($p < 0,01$) dla $\frac{1}{2} \times \text{TPC}_{\text{max}}$ i TPC_{max} . Dlatego zasadnym wydaje się oceniać wyniki fazy późnej łącząc te dwa przedziały czasowe. W późnej fazie agregacji $A\beta$ nadal część związków wykazywała statystycznie istotne obniżenie % agregacji. Największą aktywnością po 24 godzinach inkubacji wykazał się benperidol w stężeniu TPC_{max} (10 $\mu\text{g/L}$) - tworzenie fibryli zostało zahamowane o 53,33% ($p < 0,001$), jednak po 48 godzinach związek ten wykazywał najslabszą zdolność hamowania tworzenia agregatów $A\beta$. Dla ostatniego punktu czasowego, w którym wykonywano pomiar fluorescencji (48 godzin) najwyższą procentową wartość hamowania, wynoszącą 51,18% ($p < 0,001$) odnotowano dla bromperidolu (12,5 $\mu\text{g/L}$). Silną inhibicję po 48 godzinach wykazała również promazyna w stężeniu TPC_{max} (50 $\mu\text{g/L}$), zmniejszając agregację $A\beta$ o 44,31% ($p < 0,001$). W łącznej analizie ostatniej fazy tworzenia dużych fibryli $A\beta$ najslabszą inhibicję, nieprzekraczającą 30% wykazały haloperidol i penfluridol.



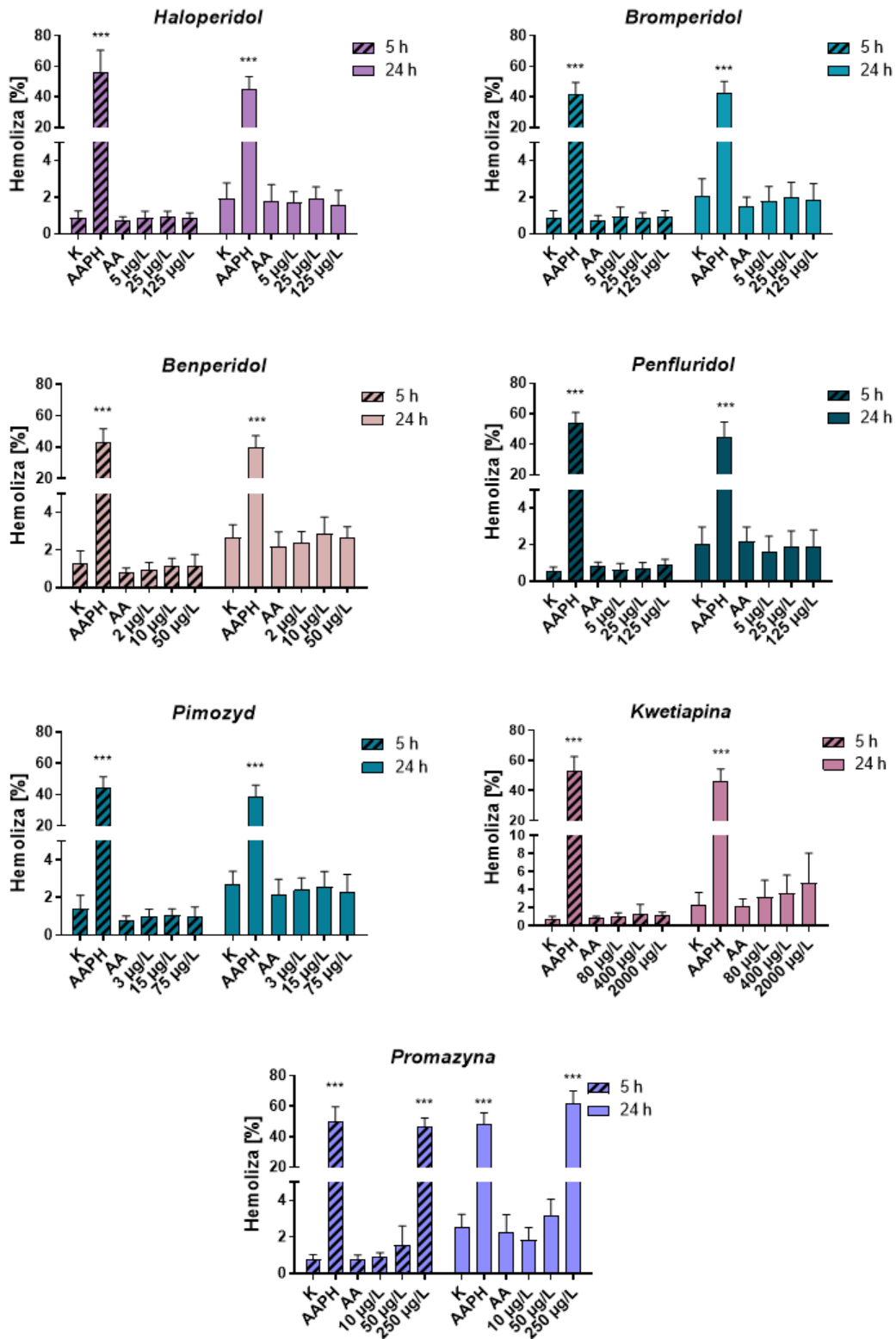
Wykres 35. Wpływ badanych leków przeciwpsychotycznych w stężeniach $\frac{1}{2} TPC_{max}$ i TPC_{max} na agregację $A\beta$. Pomiary wykonane po 24 i 48 h inkubacji odpowiednio z HAL-haloperidol; BRMP- bromperidol; BNP-benperidol; PNF-penfluridol; PIM-pimozyd; KWET-kwetiapina; PROM-promazyna. Jako wzorcowy inhibitor agregacji $A\beta$ zastosowano TA w stężeniu 0,1 $\mu\text{mol/L}$ i 10 $\mu\text{mol/L}$ (odpowiednio 170,12 $\mu\text{g/L}$ i 17012 $\mu\text{g/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD, $n = 9$. Istnieje różnica statystycznie znamiennej na poziomie * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

12.6. Potencjał antyoksydacyjny badanych związków w modelu erytrocytarnym

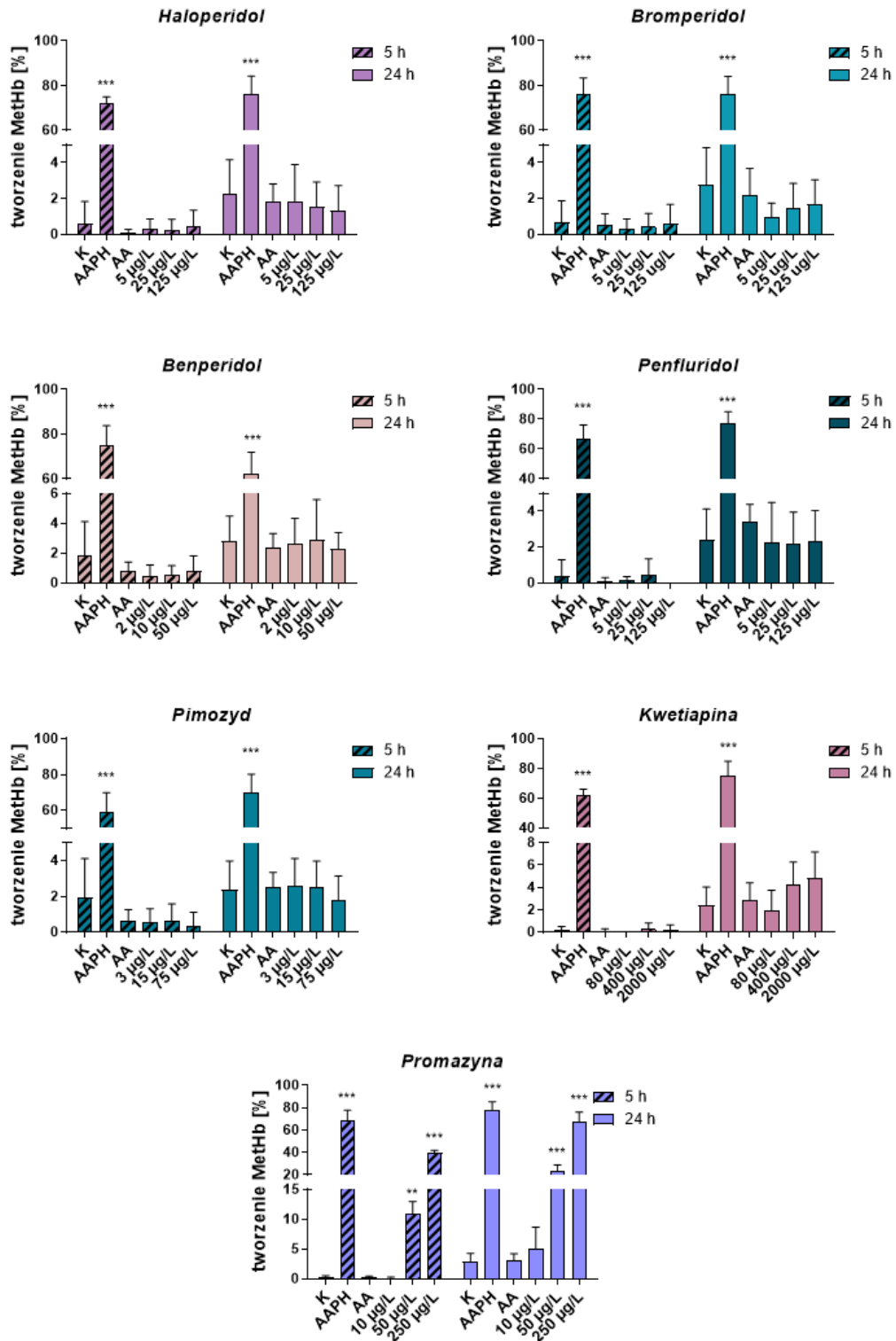
Potencjalne właściwości antyoksydacyjne leków przeciwpsychotycznych zostały zbadane na podstawie dwóch testów z użyciem ludzkich krwinek czerwonych. Po pierwsze, oceniono zdolność badanych związków do ochrony błony białko-lipidowej erytrocytów przed uszkodzeniem oksydacyjnym indukowanym przez AAPH, co było wyrażone jako % hemolizy komórek w danej próbce. W kolejnym teście, oceniono odsetek powstającej methemoglobiny, która stanowi marker stresu oksydacyjnego, będący efektem działania ROS na główne białko erytrocytów, czyli hemoglobinę. W badaniu zostały zastosowane związki w szerszym, niż dotychczas

zakresie stężeń, tj. $1/5 \times \text{TPC}_{\text{max}}$, TPC_{max} oraz $5 \times \text{TPC}_{\text{max}}$ co pozwoliło wstępnie ocenić wpływ, zarówno niskich, jak i bardzo wysokich stężeń, na integralność błony białkowo-lipidowej oraz zawartość MetHb. Działanie związków oceniono w warunkach podstawowych (próby inkubowane tylko z badanymi lekami) oraz indukowanego stresu oksydacyjnego (próby inkubowane zarówno z AAPH, jak i z badanymi lekami). Zastosowane w modelu erytrocytarnym *in vitro*, odpowiednie stężenie AAPH do generacji ROS, wynosi 50 mmol/L i zostało ustalone na podstawie wstępnych eksperymentów.

Wyniki przeprowadzonych badań, które oceniały wpływ badanych związków na stopień hemolizy erytrocytów i ich właściwości methemoglobinotwórcze przedstawiają Wykresy 36 i 37. Wpływ leków przeciwpsychotycznych na % hemolizy erytrocytów nie przekraczał 5%, co świadczy o biokompatybilności tych związków (same w sobie nie powodują uszkodzeń błony białkowo-lipidowej). Wyjątek wśród badanych związków stanowi promazyna, która w najwyższym stężeniu (250 $\mu\text{g/L}$) zwiększyła rozpad błony erytrocytów odpowiednio o 46% i 61% po 5 i 24 godzinach inkubacji, co było porównywalne do hemolizy obserwowanej w próbach inkubowanych z AAPH. W przypadku tego leku, zaobserwowano również zwiększone tworzenie methemoglobiny, które dla najwyższego stężenia (250 $\mu\text{g/L}$), po 5 godzinach inkubacji wynosiło 39%, a po 24 godzinach 67%, również dla stężenia 50 $\mu\text{g/L}$ zaobserwowano istotny wzrost odsetka MetHb, odpowiednio do 10% i 23%. Dla porównania, w warunkach indukcji ROS w próbie z AAPH, zawartość MetHb wzrastała do ponad 70%. Pozostałe badane związki nie wykazały się działaniem methemoglobinotwórczym, czyli w badanym układzie nie wykazują działania prooksydacyjnego.



Wykres 36. Wpływ badanych leków przeciwpsychotycznych w stężeniach 1/5 TPC_{max} , TPC_{max} i 5 x TPC_{max} na hemolizę erytrocytów mierzoną po 5 i 24 h inkubacji. AAPH zastosowano w stężeniu 50 mmol/L, a AA w stężeniu 10 µg/mL. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD, n = 6 - 12, ***p < 0,001 w odniesieniu do kontroli (K).

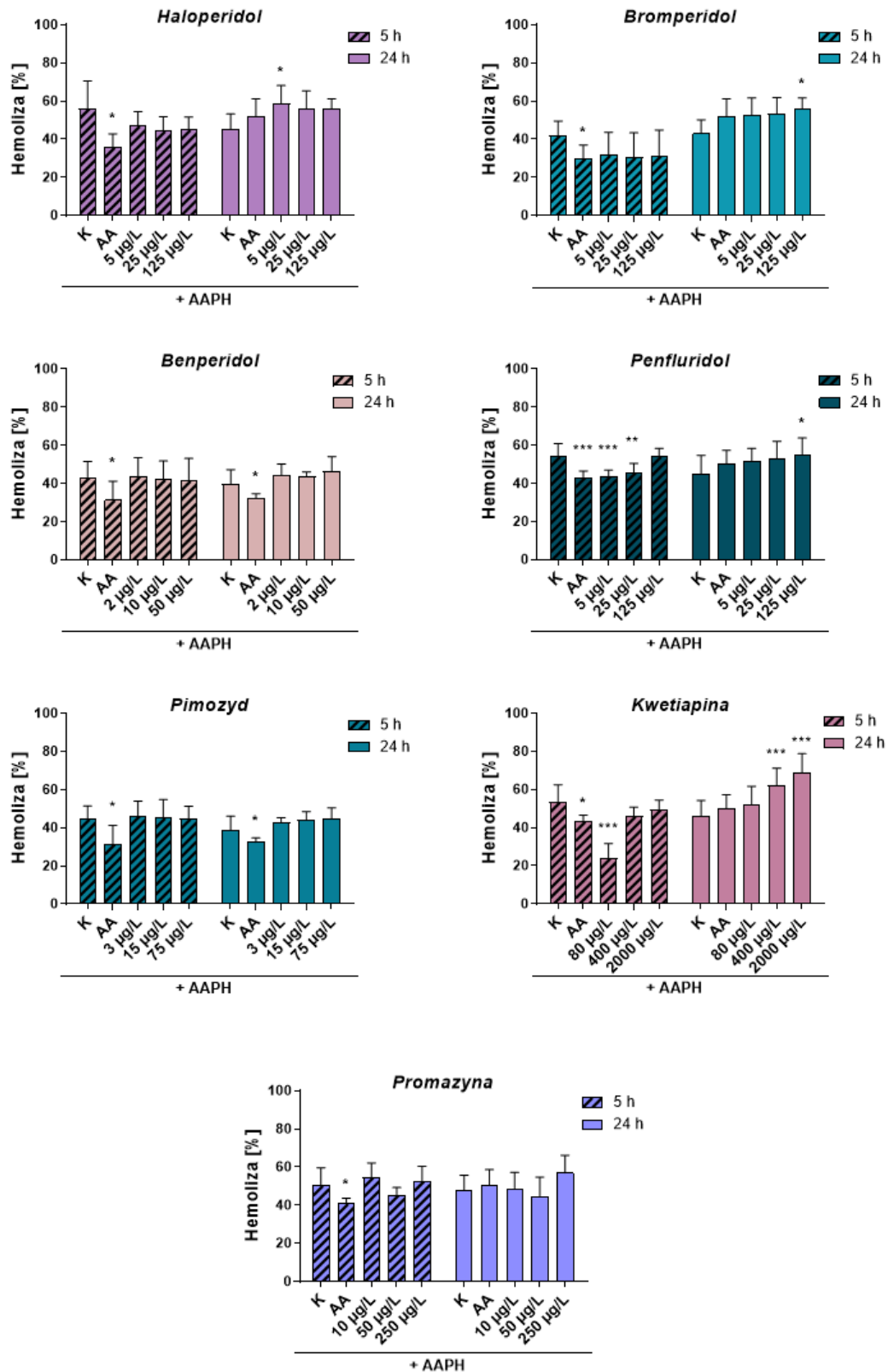


Wykres 37. Wpływ badanych leków przeciwpsychotycznych na stężeniach $1/5 TPC_{max}$, TPC_{max} i $5 \times TPC_{max}$ na tworzenie methemoglobiny mierzony po 5 i 24 h inkubacji. AAPH zastosowano w stężeniu 50 mmol/L, a AA w stężeniu 10 µg/mL. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD, $n = 6 - 12$, $p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wyniki badania hemolizy erytrocytów mierzonej po 5- i 24-godzinnej inkubacji z mieszaniną badanych leków przeciwpsychotycznych z AAPH wyrażoną w procentach przedstawia Wykres 38. Badane związki wykazały się znikomym działaniem protekcyjnym przed szkodliwym działaniem ROS na błonę erytrocytarną – minimalne działanie obserwowano jedynie po krótkim (5h) narażeniu erytrocytów na stres oksydacyjny. Spośród badanych związków, po 5 godzinach inkubacji jedynie kwetiapina w stężeniu 80 µg/L spowodowała statystycznie istotny spadek hemolizy erytrocytów do 23,92% w porównaniu z kontrolą z AAPH, która wynosiła 53,40% ($p < 0.001$).

Po 24-godzinnej inkubacji erytrocytów z kwetiapiną w stężeniu 80 µg/L różnica nie była już statystycznie istotna ($p > 0,05$) w porównaniu do kontroli stanowiącej próbę z AAPH. W przypadku najwyższych stężeń (125 µg/L) bromperidolu i penfluridolu, po 24 godzinach inkubacji zaobserwowano istotny statystycznie wzrost hemolizy (odpowiednio o 13% i 10%) w porównaniu do próby kontrolnej z AAPH. Warto zwrócić uwagę na fakt, że promazyna, która w poprzednim eksperymencie, sama w najwyższym badanym stężeniu, powodowała uszkodzenia błony erytrocytarnej, w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego, nie nasilała szkodliwego wpływu ROS na błonę, co może wskazywać na odmienny mechanizm działania powstawania tego uszkodzenia.

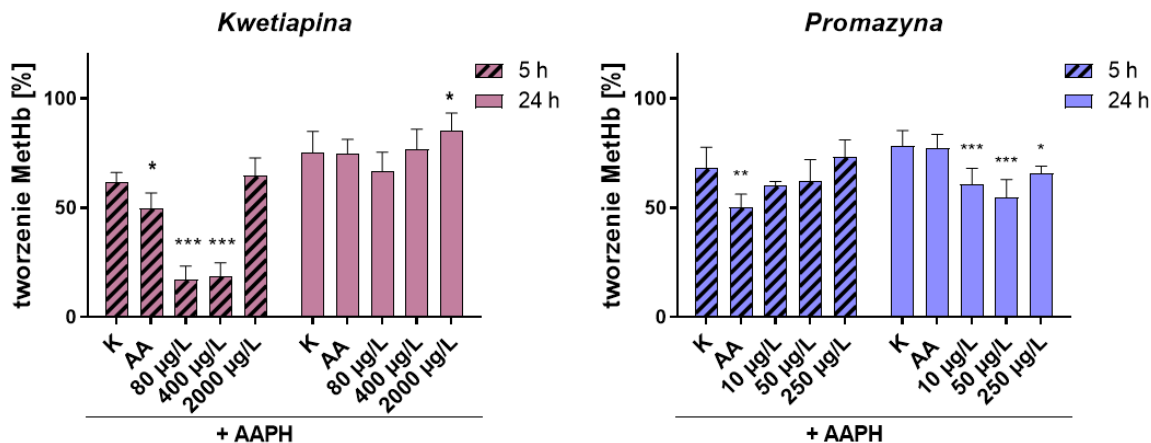
Co ciekawe, protekcyjne działanie wzorcowego antyoksydantu – kwasu askorbinowego (AA), również obserwowano jedynie po 5 godzinach inkubacji krwinek czerwonych z ROS. Średni stopień hemolizy po 5 godzinach inkubacji z AA w różnych próbach wynosił $37,05 \pm 6,03\%$ i był znacząco niższy niż stopień hemolizy erytrocytów występujący w obecności wolnych rodników ($49,11 \pm 5,77\%$). Prawdopodobnie może to wynikać z wyczerpania się właściwości antyoksydacyjnych AA oraz badanych substancji.



Wykres 38. Wpływ badanych leków przeciwpsychotycznych w stężeniach 1/5 TPC_{max}, TPC_{max} i 5 x TPC_{max} na hemolizę erytrocytów mierzony po 5 i 24 godzinach inkubacji. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD, n = 4 - 12. *p < 0,05, ***p < 0,001 w odniesieniu do kontroli (K), którą stanowiły próby z AAPH.

W przypadku tworzenia methemoglobiny pod wpływem mieszanki leków przeciwpsychotycznych z AAPH, statystycznie istotny wpływ odnotowano jedynie w przypadku kwetiapiny oraz promazyny (Wykres 39). 5-godzinna inkubacja z kwetiapiną w stężeniu 80 i 400 $\mu\text{g/L}$ spowodowała istotne zmniejszenie tworzenia methemoglobiny w porównaniu z kontrolą z AAPH (odpowiednio 17,14% i 18,85% wobec 61,93% dla kontroli AAPH). W przypadku promazyny w stężeniu 10 i 50 $\mu\text{g/L}$ po 24 godzinach inkubacji zaobserwowano zmniejszenie utleniania hemu w erytrocytach (odpowiednio 60,73% i 54,54% wobec 78,15% dla kontroli AAPH).

Podobnie, jak w teście hemolizy, także w tym doświadczeniu, działanie protekcyjne AA przed tworzeniem MetHb występuje jedynie po 5 godzinach inkubacji. Procent powstałej MetHb w obecności AA i AAPH po 5 godzinach inkubacji wynosił średnio $63 \pm 14,1$ % zaś po 24 godzinach $79 \pm 9,1$ %. Dla porównania ilość powstałej MetHb po inkubacji z samym AAPH po 5 godzinach wynosił $68,38 \pm 6,36$ %, zaś po 24 godzinach $73,66 \pm 5,68$ %.

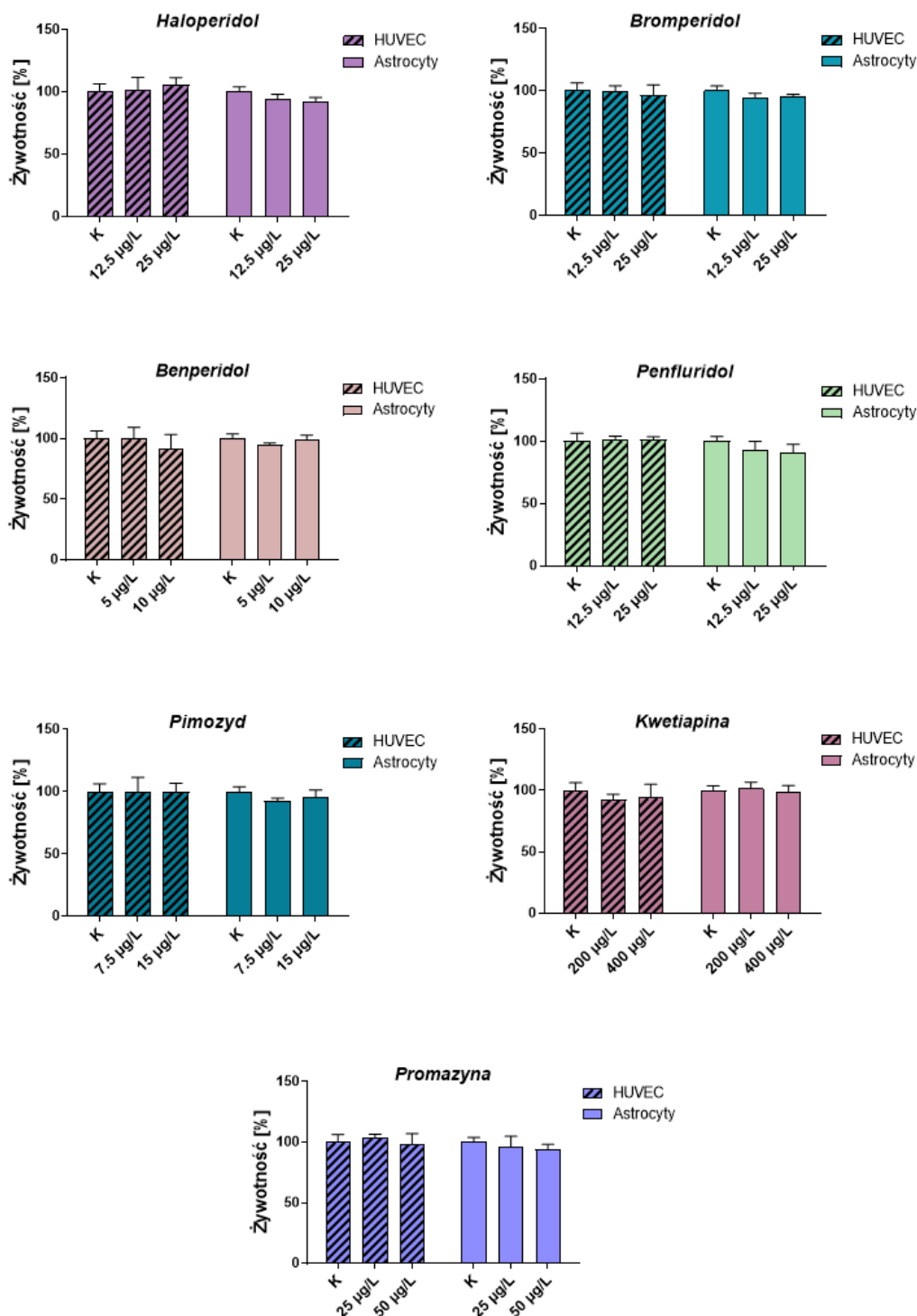


Wykres 39. Wpływ kwetiapiny i promazyny w stężeniach $1/5 \times \text{TPC}_{\text{max}}$, TPC_{max} i $5 \times \text{TPC}_{\text{max}}$ z AAPH na tworzenie methemoglobiny mierzony po 5 i 24 godzinach inkubacji. AAPH zastosowano w stężeniu 50 mmol/L, a AA w stężeniu 10 $\mu\text{g/mL}$. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD, $n = 6 - 12$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

12.7. Potencjał antyoksydacyjny leków przeciwpsychotycznych w modelu hodowli komórkowej

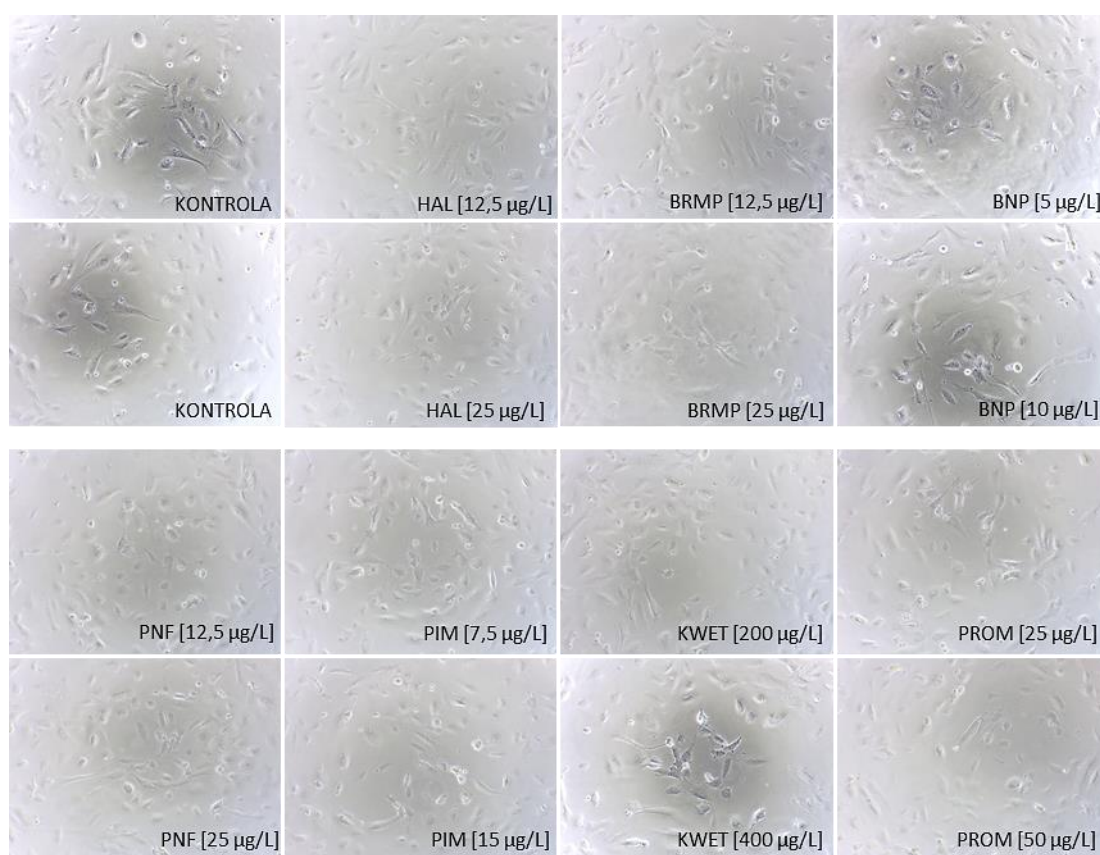
12.7.1. Ocena wpływu badanych związków na żywotność i morfologię komórek

Potencjalne właściwości antyoksydacyjne leków przeciwpsychotycznych zbadano również na dwóch liniach komórkowych na podstawie oceny żywotności komórek HUVEC i astrocytów w warunkach standardowych oraz w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego wywołanego przez AAPH. W tym celu wykonany został kolorymetryczny test WST-1, który pozwala na określenie żywotności komórek w sposób ilościowy. Dehydrogenazy komórkowe redukują sól tetrazoliową WST-1 do ciemnożółtego formazanu, co umożliwia pomiar absorpcji światła przy długości fali $\lambda = 450 \text{ nm}$ i bezpośrednio koreluje z liczbą żywych komórek. Komórki stymulowane były testowanymi związkami w stężeniach odpowiadających $\frac{1}{2} \text{TPC}_{\text{max}}$ oraz TPC_{max} przez 24 godziny. Jak przedstawia Wykres 40, badane związki w obu zastosowanych stężeniach nie wpłynęły znacząco na żywotność w przypadku obu linii komórkowych ($p > 0.05$).

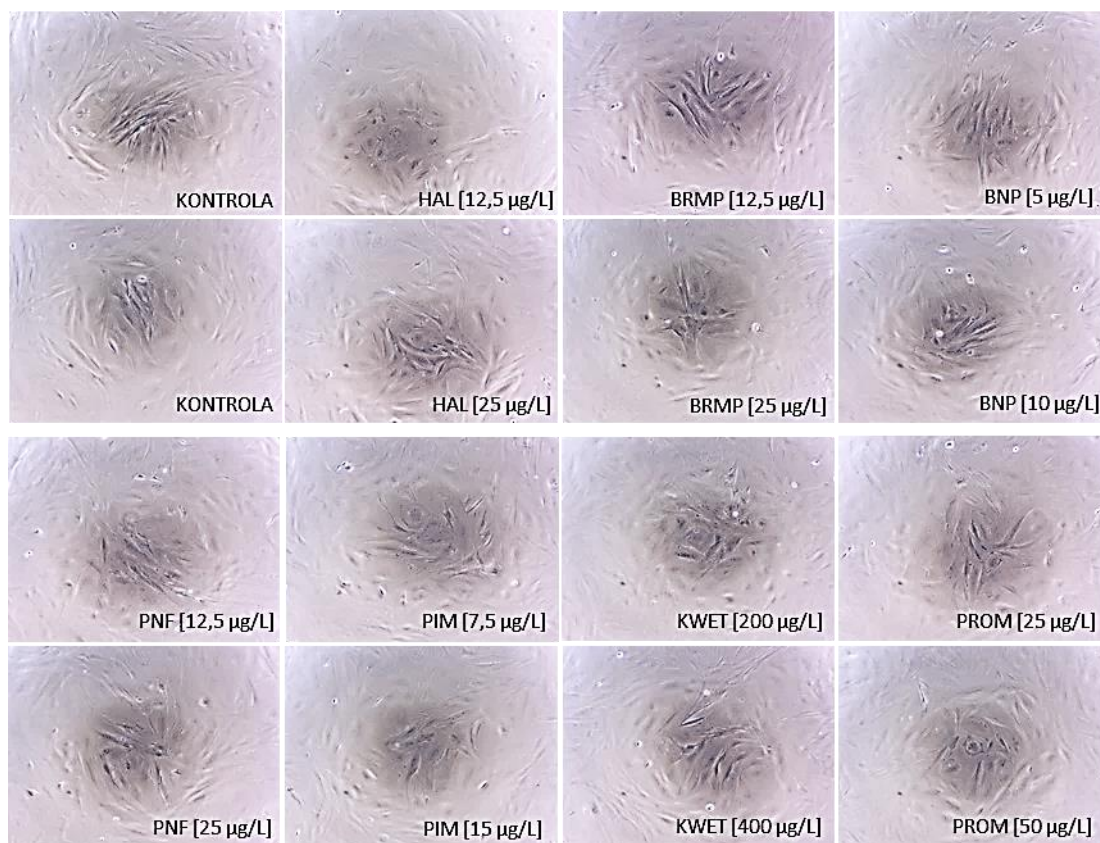


Wykres 40. Wpływ badanych leków przeciwpsychotycznych na żywotność komórek HUVEC i astrocytów. Związki testowano w dwóch stężeniach odpowiadających $\frac{1}{2} TPC_{max}$ oraz TPC_{max} . Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD, $n = 8 - 9$. Żaden z badanych związków nie przyczynił się do istotnego spadku żywotności komórek ($p > 0,05$).

Wraz z oceną wpływu badanych związków na żywotność komórek wykonana została mikroskopowa ocena morfologii komórek HUVEC oraz astrocytów za pomocą mikroskopu z kontrastem fazowym. Reprezentatywne zdjęcia komórek HUVEC stymulowane testowanymi związkami w stężeniach odpowiadających $\frac{1}{2}$ TPC_{max} oraz TPC_{max} przez 24 godziny przedstawia Rysunek 10. W przypadku komórek HUVEC stymulowanie badanymi lekami skutkowało utworzeniem jedynie, nielicznych zmienionych morfologicznie, zaokrąglonych komórek, natomiast w przypadku astrocytów testowane związki nie wpłynęły na ich morfologię, co zaprezentowane zostało na Rysunku 11.



Rysunek 10. Zmiany morfologii komórek HUVEC pod wpływem leków przeciwpsychotycznych w stężeniach odpowiadających $\frac{1}{2}$ TPC_{max} oraz TPC_{max} po 24-godzinnej inkubacji. Kontrolę stanowią komórki niestymulowane lekami przeciwpsychotycznymi. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu z kontrastem fazowym (powiększenie 100-krotne) zsynchronizowanym z komputerem, wyposażonym w program do analizy obrazu (Opta-Tech, oprogramowanie OptaView 7).



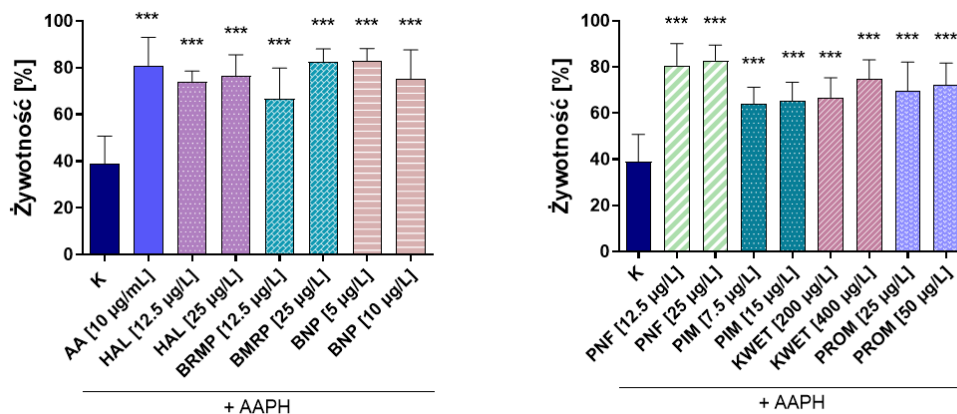
Rysunek 11. *Zmiany morfologii astrocytów pod wpływem leków przeciwpsychotycznych w stężeniach odpowiadającym $\frac{1}{2} TPC_{max}$ oraz TPC_{max} po 24-godzinnej inkubacji. Kontrolę stanowią komórki niestymulowane lekami przeciwpsychotycznymi. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu z kontrastem fazowym (powiększenie 100-krotne) zsynchronizowanym z komputerem, wyposażonym w program do analizy obrazu (Opta-Tech, oprogramowanie OptaView 7).*

12.7.2. Ocena wpływu badanych związków na żywotność i morfologię komórek w warunkach stresu oksydacyjnego

Kolejnym etapem badań było zbadanie potencjału antyoksydacyjnego leków przeciwpsychotycznych. W tym celu komórki inkubowano przez 1 godzinę z badanymi związkami, a następnie dodano AAPH, który był induktorem stresu oksydacyjnego. Komórki inkubowano z AAPH w 37 °C w 5% CO₂ przez kolejne 90 min w przypadku HUVEC i 60 min w próbach z astrocytami. Eksperymentalnie ustalono odpowiednie stężenia AAPH, które dla komórek HUVEC wynosiło 17,5 mmol/L, natomiast dla astrocytów 15 mmol/L. Jako wzorzec o działaniu antyoksydacyjnym zastosowano AA w stężeniu 10 µg/mL. Zarówno w badaniach z HUVEC, jak i z astrocytami,

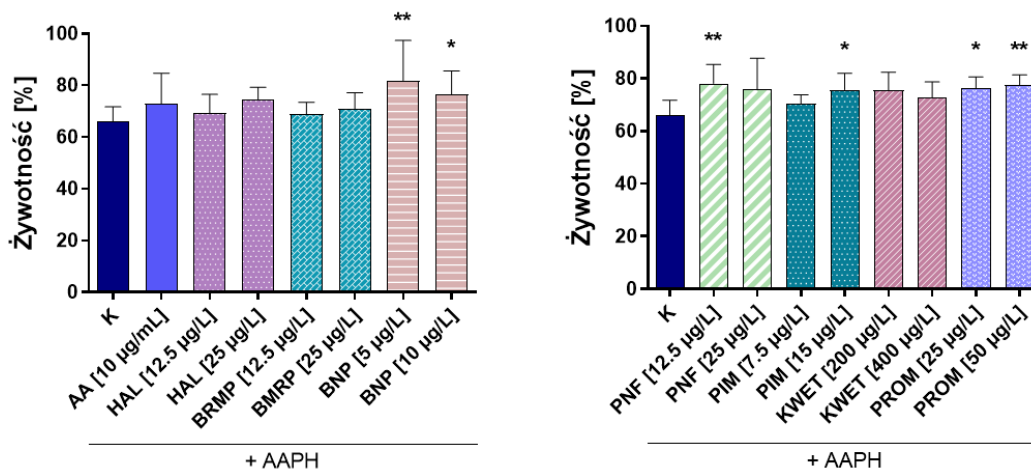
punktem odniesienia stanowiącym 100% żywotności były komórki traktowane samym medium, bez stymulowania żadnym związkiem.

W przypadku komórek HUVEC (Wykres 41), w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego, żywotność w próbach stymulowanych samym AAPH spadała do 39,13%. Natomiast w komórkach preinkubowanych z AA (10 µg/mL) żywotność wynosiła 81,04%. Preinkubacja komórek z badanymi lekami przeciwpsychotycznymi wykazała efekt ochronny przed stresem oksydacyjnym na poziomie porównywalnym do działania AA. Badane związki istotnie zwiększyły żywotność HUVEC w zakresie 64,20% – 82,91% (odpowiednio: najslabsze działanie protekcyjne zaobserwowano dla $\frac{1}{2}$ TPC_{max} pimozydu, a najsilniejsze dla $\frac{1}{2}$ TPC_{max} benperidolu) w porównaniu z próbą kontrolną z AAPH (w stężeniu 17,5 mmol/L). W przypadku bromperidolu i kwetiapiny zauważalny jest potencjalny związek pomiędzy stężeniem substancji, a efektem antyoksydacyjnym. W przypadku bromperidolu żywotność HUVEC była na poziomie 66,76% i 82,53% (odpowiednio dla stężeń 12,5 µg/L i 25 µg/L), natomiast dla kwetiapiny na poziomie 66,84% i 74,97% (odpowiednio 200 µg/L i 400 µg/L). Analizując wyniki protekcyjnego działania związków w obu stężeniach ($\frac{1}{2}$ x TPC_{max} i TPC_{max}) najsilniejszy ochronny wpływ, zwiększający statystycznie istotnie żywotność HUVEC zaobserwowano w przypadku penfluridolu (odpowiednio 80,50% i 82,89%), natomiast nieco słabszym działaniem protekcyjnym wykazał się pimozyd (64,20% i 65,25%).



Wykres 41. Potencjalne działanie antyoksydacyjne wybranych leków przeciwpsychotycznych na komórki HUVEC. Komórki inkubowane były przez 1 godzinę z badanymi związkami, a następnie dodano AAPH, który był induktorem stresu oksydacyjnego. Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli traktowanej samym medium (100% żywotności). Obliczenia statystyczne wykonano w odniesieniu do kontroli (K), którą stanowią komórki traktowane AAPH w stężeniu 17,5 mmol/L; $p < 0,001$.

W przypadku preinkubacji hodowli astrocytów z badanymi związkami (Wykres 42) stwierdzono, że tylko niektóre z nich chronią komórki przed stresem oksydacyjnym na poziomie porównywalnym do AA (10 µg/mL) (żywotność wynosiła 72,91 % vs. 65,92 % dla kontroli inkubowanej tylko z AAPH (15 mmol/L)). Cztery substancje: benperidol (w stężeniach 5 i 10 µg/L), penfluridol (12,5 µg/L), pimozyd (15 µg/L) i promazyna (25 i 50 µg/L) wykazały statystycznie istotny, korzystny wpływ na żywotność astrocytów. Najsilniejszy efekt protekcyjny (średnia żywotność 81,86 %) wykazał benperidol w stężeniu 5 µg/L, umiarkowane działanie wykazały: penfluridol (12,5 µg/L) 78,09 %, promazyna (50 µg/L) 77,60%, benperidol (10 µg/L) 76,52 %, promazyna (25 µg/L) 76,28 % oraz pimozyd (15 µg/L) 75,74%. Pozostałe badane związki nie wykazały statystycznie istotnego zwiększenia żywotności astrocytów w porównaniu z kontrolą.

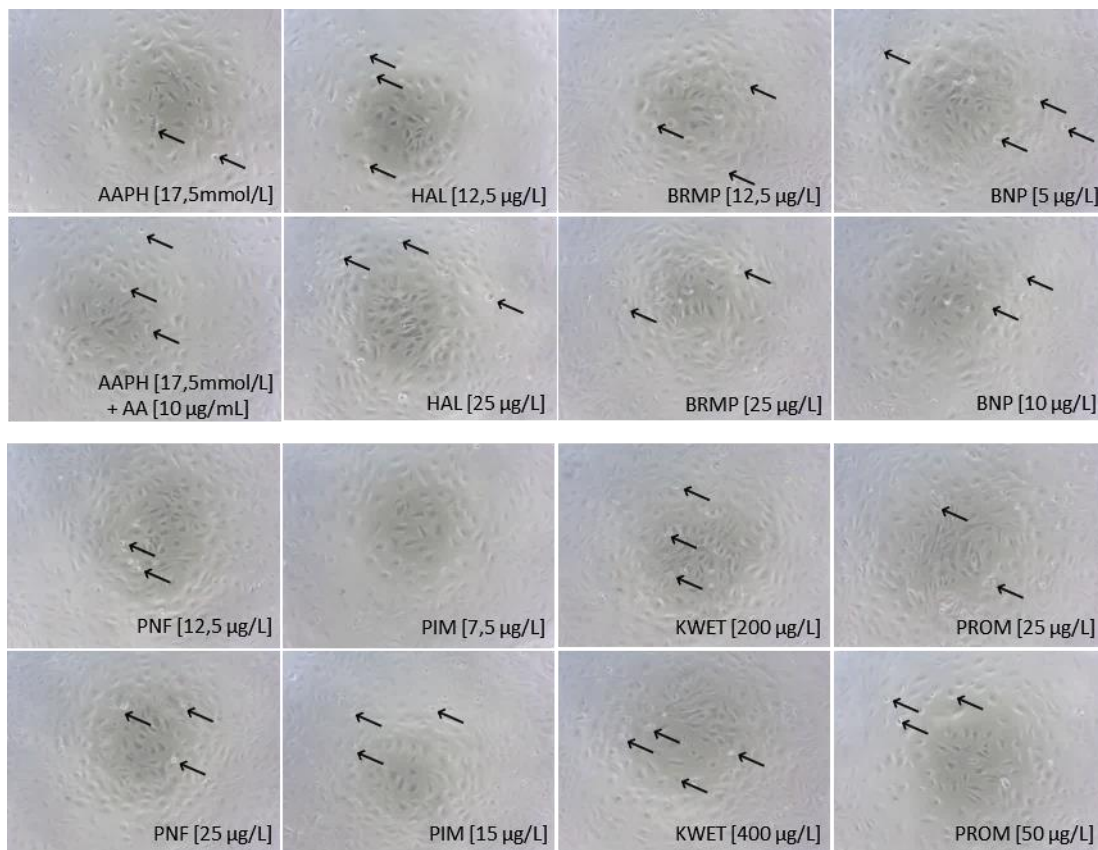


Wykres 42. Potencjalne działanie antyoksydacyjne wybranych leków przeciwpsychotycznych na astrocyty. Komórki inkubowane były przez 1 godzinę z badanymi związkami, a następnie dodano AAPH, który był induktorem stresu oksydacyjnego. Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli traktowanej samym medium (100% żywotności). Obliczenia statystyczne wykonano w odniesieniu do kontroli (K), którą stanowią komórki traktowane AAPH w stężeniu 15 mmol/L; * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$.

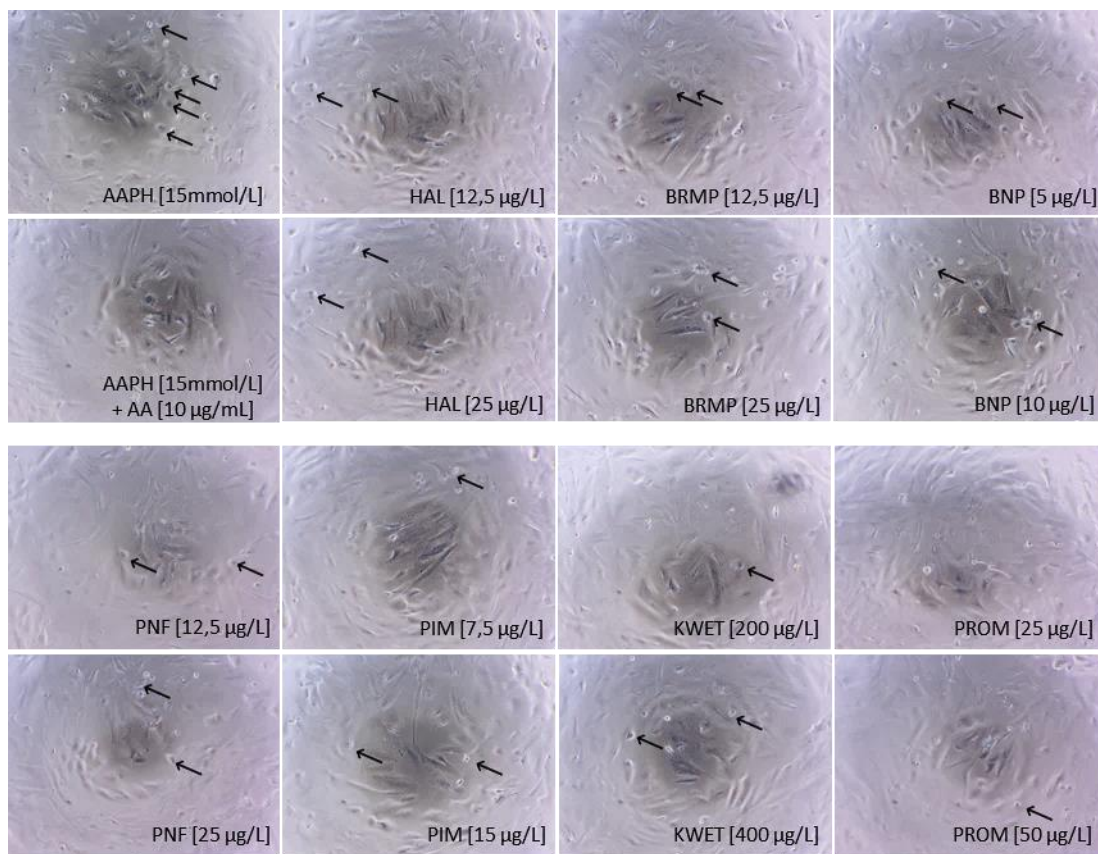
Przy użyciu mikroskopu z kontrastem fazowym oceniono także wpływ preinkubacji hodowli komórkowych z badanymi lekami przeciwpsychotycznymi na morfologię komórek hodowanych w warunkach stresu oksydacyjnego indukowanego AAPH. Rysunki 11 i 12 przedstawiają zdjęcia odpowiednio HUVEC oraz astrocytów, które przed indukcją stresu oksydacyjnego stymulowane były przez 24 godziny badanymi lekami przeciwpsychotycznymi w stężeniach $\frac{1}{2}$ TPC_{max} oraz TPC_{max} . Jako substancję wzorcową o działaniu antyoksydacyjnym zastosowano AA (10 µg/mL). Zarówno w przypadku HUVEC jak i astrocytów, zaobserwowano zmniejszoną liczbę komórek oraz zmiany w morfologii komórek stymulowanych samym AAPH. W próbach z AAPH i AA, poza pojedynczymi obkurczonymi komórkami, nie obserwowano istotnych zmian morfologicznych komórek.

W przypadku inkubacji komórek śródbłonna z AAPH i lekami przeciwpsychotycznymi można zaobserwować utworzenie się nielicznych zaokrąglonych lub obkurczonych komórek (Rysunek 12). Również w przypadku hodowli astrocytów w warunkach stresu oksydacyjnego, badane związki okazały się mieć działanie protekcyjne i obserwowane zmiany w morfologii komórek, były nieliczne i ograniczały się do powstania pojedynczych okrągłych komórek (Rysunek

13). W obu liniach komórkowych, żaden z badanych związków przeciwpsychotycznych nie wyróżniał się na tle pozostałych w zakresie wpływu na powstanie zmian morfologicznych komórek.



Rysunek 12. Zmiany morfologii komórek HUVEC pod wpływem AAPH (17,5 mmol/L) i AA (10 µg/mL) oraz AAPH (17,5 mmol/L) i leków przeciwpsychotycznych w stężeniach odpowiadających ich $\frac{1}{2} TPC_{max}$ oraz TPC_{max} . Kontrolę stanowią komórki stymulowane AAPH (17,5 mmol/L). Strzałkami oznaczono przykłady morfologicznie zmienionych komórek. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu z kontrastem fazowym (powiększenie 100-krotne) zsynchronizowanym z komputerem, wyposażonym w program do analizy obrazu (Opta-Tech, oprogramowanie OptaView 7).



Rysunek 13. Zmiany morfologii astrocytów pod wpływem AAPH (15 mmol/L) i AA (10 µg/mL) oraz AAPH (15 mmol/L) i leków przeciwpsychotycznych w stężeniach odpowiadających ich $\frac{1}{2} TPC_{max}$ oraz TPC_{max} . Kontrolę stanowią komórki stymulowane AAPH (15 mmol/L). Strzałkami oznaczono przykłady morfologicznie zmienionych komórek. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu z kontrastem fazowym (powiększenie 100-krotne) zsynchronizowanym z komputerem, wyposażonym w program do analizy obrazu (Opta-Tech, oprogramowanie OptaView 7).

Podsumowanie wyników i próba oceny zależności aktywności badanych leków przeciwpsychotycznych od ich struktury chemicznej

- Doświadczalnie zostały wyznaczone wartości IC_{50} dla związków wzorcowych donepezylu i rywastygminy. Donepezil hamował 50% aktywności AChE i BuChE, odpowiednio w stężeniach: $0,025 \pm 0,004 \mu\text{mol/L}$ i $12,81 \pm 1,52 \mu\text{mol/L}$ – jest to wysokokoselektywny inhibitor o silnej aktywności anty-AChE ($SI_{\text{AChE}} = 512,40$) oraz słabej aktywności anty-BuChE ($SI_{\text{BuChE}} = 0,002$). Dla rywastygminy wartości IC_{50} wyniosły odpowiednio dla AChE i BuChE: $64,29 \pm 2,97 \mu\text{mol/L}$ oraz $0,95 \pm 0,09 \mu\text{mol/L}$ – nieselektywny inhibitor ChE ($SI_{\text{AChE}} = 0,015$, $SI_{\text{BuChE}} = 67,67$).
- Spośród badanych leków przeciwpsychotycznych największą inhibicję aktywności ChE wykazały promazyna i kwetiapina. Promazyna hamowała aktywność BuChE w zakresie stężeń szerszym niż TPC (10 - 50 $\mu\text{g/L}$): 7,5 - 200 $\mu\text{g/L}$, dla których inhibicja wynosiła 19,08 – 85,75 %. Związek ten wykazał 5-krotnie wyższą aktywność anty-BuChE w porównaniu z rywastygminą i 67-krotnie wyższą niż donepezil. Kwetiapina hamowała BuChE w stężeniach wyższych niż TPC (20 – 400 $\mu\text{g/L}$): 441 – 44154 $\mu\text{g/L}$, dla których aktywność BuChE zmniejszyła się o 36,79 – 77,11%. Aktywność tego związku była 6-krotnie wyższa w odniesieniu do rywastygminy i dwukrotnie do donepezylu.
- Wyznaczone parametry kinetyczne reakcji enzymatycznych wskazują że donepezil hamuje zarówno AChE, jak i BuChE w sposób mieszany, w którym oba parametry kinetyczne opisujące reakcję enzymatyczną ulegają zmianie (K_{mi} wzrasta w stosunku do K_m enzymu, V_{maxi} maleje w porównaniu z V_{max}). Ten sam typ inhibicji wykazano również dla rywastygminy w stosunku do AChE oraz dla kwetiapiny i promazyny w odniesieniu do BuChE. W przypadku rywastygminy, inhibicja aktywności BuChE okazała się mieć charakter niekompetycyjny, ponieważ wartość K_{mi} nie różni się od wartości K_m enzymu, podczas gdy V_{maxi} jest mniejsza niż V_{max} .
- Spośród badanych leków przeciwpsychotycznych najsilniejszy synergizm z donepezilem wykazała **promazyna obniżając IC_{50} dla BuChE o 64,8%**. Dla mieszaniny binarnej IC_{50} wyniosło $4,51 \pm 0,19 \mu\text{mol/L}$, w odniesieniu

do samego donepezylu, w przypadku którego IC_{50} wyniosło $12,81 \pm 1,52 \mu\text{mol/L}$ ($p < 0,05$). Lekami, które również wykazały synergizm działania z donepezilem były **bromperidol, benperidol, pimozyd i kwetiapina zmniejszając IC_{50} donepezylu o 43,8 – 57,9% ($p < 0,05$)**. Badane leki przeciwpsychotyczne nie wpłynęły statystycznie istotnie na zmianę IC_{50} donepezylu dla AChE.

- Badanie mieszanin binarnych leków przeciwpsychotycznych z rywastygminą wykazało, że **największy wpływ na inhibicję AChE ma połączenie z pimozydem**. W porównaniu do samej rywastygminy, nastąpiło **zmniejszenie IC_{50} o 51,0%** (z $64,29 \pm 2,97 \mu\text{mol/L}$ do $32,81 \pm 2,99 \mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$). Bromperidol i kwetiapina zmniejszyły IC_{50} rywastygminy o odpowiednio: 48,3% i 45,9% ($p < 0,05$), natomiast benperidol oraz promazyna o odpowiednio: 38,2% i 31,2% ($p < 0,05$). W przypadku BuChE istotne statystycznie działanie wykazał penfluridol oraz promazyna, które zwiększyły IC_{50} rywastygminy o odpowiednio 23,7% i 30,0% ($p < 0,05$).
- Analiza wykonana w programie komputerowym ComboSyn, służącym do ilościowej oceny synergizmu lub antagonizmu dwóch leków, potwierdziła synergistyczne działanie **bromperidolu, benperidolu, pimozydu, kwetiapiny oraz promazyny**, które w eksperymentalnym badaniu wykazały **obniżenie IC_{50} donepezylu względem BuChE**, w stopniu istotnym statystycznie ($p < 0,05$). Wyniki analizy przeprowadzone dla mieszanin leków przeciwpsychotycznych **z rywastygminą względem AChE** potwierdziły wyniki otrzymane w badaniu eksperymentalnym dla **haloperidolu, bromperidolu, benperidolu, pimozydu, kwetiapiny oraz promazyny**, które istotnie statystycznie ($p < 0,05$) obniżyły IC_{50} rywastygminy.
- W badaniu wpływu leków przeciwpsychotycznych na proces agregacji $A\beta$ na etapie wczesnej fazy agregacji mierzonej w przedziale czasowym 10-60 min, najsilniejszą inhibicję zaobserwowano w przypadku obu stężeń **benperidolu (5 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$): 39,90 - 53,33%, bromperidolu (12,5 $\mu\text{g/L}$): 55,63% oraz promazyny (25 $\mu\text{g/L}$): 53,72 - 59,17%**. W fazie powstawania niewielkich form oligopeptydowych mierzonym po 90 minutach inkubacji najsilniejsze działanie hamujące agregacji $A\beta$ wykazała **promazyna (25 $\mu\text{g/L}$): 44,21%** ($p < 0,001$) oraz **benperidol (10 $\mu\text{g/L}$): 43,98%** ($p < 0,001$). Na etapie późnej fazy agregacji $A\beta$, mierzonym po 24 godzinach, najintensywniejsze hamowanie tworzenia fibryli odnotowano dla benperidolu (10 $\mu\text{g/L}$) i było

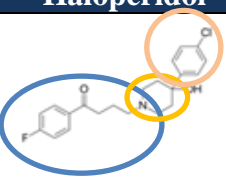
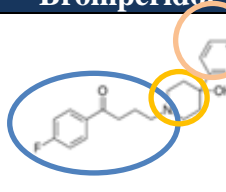
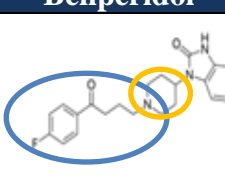
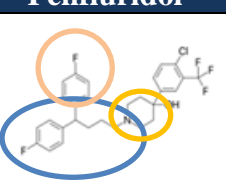
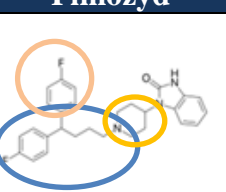
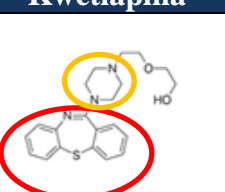
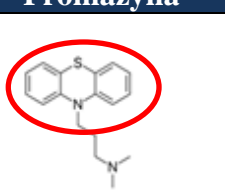
na poziomie 53,33% ($p < 0,001$). Natomiast po 48 godzinach inkubacji, najsilniejszą inhibicję agregacji $A\beta$, wynoszącą 51,18% ($p < 0,001$), odnotowano dla bromperidolu (12,5 $\mu\text{g/L}$) oraz promazyny (50 $\mu\text{g/L}$): 44,31% ($p < 0,001$).

- Badanie oceniające potencjalne właściwości antyoksydacyjne leków przeciwpsychotycznych, w modelu *in vitro* z użyciem ludzkich erytrocytów jako komórek modelowych, wykazało, że po 5 godzinach inkubacji w warunkach indukowanego AAPH stresu oksydacyjnego, jedynie **kwetiapina w stężeniu 80 $\mu\text{g/L}$** wykazała działanie protekcyjne w stosunku do błon białkowo-lipidowych erytrocytów i spowodowała statystycznie istotny spadek hemolizy do 23,92% w porównaniu z kontrolą z AAPH, która wynosiła 53,40% ($p < 0,001$).
- Tworzenie methemoglobiny pod wpływem mieszaniny leków przeciwpsychotycznych z AAPH, zostało zmniejszone po 5 godzinach inkubacji z **kwetiapiną w stężeniu 80 i 400 $\mu\text{g/L}$** o odpowiednio: 17,14% i 18,85% w odniesieniu do 61,93% dla kontroli AAPH. Natomiast po 24 godzinach inkubacji zmniejszenie utleniania hemoglobiny zaobserwowano dla **promazyny w stężeniu 10 i 50 $\mu\text{g/L}$** odpowiednio o 60,73% i 54,54% wobec 78,15% dla kontroli AAPH, co świadczy o potencjale ochronnym badanych związków przed niekorzystnym działaniem stresu oksydacyjnego na struktury białka hemoglobiny.
- Ocena wpływu badanych związków na żywołność i morfologię komórek w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego, w przypadku HUVEC, wykazała, że żywołność w próbach stymulowanych samym AAPH spadała do 39,13%, natomiast w komórkach preinkubowanych z AA (10 $\mu\text{g/mL}$) wynosiła 81,04%. Preinkubacja komórek z badanymi lekami przeciwpsychotycznymi wykazała efekt ochronny przed stresem oksydacyjnym na poziomie porównywalnym do działania AA. Najsilniejszy ochronny wpływ, zwiększający żywołność HUVEC zaobserwowano w przypadku **penfluridolu** w stężeniach 12,5 i 25 $\mu\text{g/L}$, dla którego żywołność wyniosła odpowiednio 80,50% i 82,89%. Badane związki nie wpłynęły znacząco na morfologię komórek śródbłonna.

- Badanie żywotności i morfologii komórek w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego, w przypadku hodowli astrocytów, wykazało ochronny wpływ na żywotność komórek tylko dla czterech badanych substancji: benperidolu (w stężeniach 5 i 10 µg/L), penfluridolu (12,5 µg/L), pimozydu (15 µg/L) i promazyny (25 i 50 µg/L). Z czego najsilniejsze właściwości protekcyjne odnotowano dla **benperidolu (5 µg/L)**, dla którego żywotność komórek wynosiła 81,86%, w porównaniu do komórek inkubowanych z samym AA: 72,91% oraz 65,92% dla kontroli inkubowanej tylko z AAPH. Badane związki nie wpłynęły na morfologię astrocytów.

W tabeli 46 i 47 dokonano skróconego zestawienia wszystkich otrzymanych wyników eksperymentów z zaznaczeniem różnic i podobieństw w strukturach chemicznych badanych leków przeciwpsychotycznych. Wyróżniającą aktywnością charakteryzowały się pochodne pochodne tiazepiny/fenotiazyny z atomem S i N (kwetiapina i promazyna), zaś wśród pochodnych butyrofenonu najaktywniejszy okazał się związek z ugrupowaniem Br-fenylowym, czyli bromperidol.

Tabela 46. Ocena siły działania badanych leków przeciwpsychotycznych w przeprowadzonych badaniach eksperymentalnych. Wartości statystycznie istotne na poziomie * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Nazwa związku	Haloperidol	Bromperidol	Benperidol	Penfluridol	Pimozyd	Kwetiapina	Promazyna
Struktura chemiczna							
Zakres terapeutyczny [#] [µg/L]	5-25	2,2-23,5	1-10	4-25	1-15	20-400	10-50
Inhibicja AChE (max. % inhibicji ^{##})	bz (+4,9%)	bz (+3,5%)	bz (+7,1%)	bz (+5,9%)	bz (+5,7%)	bz (+8,8%)	↑ (+10,19%)
Inhibicja BuChE (max. % inhibicji ^{##})	bz (+9,6%)	↑↑↑ (+32,2% ^{***})	bz (+7,5%)	bz (+3,6%)	bz (+7,6%)	↑↑↑ (+77,1% ^{***})	↑↑↑ (+85,7% ^{***})
IC ₅₀ BuChE [µmol/L]	nw	nw	nw	nw	nw	6,1 ± 1,63	0,2 ± 0,02
Inhibicja agregacji Aβ wczesnej (10-60 min) (max. % inhibicji ^{##})	↑↑ (+22,58% ^{***})	↑↑↑ (+55,63% ^{***})	↑↑↑ (+53,21% ^{***})	↑↑ (+39,79% ^{***})	↑↑ (+34,88% ^{***})	↑↑ (+39,92% ^{***})	↑↑↑ (+59,17% ^{***})
Inhibicja agregacji Aβ (90 min) (max. % inhibicji ^{##})	↑ (+11,31%)	↑↑ (+20,89% ^{***})	↑↑↑ (+43,98% ^{***})	bz (+8,13%)	↑↑ (+23,06% ^{***})	↑↑ (+27,12% ^{***})	↑↑↑ (+44,21% ^{***})
Inhibicja agregacja Aβ późnej (24 i 48 h) (max. % inhibicji ^{##})	↑↑ (23,03% ^{**})	↑↑↑ (+51,18% ^{***})	↑↑↑ (+53,33% ^{***})	↑↑ (+29,29% [*])	↑↑ (+37,92% ^{***})	↑↑ (+32,97% ^{**})	↑↑↑ (+44,31% ^{***})

nw – nie wyznaczono; bz – brak zmian; ↑ słabe działanie; ↑↑ umiarkowane działanie; ↑↑↑ silne działanie;

[#] Dla każdego związku podano zakres stężeń terapeutycznych w osoczu [203-214].

^{##} Maksymalny % inhibicji w badanym zakresie stężeń dla danego związku. Istnieje różnica statystycznie istotna * $p < 0,05$; ** $p = 0,01 - 0,001$, *** $p < 0,001$.





 pochodne butyrofenonu  pochodne piperidyny/piperazyny  ugrupowania Br/F/Cl-fenyłowe  pochodne tiazepiny/fenotiazyny z atomem S i N

Tabela 47. Ocena potencjału antyoksydacyjnego badanych leków przeciwpsychotycznych w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego. Wartości statystycznie istotne na poziomie * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Nazwa związku		Haloperidol	Bromperidol	Benperidol	Penfluridol	Pimozyd	Kwetiapina	Promazyna
Struktura chemiczna								
Zakres terapeutyczny [#] [µg/L]		5-25	2,2-23,5	1-10	4-25	1-15	20-400	10-50
Potencjał antyoksydacyjny w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego	W modelu RBC (% inhibicji ^{##}) (5h)	↑ (+11,83%)	↑ (+11,45%)	bz (+1,75%)	↑ (+10,02% ***)	bz (-0,20%)	↑↑ (+29,50% ***)	bz (+5,03%)
	W modelu RBC (% inhibicji ^{##}) (24h)	bz (-10,43%)	bz (-9,92%)	bz (-3,99%)	bz (-6,45%)	bz (-3,68%)	bz (-5,90%)	bz (+3,27%)
	↓ [MetHb] (% inhibicji ^{##}) (5h)	↑ (+13,41% *)	↑↑ (+30,20% **)	↑ (+12,18%)	bz (-6,12%)	bz (-2,97%)	↑↑↑ (+44,79% ***)	bz (+8,52%)
	↓ [MetHb] (% inhibicji ^{##}) (24h)	bz (-8,49%)	bz (-9,42%)	bz (-13,49%)	bz (+0,13%)	bz (-5,97%)	bz (+8,17%)	↑↑ (+23,61% ***)
	W modelu HUVEC ^{###}	↑↑↑ (+76,74% ***)	↑↑↑ (+82,53% **)	↑↑↑ (+82,91% **)	↑↑↑ (+82,89% **)	↑↑↑ (+65,25% ***)	↑↑↑ (+74,96% ***)	↑↑↑ (+72,30% ***)
	W modelu astrocytów ^{###}	↑↑↑ (+74,35% ***)	↑↑↑ (+70,81% ***)	↑↑↑ (+81,86% ***)	↑↑↑ (+78,09% ***)	↑↑↑ (+75,74% ***)	↑↑↑ (+75,63% ***)	↑↑↑ (+77,60% ***)

nw – nie wyznaczono; bz – brak zmian; ↑ słabe działanie; ↑↑ umiarkowane działanie; ↑↑↑ silne działanie;

[#] Dla każdego związku podano zakres stężeń terapeutycznych w osoczu [203-214].

^{##} Maksymalny % inhibicji w badanym zakresie stężeń dla danego związku. Istnieje różnica statystycznie istotna * $p < 0,05$; ** $p = 0,01 - 0,001$, *** $p < 0,001$.

^{###} Maksymalna żywotność komórek w badanym zakresie stężeń dla danego związku. Istnieje różnica statystycznie istotna * $p < 0,05$; ** $p = 0,01 - 0,001$, *** $p < 0,001$.

○ pochodne butyrofenonu ○ pochodne piperidyny/piperazyny ○ ugrupowania Br/F/Cl-fenylowe ○ pochodne tiazepiny/fenotiazyny z atomem S i N

Dyskusja wyników

AD jest mieszaną proteinopatią $A\beta$ oraz białka tau, często powiązaną z innymi patologicznymi zmianami związanymi z wiekiem, wśród których wymienić można chorobę naczyń mózgowych oraz wystąpienie ciał Lewy'ego. AD stanowi najczęstszą przyczynę demencji na całym świecie. W obrazie klinicznym AD charakterystyczne są postępujące deficyty funkcji poznawczych, zwłaszcza pamięci, jak również inne zaburzenia, takie jak pobudzenie, apatia, czy objawy psychiatryczne. Objawy te wynikają z występowania mózgowej angiopatii amyloidowej, wewnątrzkomórkowego zwyrodnienia neurofibrylarnego oraz blaszek amyloidowych będącymi zewnątrzkomórkowymi złogami amyloidu. Oprócz typowego wariantu – amnestycznego, coraz częściej rozpoznawane są również warianty atypowe dla AD: czołowy, językowy (logopeniczny) oraz tylny (wzrokowy). W obrazie klinicznym pierwszego wariantu występuje afazja pierwotna postępująca, objawiająca się jako typ agramatyczny, semantyczny lub też logopedyczny. W przypadku drugiej atypowej postaci, oszczędzającej hipokamp, dochodzi do tylnego zaniku kory mózgowej (PCA, posterior cortical atrophy), w wyniku czego pacjenci mają stosunkowo dobrze zachowaną pamięć, jednak doświadczają problemów ze wzrokiem, mają trudności z czytaniem, rozpoznawaniem twarzy, czy obiektów na zdjęciach [9,243].

Poza dwoma przeciwciałami monoklonalnymi wprowadzonymi w ostatnich latach: aducanumabem i lecanemabem, redukującymi nagromadzenie w mózgu złogów $A\beta$, w dalszym ciągu brakuje skutecznych opcji leczenia modyfikujących przebieg AD [244-247]. Leki te zostały dopuszczone do obrotu w procedurze przyspieszonej ścieżki rejestracyjnej, co wiąże się z brakiem danych dotyczących skuteczności i bezpieczeństwa stosowania leku na wcześniejszych lub późniejszych etapach choroby niż te, które badano [245,248]. W przypadku aducanumabu należy zauważyć, że w czerwcu 2021 roku został on zatwierdzony do leczenia AD jedynie w USA, natomiast w Europie pierwszy wniosek rejestracyjny został odrzucony w grudniu 2021 r. przez Europejską Agencję Leków (EMA, European Medicines Agency), powołującą się na brak jednoznacznych dowodów skuteczności oraz bezpieczeństwa tego leku [244,249-251]. W kontekście bezpieczeństwa obawy może budzić ryzyko krwotoków mózgowych, które jest podwyższone u pacjentów przyjmujących leki przeciwwzakrzepowe. Najczęstszymi działaniami niepożądanymi obu leków są

nieprawidłowości w obrazowaniu mózgu związane z amyloidem (ARIA, amyloid-related imaging abnormalities), które występować mogą jako obrzęki (ARIA-E, amyloid-related imaging abnormalities – oedema) lub krwotoki (ARIA-H, amyloid-related imaging abnormalities – haemorrhages) [245,248,252].

W przypadku występowania w obrazie klinicznym, u chorych na AD, zaburzeń neuropsychiatrycznych, takich jak pobudzenie i agresja zwykle włączane są do farmakoterapii leki przeciwpsychotyczne, jednak ich wpływ na funkcje poznawcze i bezpieczeństwo stosowania w tej chorobie nie został w pełni poznany. Lekami pierwszego wyboru w leczeniu objawów behawioralnych i psychiatrycznych u osób z AD są zazwyczaj atypowe leki przeciwpsychotyczne [9,253]. Metaanaliza wykonana przez da Silva i współautorów [254] na podstawie randomizowanych, wielośrodkowych badań z grupą kontrolną, wykazała, że leki przeciwpsychotyczne nie wydają się poprawiać stanu pacjentów na tyle, aby ich potrzeby opiekuńcze uległy zmniejszeniu, jednak brak bezpieczniejszych alternatyw wymusza stosowanie leków przeciwpsychotycznych w neuropsychiatrycznych objawach otępienia [254,255]. Z tego powodu istotne jest badanie działania leków przeciwpsychotycznych nie tylko na aktywność ludzkich cholinesteraz (hChEs, human cholinesterases), ale także ich potencjalnego synergistycznego lub antagonistycznego działania z lekami stosowanymi w leczeniu AD. W badaniach *in silico* Kumar i współautorzy [16] przyjęli metodę obliczeniową opartą na interakcji ligand-białko w celu zbadania potencjału leków przeciwpsychotycznych w leczeniu AD. Wyniki ich badań wykazały, że niektóre leki przeciwpsychotyczne mogą posiadać obiecującą aktywność względem wybranym celom biochemicznym charakterystycznych dla AD.

Należy jednak mieć na uwadze, że w przypadku podejścia polegającego na zmianie przeznaczenia leku opracowanego *in silico* może istnieć możliwość fałszywie dodatnich wyników podczas badań przesiewowych. Ponadto, należy wziąć pod uwagę, że aktywność potencjalnych cząsteczek leku może się różnić w modelach *in vitro* i *in vivo*. Niemniej jednak poszukiwanie potencjału leków przeciwpsychotycznych, jako leków przeciw AD, jest uzasadnione, ponieważ wszystkie przenikają przez barierę krew-mózg. Istnieje zatem szansa, że będą one oddziaływać również na główne hipotezy patomechanizmu AD *in vivo*. Na podstawie wyników badań *in silico* wskazujących na możliwy potencjał leków przeciwpsychotycznych w leczeniu AD sformułowana została hipoteza badawcza w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej. Miała ona na celu zweryfikowanie siły działania wybranych leków

przeciwpyschotycznych w badaniach *in vitro* w kontekście trzech podstawowych hipotez rozwoju AD, tj. hipotezie cholinergiczej, hipotezie amyloidowej oraz stresu oksydacyjnego, co mogłoby dać podstawy do dalszego badania tych leków pod kątem rozszerzenia ich zastosowania w praktyce klinicznej lub zastosowania ich struktur wiodących jako cząsteczek modelowych do dalszych poszukiwań nowych aktywnych substancji. Poszukiwanie nowych aktywności zarejestrowanych już leków wpisuje się w aktualny trend repozycjonowania lub reprofilingu leków [16,256]. Uważa się, że zmiana przeznaczenia leku daje większe korzyści niż odkrywanie leków *de novo*, szczególnie jeśli chodzi o skrócenie czasu i zmniejszenie kosztów związanych z badaniami wstępnymi, przesiewową analizą aktywności *in vitro* i *in vivo* czy badaniami klinicznymi [256-258].

Kumar i współautorzy [16] w swoim badaniu wykonali dokowanie molekularne dla około 150 leków przeciwpyschotycznych, a najlepsze leki zostały porównane ze znanym już inhibitorem odpowiednich białek. Spośród przebadanych leków, sulmepryd, chlorowoderek promazyny, bromperidol, anizopirol, melperon, pimozyd, benperidol, azabuperon i anisoperydon znacząco wchodziły w interakcje z wybranymi celami białkowymi AD, wykazując stosunkowo lepszy wynik dokowania i energię wiązania w porównaniu z już znanymi inhibitorami odpowiednich celów molekularnych [16]. W przypadku AChE najlepsze dokowanie Kumar i współautorzy [16] zaobserwowali dla pimozydu, który uzyskał wynik -14,969 i energię poślizgu - 50,362 kcal/mol, w odniesieniu do znanego inhibitora – donepezilu, dla którego wartości te wyniosły odpowiednio: - 11,02 oraz - 27,944 kcal/mol. Natomiast w przypadku BuChE, najlepiej rokującym związkiem okazał się być bromperidol, dla którego wynik dokowania wyniósł: - 8,111, a energia poślizgu: - 42,936 kcal/mol, w porównaniu do związku odniesienia – rywastygminy, charakteryzującego się wartościami odpowiednio na poziomie: - 3,123 oraz - 35,510 kcal/mol [16].

Hamowanie aktywności enzymów stanowi główną strategię w projektowaniu leków. Koncepcja połowy maksymalnego stężenia hamującego (IC_{50}) jest szeroko stosowana do badania odwracalnych reakcji enzymatycznych. Możliwość dokładnego pomiaru stężenia inhibitora, które jest wymagane do zahamowania danej funkcji biologicznej lub biochemicznej o połowę, jest niezwykle ważna w projektowaniu rankingu skuteczności działania związków [259]. W przypadku AD, jedną z pierwszych hipotez, opisującą prawdopodobną przyczynę rozwoju tej choroby, jest hipoteza cholinergiczna, która wskazuje na niedobór neuroprzekaźnika w szlaku

cholinergicznym w OUN, uczestniczącego w komunikacji komórek nerwowych [260]. Neurotransmisja cholinergiczna może ulec zmniejszeniu m.in. wskutek degeneracji komórek nerwowych w jądrze podstawnym Meynert'a i istocie bezimiennej czy też obniżenia aktywności ChAT, która bierze udział w syntezie ACh. Powstały mózgowy deficyt cholinergiczny prowadzi do utraty pamięci i innych charakterystycznych dla choroby objawów poznawczych [260-262]. ACh hydrolizowana jest głównie przez dwa izoenzymy należące do cholinoesteraz: AChE oraz BuChE [260]. Szczegółowa analiza ligand-białko wykonana dla AChE wykazała, że miejscami aktywnymi tego enzymu, które odgrywają kluczową rolę w wiązaniu i przetwarzaniu substratu acetylocholinę są katalityczne miejsce anionowe (CAS, catalytic active site) i peryferyjne miejsce anionowe (PAS, peripheral anionic site) [260,263-266]. PAS uważane jest za miejsce rozpoznawania ACh jako substratu, a ważnym aminokwasem biorącym w tym udział w jego wiązaniu jest tryptofan (W286) [260,263]. Z obwodowego miejsca katalitycznego substrat transportowany jest przez miejsce nazywane wąskim „gardłem” lub też „wąwozem” do CAT, obejmującego katalityczną triadę aminokwasów: seryny (S203), histydyny (H447) i kwasu glutaminowego (E334) [263,265,266].

Chociaż wydaje się, że AChE odgrywa kluczową rolę w regulacji poziomu ACh ze względu na jej aktywność w mózgu osoby zdrowej, to jednak w późnej patologii AD aktywność AChE stopniowo spada, podczas gdy poziom BuChE drastycznie wzrasta w tym czasie [260,267]. BuChE wykryto w blaszkach A β i NFT, co sugeruje, że enzym ten może nie tylko odgrywać ważną rolę w regulacji neuroprzeżywalności acetylocholinergicznego, ale także bezpośrednio przyczyniać się do patogenezы AD. Zgodnie z pracą opublikowaną przez Schwarthoff'a i współautorów [268] coraz więcej dowodów wskazuje na kluczową rolę BuChE w patogenezы AD i sugeruje, że istnieje wartość terapeutyczna leków, które hamują BuChE silniej niż AChE [268].

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej badania leków przeciwpsychotycznych dotyczące hamowania hChE wykazały, że najsilniejsze działanie hamujące aktywność BuChE wykazały kwetiapina i promazyna, będące pochodnymi odpowiednio tiazepiny i fenotiazyny. Na podstawie otrzymanych wyników obliczone zostały wartości IC₅₀ względem BuChE dla tych związków. Dla promazyny wartość ta wynosiła 0,19 ± 0,02 μ mol/L, wykazując 5-krotnie silniejszą inhibicję BuChE w porównaniu z rywastygminą i 67-krotnie silniejszą w odniesieniu do donepezylu. Natomiast dla kwetiapiny wartość ta była na poziomie 6,08 ± 1,63

$\mu\text{mol/L}$, czyniąc ją 6-krotnie wyższą w odniesieniu do rywastygminy i dwukrotnie wyższą względem donepezylu. Otrzymane wyniki wpisują się w założenia Schwarthoff'a i współautorów [268] mówiące o kluczowym znaczeniu BuChE w patologii AD. Aktywność promazyny i kwetiapiny może być związana z obecnością w strukturze układu trójpierścieniowego zawierającego azot i siarkę. Zgodnie z doniesieniami Debord'a i współautorów [269] jak również Darvesh'a i współautorów [270], promazyna oraz inne pochodne fenotiazyny wykazują zdolność hamowania ChE, szczególnie BuChE. Debord [269] wykorzystał etopropazynę z ugrupowaniem N-dietylaminyowym jako związek modelowy do opracowania zależności struktura-aktywność wiązania fenotiazyn z BuChE. Badanie wykonane *in silico* w odpowiednim programie wykazało, że aktywnymi miejscami tego enzymu są tryptofan, który oddziałuje z pierścieniem fenotiazyny oraz fenyloalanina oddziałująca z łańcuchem alkilowym etopropazyny [269,271]. Wysoce selektywne hamowanie BuChE przez niektóre pochodne fenotiazyny, takie jak np. etopropazyna zostało opisane również przez Tasso i współautorów [272].

Z kolei Obara i współautorzy [273] zbadali 26 dostępnych klinicznie leków przeciwpsychotycznych pod kątem potencjalnej inhibicji rekombinowanej ludzkiej AChE (rhAChE, recombinant human acetylcholinesterase) oraz sprawdzeniu czy hamowanie AChE odgrywa rolę w wystąpieniu objawów pozapiramidowych (EPS, extrapyramidal symptoms), które mogą być spowodowane nie tylko supresją nerwów dopaminergicznych, ale także bezpośrednim zwiększeniem aktywności neuronów cholinergicznych. Dlatego leki przeciwpsychotyczne o działaniu hamującym AChE, oprócz antagonistycznego działania na receptory D_2 , mogą zwiększać stężenie ACh w prążkowie oraz nasilać funkcję GABAergiczną, co może zwiększać ryzyko wystąpienia EPS. W przeprowadzonych badaniach Autorzy wykazali, że w stężeniu 10–5 mol/L haloperidol, bromperidol i pimozyd hamowały aktywność rhAChE o >20% [273]. W pracy doktorskiej wyniki hamowania AChE dla tych substancji nie przekroczyły 10%. Należy jednak zauważyć, że praca doktorska opierała się w założeniach na stosowaniu stężeń z zakresu terapeutycznego leków, które osiągnęte są w osoczu i stąd do badania inhibicji enzymatycznej użyte zostały stężenia leków 0,1 – 100 $\mu\text{g/L}$, czyli stężenia rzędu 10^{-10} - 10^{-7} mol/L. Wyjątek stanowi kwetiapina, której badany zakres dla inhibicji AChE oraz BuChE wynosił 10^{-8} - 10^{-4} mol/L, co pozwoliło na porównanie otrzymanych wyników z wynikami Obara i współautorów [273]. W obu pracach inhibicja AChE nie przekroczyła 10%.

Po określeniu wartości stężenia IC_{50} kolejnym istotnym krokiem, przy opisywaniu działania inhibitorów enzymatycznych, jest określenie mechanizmu inhibicji. W tym celu wykonane zostały dalsze badania, w których stosując malejące stężenia substratu, określono aktywność enzymu wobec obecności potencjalnego inhibitora (w stałym stężeniu), co pozwoliło na wykreślenie zależności opisanej równaniem Hanesa-Woolfa oraz wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji. Parametry kinetyczne reakcji enzymatycznych wyznaczone dla donepezilu i rywastygminy zgodne są z doniesieniami literaturowymi. Wyniki badań *in vitro* przedstawione w literaturze [274-276] opisują donepezil jako odwracalny, mieszany inhibitor AChE, który wykazuje względną selektywność wobec AChE w porównaniu z BuChE [274-277]. Zgodnie z doniesieniami Makarian'a i współautorów [263] donepezil oddziałuje zarówno z PAS jak i CAT [263]. Za wiązanie z obwodowym miejscem anionowym AChE, poprzez interakcje π - π układów aromatycznych, odpowiedzialne jest ugrupowanie indanonu obecne w donepezilu. Natomiast pierścień piperidynowy oddziałuje z aminokwasem tyrozyną (Y337) znajdującym się w anionowej części katalitycznego miejsca aktywnego. Ugrupowanie benzytowe donepezilu znajduje się w bliskim sąsiedztwie aminokwasów należących do triady katalitycznej. Wykazano również, że modyfikacja pierścienia benzenowego wchodzącego w strukturę donepezilu może prowadzić do silnego hamowania AChE [263].

Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania potwierdziły, że donepezil hamuje zarówno AChE, jak i BuChE w sposób mieszany, w którym oba parametry kinetyczne opisujące reakcję enzymatyczną ulegają zmianie (K_{mi} wzrasta w stosunku do K_m enzymu, V_{maxi} maleje w porównaniu z V_{max}). Rywastygmina jest pseudonieodwracalnym, podwójnym inhibitorem, działającym zarówno na AChE, jak i na BuChE [275,276]. Wiadomo, że po związaniu następuje karbamiłowanie reszty seryny w miejscu aktywnym AChE. Jest to jednak zjawisko przejściowe i enzym powraca do swojej pierwotnej postaci po hydrolizie wiązania enzym-karbaminian. Z drugiej strony, dostępnych jest niewiele informacji na temat molekularnej natury interakcji BuChE-rywastygmina.

Ludzkie enzymy BuChE i AChE mają względem siebie ponad 65% homologii sekwencji aminokwasów [275]. BuChE jest interesującym celem do badań, ponieważ jego aktywność znacznie wzrasta w późniejszych stadiach AD. Wykazano również, że zwiększona aktywność BuChE odgrywa ważną rolę w agregacji $A\beta$

we wczesnych stadiach tworzenia się blaszek amyloidowych [260,267,275]. Bacalhou i współautorzy [275] w ramach programu badań przesiewowych dotyczących projektowania nowych analogów rywastygminy, które skutecznie hamują BuChE zbadali interakcję tego inhibitora z BuChE, stosując zintegrowane badanie biofizyczne, łączące różnicę transferu nasycenia (STD, saturation transfer difference) - NMR i dokowanie molekularne. Wyniki tego badania wykazały, że najbardziej dominujące były interakcje pomiędzy karbonyłem karbaminianu inhibitora a grupą NH jednostki imidazolowej aminokwasu H434, poprzez wiązanie wodorowe, ułożenie jednostki aromatycznej inhibitora oraz jednostki aromatycznej W82 w kieszeni wiążącej cholinę poprzez interakcje π - π i możliwe interakcje CH/ π pomiędzy benzyłową grupą metylową i grupami N-metylowymi inhibitora z aminokwasem W82 enzymu [275].

W przeprowadzonych badaniach eksperymentalnych w ramach rozprawy doktorskiej, w przypadku rywastygminy, inhibicja aktywności BuChE okazała się mieć charakter niekompetycyjny, ponieważ wartość K_{mi} nie różniła się od wartości K_m czystego enzymu, podczas gdy V_{maxi} uległa zmniejszeniu w stosunku do V_{max} . Ten sam typ inhibicji wykazano również dla rywastygminy w stosunku do AChE oraz dla kwetiapiny i promazyny w odniesieniu do BuChE.

Ze względu na wieloczynnikową patogenezę AD, najbardziej praktycznym podejściem do modyfikacji przebiegu progresji AD wydaje się terapia ukierunkowana na kilka celów molekularnych procesów patologicznych związanych z tą chorobą. Kabir i współautorzy [278] w swojej pracy opisują, że skuteczność kliniczna terapii skojarzonej jest większa niż monoterapii. Wyniki badań [278] wskazują, że terapia skojarzona wykorzystująca memantynę i ChEIs zmniejsza tempo pogorszenia funkcji poznawczych. Co więcej, w porównaniu z brakiem leczenia lub monoterapią ChEIs, terapie skojarzone mogą zmniejszyć pojawianie się oraz nasilanie się objawów neurobehawioralnych, np. agresji czy pobudzenia oraz opóźniają konieczność hospitalizacji pacjenta. Wykazano również, że w przypadku AD i spowalniania stopnia upośledzenia funkcji poznawczych terapie skojarzone są skuteczniejsze zwłaszcza, jeśli zostaną wcześniej rozpoczęte [278]. Hu i współautorzy [279] w swoich badaniach również wykazują trend poszukiwania synergizmów w działaniu leków w celu optymalizacji leczenia AD. Zespół ten wykazał synergistyczne działanie leków przeciwnadciśnieniowych (aHTN, antihypertensives) i ChEIs w kontekście pogorszenia się funkcji poznawczych u pacjentów z AD. Najwolniejszy spadek funkcji poznawczych stwierdzono dla połączenia ChEIs z lekami moczopędnymi, blokerami

układu renina-angiotensyna-aldosteron i blokerami kanału wapniowego. Uzyskane wyniki sugerują, że poprawa stanu naczyń jest niezbędna w leczeniu AD i wyznacza nowy kierunek rozwoju leków na AD [279]. Również dla Teo i współautorów [280] obecność dających się oddzielić stanów patologicznych stworzyła okazję do zbadania terapii skojarzonych, które ukierunkowane są na te różne procesy oddzielnie. W swojej pracy [280] skupili się na dysfunkcji mitochondriów i upośledzeniu proteostazy, będącymi powiązаныmi procesami patologicznymi występującymi w AD. W związku z tym, podjęli się zbadania połączenia metforminy, działającej na mitochondria i metabolizm energetyczny oraz litu, działającego na proteostazę. Wyniki leczenia skojarzonego metforminą i litem wykazały efekt synergistyczny poprzez wzrost długości życia i zmniejszenie zachorowalności [280].

Uzyskane wyniki oceny synergizmu leków przeciwpsychotycznych ze znanymi ChEIs potwierdzają potencjalną wartość kliniczną kwetiapiny oraz promazyny w leczeniu AD, poprzez najsilniejsze obniżenie IC_{50} spośród badanych leków. Jako wzorcowe inhibitory ChE zastosowano w badaniach donepezil i rywastygminę. Spośród badanych leków przeciwpsychotycznych najsilniejszy synergizm z donepezilem wykazała promazyna obniżając IC_{50} dla BuChE o 64,8%. Dla mieszaniny binarnej IC_{50} wyniosło $4,51 \pm 0,19 \mu\text{mol/L}$, w odniesieniu do samego donepezilu, w przypadku którego IC_{50} wyniosło $12,81 \pm 1,52 \mu\text{mol/L}$ ($p < 0,05$). Bromperidol, benperidol, pimozyd i kwetiapina okazały się lekami, które również wykazały synergizm działania z donepezilem zmniejszając IC_{50} donepezilu o 43,8 – 57,9% ($p < 0,05$). IC_{50} względem AChE nie uległo statystycznie istotnej zmianie pod wpływem mieszanin binarnych donepezilu z badanymi leki przeciwpsychotycznymi.

Połączenie rywastygminy z pimozydem okazało się mieć największy wpływ na inhibicję AChE spośród badanych mieszanin binarnych leków przeciwpsychotycznych z rywastygminą. W porównaniu do czystej rywastygminy, IC_{50} uległo zmniejszeniu o 51,0% (z $64,29 \pm 2,97 \mu\text{mol/L}$ do $32,81 \pm 2,99 \mu\text{mol/L}$, $p < 0,05$). Wyniki te sugerują, że jednoczesne stosowanie rywastygminy z pimozydem może potencjalizować efekty względem AChE. Kolejne związki, bromperidol i kwetiapina zmniejszyły IC_{50} rywastygminy odpowiednio o: 48,3% i 45,9% ($p < 0,05$), natomiast benperidol oraz promazyna odpowiednio o: 38,2% i 31,2% ($p < 0,05$). W przypadku BuChE istotne statystycznie działanie wykazał penfluridol oraz promazyna, które zwiększyły IC_{50} rywastygminy o odpowiednio 23,7% i 30,0% ($p < 0,05$).

Zagadnienie wystąpienia interakcji pomiędzy lekami stosowanymi w leczeniu zaburzeń funkcji poznawczych w AD, a lekami przeciwpsychotycznymi podjęli również Wadenberg i współautorzy [281]. Zespół ten przeprowadził badania dotyczące synergistycznego działania galantaminy z lekami przeciwpsychotycznymi: risperidonem, haloperidolem w celu zmniejszenia objawów negatywnych, psychotycznych oraz poprawy funkcji poznawczych w schizofrenii. Dane z badań klinicznych sugerują, że galantamina może wykazywać pewne działanie prokognitywne, a także przeciwpsychotyczne w schizofrenii, ponieważ jest zarówno inhibitorem AChE, jak i modulatorem receptora nikotynowego (nAChR, nicotinic acetylcholine receptor). Wadenberg i współautorzy [281] na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzili wzmocnienie działania galantaminy, podobne do efektu leków przeciwpsychotycznych, stosując małe dawki haloperidolu lub rywastygminy. Bezpieczny profil działania, pod kątem wystąpienia EPS, odnotowali jedynie w połączeniu z risperidonem. Otrzymane dane eksperymentalne sugerują, że oddziaływanie modulujące galantaminy na nAChR prawdopodobnie przyczynia się do poprawy aktywności prokognitywnej, natomiast przypuszczalne działanie przeciwpsychotyczne galantaminy wydaje się wynikać głównie z oddziaływania na receptor muskarynowy (mAChR, muscarinic acetylcholine receptor). Kombinacja tych właściwości galantaminy może oferować unikalny profil terapeutyczny, jednak zależność ta nie została jeszcze w pełni zbadana [281].

W celu porównania wyników otrzymanych z badania interakcji leków przeciwpsychotycznych z rywastygminą i donepezilem z interakcjami, które proponowane są w oparciu o analizę matematyczną z wykorzystaniem modelu Chou-Talalay, została wykonana również ocena potencjalnego działania synergistycznego leków przeciwpsychotycznych ze wzorcowymi AChEIs w programie komputerowym ComboSyn, służącego do ilościowego określenia synergizmu lub antagonizmu dla dwóch leków. Program ten został również wykorzystany przez Chandel i współautorów [59] do oceny działania przeciwoamyloidogenego chlorowodoru benzerazydu i lewodopy pojedynczo oraz w mieszaninie binarnej (benzerazyd + lewodopa). Połączenie dwóch leków wykazało synergizm (wskaźnik kombinacji, $CI < 1$) pomiędzy nimi [282].

Wyniki otrzymane w badaniach prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej potwierdziły synergistyczne działanie bromperidolu, benperidolu, pimozydu,

kwetiapiny, promazyny, które w eksperymentalnym badaniu wykazały obniżenie IC_{50} donepezilu względem BuChE, w stopniu istotnym statystycznie ($p < 0,05$). Wyniki analizy przeprowadzone dla mieszanin leków przeciwpsychotycznych z rywastygminą względem AChE potwierdziły wyniki otrzymane w badaniu eksperymentalnym dla haloperidolu, bromperidolu, benperidolu, pimozydu, kwetiapiny oraz promazyny, które istotnie statystycznie ($p < 0,05$) obniżyły IC_{50} rywastygminy.

Z klinicznego punktu widzenia wyniki te powinny być brane pod uwagę przy ustalaniu dawek leków w leczeniu pacjentów z AD i chorobami współistniejącymi. Terapia skojarzona chorych na AD może być preferowana ze względu na jej skuteczność i możliwość zmniejszenia dawki donepezilu lub rywastygminy w razie zaistnienia takiej potrzeby. To z kolei może skutkować zmniejszeniem działań niepożądanych, które często są spowodowane stosowaniem donepezilu lub rywastygminy.

Kolejną, istotną hipotezą opisującą patogenezę AD stanowi powstawanie blaszek amyloidowych, które składają się ze zagregowanych włókienek $A\beta$, których złogi gromadzą się w mózgu. Hamowanie agregacji $A\beta$ jako kluczowy element terapii AD zostało opisane przez Hardy'ego w 1991 roku [283,284] i do tej pory stanowi podstawę w poszukiwaniu nowych leków w tej chorobie. Firmy farmaceutyczne nieustannie opracowują nowe środki, które są na różnych etapach badań klinicznych ukierunkowanych na hamowanie kaskady amyloidu [285-287]. Najbardziej powszechnymi technikami identyfikacji obecności włókienek $A\beta$ stosowanymi w warunkach *in vitro*, są testy wiązania barwników z wykorzystaniem czerwieni Kongo (CR, Congo red) i ThT. Służą one również do badania agregacji cząsteczek amyloidogennych oraz do oceny małowczątkowych inhibitorów agregacji i fibrylizacji amyloidu [288,289]. Do badań wymagających utrzymania cząsteczki w postaci monomerycznej stosuje się spektroskopię dichroizmu kołowego, ze względu na fakt, że wiele peptydów i białek tworzących amyloid jest wysoce podatnych na agregację *in vitro* [288]. Test ThT mierzy zmianę intensywności fluorescencji barwnika ThT po związaniu z $A\beta$. Wzmocnioną fluorescencję można zaobserwować za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej lub spektroskopii fluorescencyjnej. Test spektroskopowy jest powszechnie stosowany do monitorowania tworzenia się włókienek w czasie, ale nie jest to oznaczenie ściśle ilościowe dla próbek po liofilizacji [288]. Jednoznaczny obraz złogów $A\beta$ uzyskać można przy zastosowaniu spektroskopii

w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR, Fourier-transform infrared spectroscopy) oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), które służą głównie do wykrywania obecności struktury drugorzędowej $A\beta$. Zwykle próbkę bada się przed i po agregacji, a następnie obserwuje wzrost struktury drugorzędowej po utworzeniu włókienek amyloidowych [288]. W ostatnich latach nastąpił szybki rozwój obrazowania fluorescencyjnego w bliskiej podczerwieni (NIRF, near-infrared fluorescence) ze względu na jego wysoką czułość, nieinwazyjność, prostą obsługę i możliwość uniknięcia zakłóceń spontanicznej fluorescencji w tkankach biologicznych. Podczas konwencjonalnego obrazowania fluorescencyjnego w zakresie widzialnym zarówno wzbudzenie, jak i emisja są pochłaniane lub rozpraszane przez tkankę, co powoduje znaczne osłabienie wykrytego sygnału emisji. NIRF stał się niezbędnym narzędziem do analizy próbek biologicznych *in vitro* i obrazowania *in vivo* małych zwierząt [290].

Wobec dużej różnorodności dostępnych metod oceniających agregację $A\beta$, kierując się dostępnością aparaturową, w ramach niniejszej pracy, w oparciu o dane literaturowe, przygotowano i zwalidowano metodę oceny inhibicji agregacji. W tym celu wykorzystano właściwości fluorescencyjne barwnika ThT, który indukuje fitylację $A\beta$. Mierzono intensywność fluorescencji w szerokich interwałach czasowych: 10, 30, 60, 90 minut po dodaniu ThT, co odpowiada wczesnej fazie tworzenia fibryli, aż do 24 i 48 godzin, co odpowiada późnej fazie agregacji. Za 100% agregacji $A\beta$ przyjęto intensywność fluorescencji zmierzoną dla próby kontrolnej, bez dodatku związków, która została następnie wykorzystana do wyznaczenia stopnia inhibicji agregacji $A\beta$ pod wpływem badanych leków przeciwpsychotycznych. W toku wstępnych badań doświadczalnych, dotyczących odpowiedniego doboru warunków pomiaru (dobór odpowiednich stężeń reagentów, rodzaju inhibitorów, temperatury i czasu inkubacji, długości fali) opracowano procedurę końcową oceny agregacji oraz inhibicji $A\beta$. Dla opracowanej metody wyznaczono współczynnik zmienności na zadowalającym poziomie 4,55%.

Tworzenie włókienek $A\beta$ można podzielić na następujące fazy: początkową, elongacji i stacjonarną [291,292]. Monomery łączą się ze sobą, tworząc większe kompleksy, od dimerów po heptamery. Następnie następuje wzrost w większe oligomery, które ostatecznie tworzą protofibryle, z których powstają dojrzałe fibryle [293-295]. Z danych literaturowych wynika, że proces powstawania włókien przebiega przez etap oligomerów, charakteryzujących się znacznie wyższą toksycznością

niż monomeryczne formy $A\beta$. Obecność oligomerów przyczynia się w największym stopniu do degeneracji synaps i przyczynia się do wystąpienia objawów AD [296,297]. Biorąc pod uwagę wieloetapowy charakter agregacji $A\beta$, można stwierdzić, że zahamowanie wczesnej fazy agregacji hamuje powstawanie mniejszych agregatów $A\beta$, podczas gdy badania wykonywane w odstępach kilkugodzinnych wskazują na hamowanie powstawania dużych włókien. Już w latach 90-tych XX wieku zwrócono uwagę, że częstość występowania AD jest znacznie zmniejszona u osób w podeszłym wieku chorych na schizofrenię i zaproponowano pogląd, że przyczyną mogą być leki stosowane w leczeniu schizofrenii. Higaki i współautorzy [298] badaniom poddali haloperidol, jako lek przeciwpsychotyczny ówczynie, powszechnie stosowany w leczeniu schizofrenii, pod kątem jego potencjalnego działania jako inhibitor wybranych proteinaz, wpływających na tworzenie $A\beta$. Wyniki ich pracy wskazują, że pochodne butyrofenonu: haloperidol i droperidol, hamują wytwarzanie $A\beta$ w hodowli komórkowej ludzkich komórek neuronowych i nieneuronalnych [298]. Haloperidol był również badany przez Palotas i współautorów [299] pod kątem wpływu zaburzenia wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia na neurotoksyczność wywołaną $A\beta$ w modelu komórkowym AD. Destabilizacja homeostazy Ca^{2+} w neuronach odgrywa kluczową rolę w patogenezie AD, ponieważ nagromadzenie $A\beta$ inicjuje postępujące uszkodzenie nerwu, co skutkuje zaburzeniem metabolizmu neuronalnego i jonowej homeostazy. W modelu badawczym zostały zastosowane hodowle fibroblastów skóry pobranych od pacjentów z AD oraz otrzymanych od dobranej pod względem wieku i płci grupy kontrolnej. Wyjściowo, komórki od pacjentów z AD wykazywały istotnie niższy poziom jonów wapnia w porównaniu z hodowlą fibroblastów kontrolnych. Ekspozycja fibroblastów na peptyd $A\beta$ spowodowała zwiększenie stężenia Ca^{2+} w komórkach kontrolnych, ale nie w fibroblastach uzyskanych od osób z AD. Natomiast jednoczesna inkubacja obu kultur z terapeutyczną dawką haloperidolu blokowała wywołane $A\beta$ podwyższenie poziomu Ca^{2+} . Obserwacje te sugerują, że haloperidol może niwelować zaburzenia równowagi jonowej i może potencjalnie łagodzić neurotoksyczne działanie peptydu $A\beta$ [299].

Palotas i współautorzy [300], w swoich kolejnych pracach, badali wpływ tradycyjnych i atypowych leków przeciwpsychotycznych podawanych drogą dootrzewnową na APP i powstający z niego $A\beta$ w korze mózgowej szczura. Autorzy [300], powołując się na doniesienia wskazujące, że patologia AD rzadko występuje u pacjentów chorych na schizofrenię, postanowili zbadać czy leki przeciwpsychotyczne

stosowane w leczeniu schizofrenii mogą w rzeczywistości mieć działanie ochronne przed rozwojem neuropatologii AD [301,302]. Otrzymane wyniki wskazały, że leczenie haloperidolem, zarówno w dawkach terapeutycznych, jak i toksycznych, powodowało znaczące podwyższenie poziomu APP w korze mózgowej po podaniu pierwszej dawki leku, jednak nie miał on istotnego długofalowego wpływu na APP. Risperidon, będący atypowym lekiem przeciwpsychotycznym, nie zmieniał stężenia APP w korze mózgowej. Wyniki te wskazują, że zarówno haloperidol, jak i risperidon są uważane za stosunkowo bezpieczne pod względem metabolizmu APP. Omówiono możliwe mechanizmy, w tym udział wapnia i samego APP jako receptora [300].

Badane są również inne grupy leków pod kątem wpływu na agregację $A\beta$. Leki obecnie stosowane i będące w fazie opracowywania obejmują związki ukierunkowane na γ -sekretazę, β -sekretazę, chelatory jonów metali, statyny i pokrewne leki obniżające cholesterol [303]. Powszechnie wiadomo, że statyny zmniejszają poziom cholesterolu w osoczu, a tym samym ryzyko rozwoju chorób naczyniowo-mózgowych i sercowo-naczyniowych oraz udaru mózgu. Co ciekawe, u pacjentów w podeszłym wieku z AD często występują zarówno choroby naczyń mózgowych, jak i choroby układu krążenia, które wydają się mieć istotny wpływ na rozwój AD. Zarówno badania eksperymentalne, jak i kliniczne wykazały istotną współzależność między podwyższonym poziomem cholesterolu w surowicy, metabolizmem i transportem cholesterolu oraz wzmożonym przetwarzaniem β APP w neurotoksyczne peptydy $A\beta_{40-42}$, proces, który wydaje się preferencyjnie zachodzić w domenach błon plazmatycznych wzbogaconych w cholesterol. We wczesnych badaniach klinicznych wykazano, że statyny zwiększają stosunek β APP/ $A\beta$, jednocześnie zmniejszając poziom cholesterolu i lipidów w osoczu krwi u pacjentów z AD [304,305]. Badania na zwierzętach wykazały, że podawanie simwastatyny świnkom morskim przez 3 tygodnie powodowało zmniejszenie poziomu $A\beta$ w mózgu i płynie mózgowo-rdzeniowym, a efekt ten ustępował po przerwaniu leczenia. W badaniu z użyciem transgenicznych myszy, wykazano, że leczone simwastatyną radziły sobie lepiej w teście labiryntu wodnego Morrisa niż ich nieleczone odpowiedniki. W innym badaniu lowastatyna i prawastatyna sodowa zmniejszały ilość $A\beta$ w mózgu myszy transgenicznych, jednocześnie zwiększając poziom APP α [303,306,307].

W badaniach wpływu leków przeciwpsychotycznych na proces agregacji $A\beta$, wykonanych w ramach pracy doktorskiej, na etapie wczesnej fazy agregacji mierzonej

w przedziale czasowym 10-60 minut, najsilniejszą inhibicję zaobserwowano w przypadku obu stężeń benperidolu (5 µg/L, 10 µg/L): 39,90 - 53,33%, bromperidolu (12,5 µg/L): 55,63% oraz promazyny (25 µg/L): 53,72 - 59,17%. W fazie powstawania niewielkich form oligopeptydowych mierzonym po 90 minutach inkubacji najsilniejsze działanie hamujące agregacji A β wykazała promazyna (25 µg/L): 44,21% ($p < 0,001$) oraz benperidol (10 µg/L): 43,98% ($p < 0,001$). Na etapie późnej fazy agregacji A β , mierzonym po 24 godzinach, najintensywniejsze hamowanie tworzenia fibryli odnotowano dla benperidolu (10 µg/L) i było na poziomie 53,33% ($p < 0,001$). Natomiast po 48 godzinach inkubacji, najsilniejszą inhibicję agregacji A β , wynoszącą 51,18% ($p < 0,001$), odnotowano dla bromperidolu (12,5 µg/L) oraz promazyny (50 µg/L): 44,31% ($p < 0,001$).

Dostępne w piśmiennictwie badania *in silico* wskazują na możliwy potencjał leków przeciwpsychotycznych w zapobieganiu tworzeniu się złogów A β , co jest jednym z kluczowych mechanizmów prowadzących do rozwoju AD. W badaniach wykonanych w ramach doktoratu, wykazane po raz pierwszy zostało, że większość badanych leków przeciwpsychotycznych hamuje wczesne etapy wiązania monomeru A β . Ponadto niektóre związki tj. bromperidol, pimozyd, kwetiapina i promazyna również wykazały statystycznie istotne działanie hamujące na późną agregację A β , związaną z łączeniem dużych fibryli. Obserwacje te mogą mieć znaczenie nie tylko dla pacjentów z AD, ale również mogą oferować potencjalne korzyści pacjentom bez rozwiniętej AD, leczonym także lekami przeciwpsychotycznymi.

Przedstawione wyniki mogą stać się punktem wyjścia do dalszych badań, które przyczynią się do opracowania leku, który mógłby zapobiegać agregacji A β , ze względu na fakt, że dostępne są jedynie dane *in silico* w tym zakresie [16,42,308]. Należy jednak podkreślić, że warunki przeprowadzanych badań w ramach rozprawy doktorskiej odnoszą się do warunków *in vitro*, co generuje konieczność prowadzenia dalszych badań *in vivo*.

Stres oksydacyjny jest naukowo opisywany jako brak równowagi między wytwarzaniem reaktywnych form tlenu lub azotu (ROS/RNS), a zdolnością komórek do ich równoważenia poprzez antyoksydacyjne mechanizmy komórkowe [309]. Znacząca liczba doniesień naukowych potwierdza hipotezę, że stres oksydacyjny jest wczesnym i istotnym czynnikiem patogennym w AD. Przykład może stanowić badanie Bradleya i współautorów [310], którzy we wczesnych stadiach AD. stwierdzili

w mózgu podwyższony poziom 4-hydroksyheksenal (HHE), markera peroksydacji lipidów. Podobne wyniki odnotowano również dla innych α , β -nienasyconych aldehydów, takich jak 4-hydroksynonenal (HNE) i akroleina, stwierdzanych w obszarach mózgu pacjentów o łagodnym upośledzeniu poznawczym, przedklinicznym AD oraz późnym stadium AD [311]. Aldehydy te są wysoce reaktywne i mogą łatwo modyfikować białka [309]. Stwierdzone zostało również utlenianie białek przez markery takie jak karbonylki białek, których stężenia zwiększają się w mózgu osób chorych na AD w obszarach z histopatologicznymi cechami charakterystycznymi dla tej choroby [312]. Stres oksydacyjny jest nie tylko patologiczną cechą charakterystyczną AD, ale uważa się również, że bierze udział w inicjacji choroby. W rzeczywistości stres oksydacyjny i związane z nim uszkodzenie komórek okazały się pierwszą obserwowalną cechą progresji AD [313]. Co ważne, istnieje wyraźny związek między $A\beta$ a stresem oksydacyjnym. Ustalono również, że $A\beta$ przyczynia się do nadmiernej produkcji ROS, prowadząc do uszkodzenia mitochondriów [309]. Związek między $A\beta$ a stresem oksydacyjnym może stanowić dehydrogenaza alkoholowa wiążąca $A\beta$ (ABAD) w mitochondriach. Stwierdzono, że interakcja między $A\beta$ a ABAD zwiększa tworzenie ROS, dysfunkcję mitochondriów i ostatecznie apoptozę komórki [314]. Oprócz podwyższonych wskaźników stresu oksydacyjnego istnieją również dowody na zmniejszenie mocy antyoksydacyjnej w mózgu. Wszystkie te czynniki skłoniły naukowców do poszukiwania alternatywnych metod leczenia AD, ze szczególnym uwzględnieniem związków o działaniu przeciwutleniającym [315]. Określenie potencjału antyoksydacyjnego jest również istotne ze względu na fakt, że AD często wiąże się z chorobami współistniejącymi [316]. Według starszych danych [317,318] leczenie lekami przeciwpsychotycznymi może być związane ze stresem oksydacyjnym, który uznawany jest za jeden z mechanizmów patogenezy wystąpienia pozapiramidowych działań niepożądanych. Jednak nowsze wyniki sugerują, że tylko typowe neuroleptyki wiążą się z ryzykiem uszkodzeń oksydacyjnych, w przeciwieństwie do leków atypowych, takich jak olanzapina czy aripiprazol [319].

Xu i współautorzy [320] wykazali, że kwetiapina chroni hodowane komórki przed cytotoksycznością związaną ze stresem oksydacyjnym indukowaną przez $A\beta$ oraz zapobiega upośledzeniu pamięci i zmniejsza liczbę płytek $A\beta$. Kwetiapina hamowała agregację $A\beta_{25-35}$, podczas której uwolniony zostaje rodnik hydroksylowy ($OH\cdot$). Kwetiapina blokowała indukowaną $OH\cdot$ agregację $A\beta_{25-35}$ i usuwała $OH\cdot$

wytwarzany w modelu reakcji Fentona i roztworze $A\beta_{25-35}$. W kolejnym etapie badań, prowadzonym na komórkach PC12, stwierdzono, że $A\beta_{25-35}$ zwiększa poziom wewnątrzkomórkowych ROS i wapnia w komórkach PC12 oraz powoduje śmierć komórek, natomiast kwetiapina zapobiegała tym toksycznym działaniom. Wyniki te wskazują na mechanizm antyoksydacyjnego działania kwetiapiny, który przyczynia się do jej działania ochronnego i wyjaśnia skuteczność tego leku u pacjentów z AD z powikłaniami psychicznymi i behawioralnymi [320].

Biorąc pod uwagę powyższe argumenty, przeprowadzone zostały kompleksowe badania w ramach doktoratu, mające na celu ocenę potencjału antyoksydacyjnego wybranych leków przeciwpsychotycznych. Badania te przeprowadzono przy użyciu dwóch różnych modeli: erytrocytarnego oraz hodowli komórkowych. Pierwszy rodzaj badań przeprowadzono z wykorzystaniem ludzkich krwinek czerwonych. Pomimo tego, że erytrocyt nie jest typowym modelem komórkowym ze względu na brak jądra, jest to model dobrze ugruntowany ze względu na swoją funkcję w transporcie tlenu i dwutlenku węgla oraz wysoką zawartość hemu. Ponadto erytrocyty są kruche i bardzo podatne na uszkodzenia błony komórkowej, co przyczynić się może do ich hemolizy. Z tego względu hemoliza stanowi bardzo dobry model do badania stresu oksydacyjnego wywołanego przez wolne rodniki oraz do oceny aktywności antyoksydacyjnej ksenobiotyków [321]. W tym badaniu określony został potencjał antyoksydacyjny powszechnie stosowanych leków przeciwpsychotycznych w erytrocytach. Żaden z testowanych związków, poza promazyną w stężeniu 250 $\mu\text{g/L}$, które jest 5-krotnie wyższe od stężenia terapeutycznego w osoczu, nie przyczynił się do istotnego wzrostu hemolizy erytrocytów. Na podstawie tych obiecujących wyników przeprowadzone zostały kolejne badania z użyciem AAPH, który jest dobrze znanym środkiem utleniającym. Większość badanych leków przeciwpsychotycznych nie wpływała na hemolizę erytrocytów indukowaną przez AAPH. Najbardziej intrygujące efekty odnotowano dla kwetiapiny w stężeniu 80 $\mu\text{g/L}$, dla której odnotowano istotny spadek hemolizy po 5 godzinach inkubacji (23,92% vs. 53,40% dla kontroli AAPH, $p < 0,001$). Odwrotny efekt zaobserwowano po 24-godzinnej inkubacji (51,86% vs. 45,96% dla kontroli AAPH, $p > 0,05$), podczas gdy dla wyższych stężeń kwetiapiny (400 i 2000 $\mu\text{g/L}$) odnotowano jeszcze większy odsetek zhemolizowanych erytrocytów (odpowiednio 62,12% i 68,94% vs. 45,96% dla grupy kontrolnej AAPH, $p < 0,001$).

Przypuszcza się, że wynik ten wynikać może z wyczerpania mechanizmów obronnych antyoksydacyjnych w erytrocytach po 24 godzinach inkubacji.

Ocenie został poddany również potencjał tworzenia methemoglobiny pod wpływem mieszaniny leków przeciwpsychotycznych z AAPH, jako kolejny marker stresu oksydacyjnego. Poziom wytworzonej methemoglobiny został zmniejszony po 5 godzinach inkubacji z kwetiapiną w stężeniu 80 i 400 µg/L o odpowiednio: 17,14% i 18,85% w odniesieniu do 61,93% dla kontroli AAPH. Natomiast po 24 godzinach inkubacji zmniejszenie utleniania hemu w erytrocytach zaobserwowano dla promazyny w stężeniu 10 i 50 µg/L odpowiednio o 60,73% i 54,54% wobec 78,15% dla kontroli AAPH. Zaobserwowany umiarkowany efekt przeciwutleniający kwetiapiny jest zgodny z wynikami podanymi przez Liana i współautorów [322], którzy stwierdzili, że podawanie kwetiapiny wywiera ochronny wpływ na katalazę i całkowitą dysmutazę ponadtlenkową oraz blokuje indukowany etanolem stres oksydacyjny.

Badania dotyczące potencjału antyoksydacyjnego leków przeciwpsychotycznych przeprowadzono również przy użyciu modelu komórkowego z wykorzystaniem ludzkich komórek śródbłonka i astrocytów. Wybrano te typy komórek, ponieważ procesy metaboliczne w niektórych typach komórek mózgowych, w tym w neuronach, i komórkach śródbłonka, choć w dużej mierze różne i zmienne, są komplementarne, aby zapewnić prawidłowe funkcjonowanie mózgu [323]. Podobnie jak w modelu RBC, pierwszym etapem badań była ocena wpływu samych leków przeciwpsychotycznych na żywotność komórek HUVEC i astrocytów. Stwierdzono, że wszystkie badane związki, zastosowane w stężeniach odpowiadających ich terapeutycznym zakresom w osoczu, nie wpływają znacząco na żywotność obu linii komórkowych. Ze względu na to, że są to pierwsze tego typu badania, nie możemy porównywać naszych wyników z innymi doniesieniami. Wyjątek stanowi publikacja Wiklunda i współautorów [324], w której autorzy również nie odnotowali istotnego wpływu haloperidolu na żywotność HUVEC.

Ostatnim etapem badania była ocena żywotności HUVEC i astrocytów po jednoczesnym potraktowaniu lekami przeciwpsychotycznymi i AAPH. Jako wzorcowy związek przeciwutleniający zastosowano kwas askorbinowy (AA). Wyniki przeprowadzonych badań na hodowlach HUVEC wykazały, że żywotność w próbach stymulowanych samym AAPH spadała do 39,13%, natomiast w komórkach

preinkubowanych z AAPH i AA (10 $\mu\text{g/mL}$) wynosiła 81,04%. Preinkubacja komórek z AAPH i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi wykazała efekt ochronny przed stresem oksydacyjnym na poziomie porównywalnym do działania AA. Najsilniejszy ochronny wpływ, zwiększający żywotność HUVEC zaobserwowano w przypadku penfluridolu w stężeniach 12,5 i 25 $\mu\text{g/L}$, dla którego żywotność wyniosła odpowiednio 80,50% i 82,89%. Badane leki przeciwpsychotyczne nie wpłynęły znacząco na morfologię komórek śródbłonna. W przypadku hodowli astrocytów, ochronny wpływ na żywotność komórek odnotowano tylko dla czterech badanych substancji: benperidolu (w stężeniach 5 i 10 $\mu\text{g/L}$), penfluridolu (12,5 $\mu\text{g/L}$), pimozydu (15 $\mu\text{g/L}$) i promazyny (25 i 50 $\mu\text{g/L}$). Z czego najsilniejsze właściwości protekcyjne odnotowano dla benperidolu (5 $\mu\text{g/L}$), dla którego żywotność komórek wynosiła 81,86%, w porównaniu do komórek inkubowanych z samym AA: 72,91% oraz 65,92% dla kontroli inkubowanej tylko z AAPH. Badane leki przeciwpsychotyczne także i w tym przypadku nie wpłynęły na morfologię komórek. Wyniki te są bardzo ważne, ponieważ astrocyty są uważane za najbardziej czułe sensory, regulatory i protektory funkcji neuronalnych [325].

Wnioski

Podstawą podjęcia badań doświadczalnych *in vitro* w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej były wyniki badań *in silico*, Kumar i współautorów [16] oraz inne pojedyncze doniesienia literaturowe, które wskazywały, że niektóre leki przeciwpsychotyczne mogą wykazywać potencjalną aktywność w odniesieniu do wybranych biochemicznych aspektów i hipotez rozwoju AD, m.in. hipotezy cholinergicznej, odkładania $A\beta$ czy teorii oksydacyjnej.

W wyniku realizacji wyznaczonych w ramach niniejszej rozprawy doświadczalnych celów badawczych stwierdzono:

1. Wbrew prognozom analiz *in silico*, badane związki, w testowanym zakresie stężeń terapeutycznych, nie wykazały istotnego działania hamującego aktywność AChE. Natomiast trzy z badanych związków: bromperidol, kwetiapina i promazyna, zgodnie z prognozami *in silico*, istotnie hamowały aktywność BuChE.
2. W badanym zakresie stężeń terapeutycznych, wartości IC_{50} można było wyznaczyć tylko dla kwetiapiny i promazyny względem BuChE. Pozostałe badane związki, w ocenianym zakresie stężeń terapeutycznych, hamowały aktywność AChE o około 5-10 %, zaś aktywność BuChE od 4 do 32 %, dlatego dla tych związków nie wyznaczono wartości IC_{50} .
3. W zastosowanym modelu doświadczalnym z użyciem ludzkich ChEs potwierdzono literaturowe wartości IC_{50} dla donepezylu i rywastygminy.
4. Wyznaczone parametry kinetyczne reakcji enzymatycznych potwierdziły, że donepezyl hamuje zarówno AChE, jak i BuChE w sposób mieszany (kompetycyjno-niekompetycyjny). Mieszany typ inhibicji wykazano również dla rywastygminy w stosunku do AChE, natomiast inhibicja aktywności BuChE przez rywastygminę okazała się mieć charakter niekompetycyjny. Po raz pierwszy wykazano mieszany typ inhibicji dla kwetiapiny i promazyny w odniesieniu do BuChE.
5. Badania eksperymentalne przeprowadzone w mieszaninie binarnej, oceniające interakcje badanych związków i rutynowo stosowanych inhibitorów ChEs, wykazały istnienie interakcji, zarówno o charakterze synergizmu, jak i antagonizmu. Również analiza matematyczna z wykorzystaniem modelu Chou-Talalay i programu CompuSyn potwierdziła istnienie tych interakcji.

Ze względu na potencjalne znaczenie kliniczne obserwacji, konieczne jest przeprowadzenie pogłębionych badań w tym zakresie.

6. Wszystkie badane związki przeciwpsychotyczne, w sposób statystycznie istotny, hamowały zarówno wczesną (10-60 min) jak i późną (24h i 48 h) fazę agregacji A β .
7. W zastosowanych modelach komórkowych oceny działania przeciwutleniającego, w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego, badane leki przeciwpsychotyczne wykazały istotny potencjał antyoksydacyjny.

Streszczenie w języku polskim

Najczęstszą przyczyną demencji wśród osób po 65 roku życia jest choroba Alzheimera (AD), należąca do nieodwracalnych i postępujących schorzeń neurologicznych. AD jest złożoną chorobą o heterogennej etiologii, a dokładna jej przyczyna pozostaje nieznana. Istnieje kilka koncepcji opisujących czynniki przyczyniające się do rozwoju AD, z których wiodącymi są hipoteza cholinergiczna, hipoteza agregacji β -amyloidu ($A\beta$), hipoteza propagacji białka *tau* oraz hipoteza stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego. W oparciu o te patomechanizmy podjętych zostało wiele prób opracowania leków przeciw AD, jednak przez wiele lat tylko pięć preparatów zostało zatwierdzonych do leczenia. AD charakteryzuje się utratą pamięci i zaburzeniami zachowania, którym często towarzyszą objawy neuropsychiatryczne, jak pobudzenie i agresywność. Z tego względu do farmakoterapii AD, poza inhibitorami esteraz (AChEIs, BuChEIs) oraz memantyną, włączane są na stałe również leki przeciwpsychotyczne.

W ostatnich latach coraz większym zainteresowaniem cieszy się strategia repozycjonowania leków. Umożliwia ona zdecydowanie szybsze i tańsze wprowadzenie nowych terapii wykorzystujących zarejestrowane już substancje lecznicze, o znanym profilu farmakologicznym, dla których w wynikach badań *in silico* i bioanalizie *in vitro* wykazano istnienie nowych aktywności biologicznych.

Na podstawie danych literaturowych dotyczących obserwacji klinicznych pacjentów z AD oraz wyników badań *in silico* w zakresie repozycjonowania leków przeciwpsychotycznych, w ramach niniejszej pracy doktorskiej została postawiana hipoteza badawcza dotycząca potencjalnego wpływu leków przeciwpsychotycznych na wybrane aspekty biochemiczne mające udział w rozwoju AD. Celem przeprowadzonych badań *in vitro* była ocena działania 7 wybranych leków przeciwpsychotycznych: haloperidolu, bromperidol, benperidolu, penfluridolu, pimozydu, kwetiapiny oraz promazyny, należących do grupy N 05 wg klasyfikacji ATC oraz różnych grup pod względem chemicznym, na elementy trzech głównych hipotez powstawania AD.

- Hipoteza cholinergiczna – oceniono wpływ wybranych leków na aktywność enzymatyczną AChE oraz BuChE, typ inhibicji enzymatycznej oraz potencjalne

interakcje występujące *in vitro* pomiędzy badanymi lekami a rutynowo stosowanymi w terapii AD inhibitorami AChE.

- Hipoteza agregacji $A\beta$ – oceniono wpływ leków przeciwpsychotycznych na trzy fazy agregacji $A\beta$ 1-42.
- Hipoteza stresu oksydacyjnego – oceniono potencjalne właściwości antyoksydacyjne badanych leków przeciwpsychotycznych w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego badanego *in vitro* w modelu erytrocytarnym i hodowli komórkowej z wykorzystaniem ludzkich komórek śródbłonna (*HUVEC*) i astrocytów.

Na podstawie otrzymanych wyników z badań doświadczalnych wnioskować można, że wbrew prognozom analiz *in silico*, badane związki, w testowanym zakresie stężeń terapeutycznych, nie wykazały istotnego działania hamującego aktywność AChE. Natomiast trzy z badanych związków: bromperidol, kwetiapina i promazyna, zgodnie z prognozami *in silico*, istotnie hamowały aktywność BuChE. W badanym zakresie stężeń terapeutycznych, wartości IC_{50} można było wyznaczyć tylko dla kwetiapiny i promazyny względem BuChE. Pozostałe badane związki, w ocenianym zakresie stężeń, hamowały aktywność AChE o około 5 - 10 %, zaś aktywność BuChE od 4 do 32 %, dlatego dla tych związków nie wyznaczono wartości IC_{50} . Dla wzorcowych inhibitorów oraz związków najsilniej hamujących aktywność BuChE wyznaczono parametry kinetyczne reakcji enzymatycznych, dzięki czemu potwierdzono, że donepezil hamuje zarówno AChE, jak i BuChE w sposób mieszany (kompetycyjno-niekompetycyjny). Mieszany typ inhibicji wykazano również dla rywastygminy w stosunku do AChE, natomiast inhibicja aktywności BuChE przez rywastygminę okazała się mieć charakter niekompetycyjny. Po raz pierwszy wykazano mieszany typ inhibicji dla kwetiapiny i promazyny w odniesieniu do BuChE. Badania eksperymentalne przeprowadzone w mieszaninie binarnej, oceniające interakcje badanych związków i rutynowo stosowanych ChEIs, wykazały istnienie interakcji, zarówno o charakterze synergizmu, jak i antagonizmu. Również analiza matematyczna z wykorzystaniem modelu Chou-Talalay i programu CompuSyn potwierdziła istnienie tych interakcji. Wszystkie badane związki przeciwpsychotyczne, w sposób statystycznie istotny, hamowały zarówno wczesną (10 - 60 min) jak i późną (24 h i 48 h) fazę agregacji $A\beta$. W zastosowanych modelach komórkowych oceny działania przeciwutleniającego, w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego, badane leki przeciwpsychotyczne wykazały istotny potencjał antyoksydacyjny.

Wyniki przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badań sugerują, że stosowanie leków przeciwpsychotycznych u pacjentów z AD może przynieść pewne korzyści kliniczne, ale z drugiej strony mogą one osłabić lub w niekontrolowany sposób nasilić działanie ChEIs rutynowo stosowanych w terapii AD. Wykazanie hamującego wpływu leków przeciwpsychotycznych na powstawanie złogów $A\beta$ oraz ich działania przeciwutleniającego może również przynieść pewne korzyści pacjentom bez AD leczonym lekami przeciwpsychotycznymi w zapobieganiu lub spowolnieniu rozwoju tej choroby. Podsumowując, otrzymane wyniki badań *in vitro* mogą być punktem wyjścia do pogłębionych badań *in vivo* w modelu zwierzęcym, jak również dalszych obserwacji klinicznych.

Streszczenie w języku angielskim

The most common cause of dementia among people over 65 is Alzheimer's disease (AD) that is an irreversible and progressive neurological disease. Despite substantial efforts to understand its exact causes and biological mechanisms the etiology of AD remains unknown due to heterogeneous background. There are several concepts describing factors contributing to the development of AD, the leading ones being the cholinergic hypothesis, the β -amyloid ($A\beta$) aggregation hypothesis, the *tau* protein propagation hypothesis, and the oxidative stress and inflammation hypothesis. Many attempts have been made to develop anti-AD drugs based on these pathomechanisms underlying AD, but for many years only five drugs have been approved for its treatment. AD is characterized by memory loss and behavioral disturbances, often accompanied by neuropsychiatric symptoms such as agitation and aggressiveness. For this reason antipsychotic drugs are also permanently included in the pharmacotherapy of AD in addition to esterase inhibitors (AChEIs, BuChEIs) and memantine.

Drug repositioning strategy has become increasingly popular in the recent years. It enables the introduction of new therapies much faster and cheaper. This strategy uses already registered medicines with a known pharmacological profile, for which the existence of new biological activities has been demonstrated by the results of *in silico* tests and *in vitro* bioanalysis.

A research hypothesis was formulated regarding the influence of antipsychotic drugs on the selected biochemical aspects of AD as part of this doctoral thesis. This research hypothesis was formulated on the basis of literature data from clinical observations of patients with AD and the results of *in silico* studies on the repositioning of antipsychotics. The aim of this *in vitro* research was to evaluate the effect of 7 selected antipsychotic drugs: haloperidol, bromperidol, benperidol, penfluridol, pimozide, quetiapine and promazine, belonging to the N 05 group according to the ATC classification and various chemical groups, on the elements of the three main hypotheses of the development of AD.

- Cholinergic hypothesis - the impact of selected drugs on the enzymatic activity of AChE and BuChE were assessed as well as the type of enzymatic inhibition

and potential interactions occurring *in vitro* between the tested drugs and AChE inhibitors routinely used in AD therapy.

- $A\beta$ aggregation hypothesis - the effect of antipsychotic drugs on three phases of $A\beta$ 1-42 aggregation was assessed.

- Oxidative stress hypothesis - the potential antioxidant properties of the tested antipsychotic drugs were assessed under the conditions of induced oxidative stress. The research was conducted *in vitro* in the erythrocyte model and in cell culture using human endothelial cells (*HUVEC*) and astrocytes.

Based on the results obtained from experimental studies, it can be concluded that the tested compounds in the therapeutic concentration range did not demonstrate any significant inhibitory effect on AChE activity, which is contrary to the predictions of *in silico* analyses. However, three of the tested compounds: bromperidol, quetiapine and promazine significantly inhibited BuChE activity according to the *in silico* predictions. Within the tested range of therapeutic concentrations, IC_{50} values could be determined only for quetiapine and promazine relative to BuChE. In the assessed concentration range, the remaining tested compounds inhibited AChE activity by approximately 5 - 10%, and BuChE activity by 4 to 32%, therefore IC_{50} values were not determined for these compounds. The kinetic parameters of enzymatic reactions were determined for standard inhibitors and compounds that most strongly inhibit BuChE activity, thus confirming that donepezil inhibits both AChE and BuChE in a mixed manner (competitive and non-competitive). A mixed type of inhibition was also demonstrated for rivastigmine with regard to AChE, while the inhibition of BuChE activity by rivastigmine turned out to be non-competitive. For the first time, a mixed type of inhibition was demonstrated for quetiapine and promazine in relation to BuChE. The researcher conducted in a binary mixture, assessing the interactions of the tested antipsychotics and routinely used ChEIs, showed the existence of interactions, both synergistic and antagonistic. Mathematical analysis using the Chou-Talalay model and the CompuSyn program also confirmed the existence of these interactions. All tested antipsychotic compounds inhibited the early (10 - 60 min) and late (24 h and 48 h) phases of $A\beta$ aggregation, in a statistically significant manner. The tested antipsychotic drugs showed significant antioxidant potential in both cellular models of antioxidant activity, carried out under conditions of induced oxidative stress.

The results of the research conducted as part of this doctoral dissertation suggest that the use of antipsychotic drugs in patients with AD may bring some clinical benefits, but on the other hand they may weaken or uncontrollably intensify the effects of ChEIs routinely used in AD therapy. Demonstrating the inhibitory effect of antipsychotics on the formation of A β deposits and their antioxidant effects may also provide some benefit to non-AD patients treated with antipsychotics in preventing or slowing the progression of this disease. In conclusion, the obtained *in vitro* test results can be a start-point for in-depth *in vivo* research in an animal model, as well as further clinical observations.

Piśmiennictwo

1. Schmidt B, Braun HA, Narlawar R. Drug development and PET-diagnostics for Alzheimer's disease. *Curr Med Chem.* 2005; 12(14):1677-1695. doi: 10.2174/0929867054367130.
2. Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang JS. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther.* 2019; 4:29. doi: 10.1038/s41392-019-0063-8. Erratum in: *Signal Transduct Target Ther.* 2019; 4:37.
3. Du X, Wang X, Geng M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener.* 2018; 7:2. doi: 10.1186/s40035-018-0107-y.
4. Łuc M, Woźniak M, Helemejko M, Rymaszewska J. Tackling Alzheimer's disease: Hypothetical synergism between anti-inflammatory and anti-diabetic agents. *Life Sci.* 2019; 231:116483. doi: 10.1016/j.lfs.2019.05.039.
5. Suh WH, Suslick KS, Suh YH. Therapeutic Agents for Alzheimer's Disease. *Curr. Med. Chem.-Cent. Nerv. Syst. Agents* 2005; 5:259–269. doi: 10.2174/156801505774913035.
6. U.S. Food & Drug Administration. <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fdas-decision-approve-new-treatment-alzheimers-disease> (stan z dnia 30.04.2023).
7. Walsh S, Merrick R, Richard E, Nurock S, Brayne C. Lecanemab for Alzheimer's disease. *BMJ.* 2022; 379:o3010. doi: 10.1136/bmj.o3010.
8. Ropacki SA, Jeste DV. Epidemiology of and risk factors for psychosis of Alzheimer's disease: a review of 55 studies published from 1990 to 2003. *Am J Psychiatry.* 2005; 162(11):2022-2030. doi: 10.1176/appi.ajp.162.11.2022.
9. Rothenberg KG, Rajaram R. Advances in Management of Psychosis in Neurodegenerative Diseases. *Curr Treat Options Neurol.* 2019; 21(1):3. doi: 10.1007/s11940-019-0545-6.
10. Amodeo G, Fagiolini A, Sachs G, Erfurth A. Older and Newer Strategies for the Pharmacological Management of Agitation in Patients with Bipolar Disorder or Schizophrenia. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2017; 16(8):885-890. doi: 10.2174/1871527316666170919115507.
11. Devanand DP, Mintzer J, Schultz SK, Andrews HF, Sultzer DL, de la Pena D, Gupta S, Colon S, Schimming C, Pelton GH, Levin B. Relapse risk after discontinuation of risperidone in Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2012; 367(16):1497-1507. doi: 10.1056/NEJMoa1114058. Erratum in: *N Engl J Med.* 2012; 367(25):2458.
12. El-Saifi N, Moyle W, Jones C, Tuffaha H. Quetiapine safety in older adults: a systematic literature review. *J Clin Pharm Ther.* 2016; 41(1):7-18. doi: 10.1111/jcpt.12357.
13. Moretti R, Torre P, Antonello RM, Cazzato G, Griggio S, Bava A. Olanzapine as a treatment of neuropsychiatric disorders of Alzheimer's disease and other

- dementias: a 24-month follow-up of 68 patients. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2003; 18(4):205-214. doi: 10.1177/153331750301800410.
14. Appleby BS, Cummings JL. Discovering new treatments for Alzheimer's disease by repurposing approved medications. *Curr Top Med Chem.* 2013; 13(18):2306-2327. doi: 10.2174/15680266113136660162.
 15. Parvathaneni V, Kulkarni NS, Muth A, Gupta V. Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. *Drug Discov Today.* 2019; 24(10):2076-2085. doi: 10.1016/j.drudis.2019.06.014.
 16. Kumar S, Chowdhury S, Kumar S. In silico repurposing of antipsychotic drugs for Alzheimer's disease. *BMC Neurosci.* 2017; 18(1):76. doi: 10.1186/s12868-017-0394-8.
 17. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2018; 25(1):59-70. doi: 10.1111/ene.13439.
 18. Alzheimer's Disease International. <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/dementia-statistics> (stan z dnia 09.03.2023).
 19. Guerchet M, Prince M, Prina M. Numbers of people with dementia worldwide. Alzheimer's Disease International. <https://www.alzint.org/resource/numbers-of-people-with-dementia-worldwide> (stan z dnia 15.12.2023).
 20. Folch J, Petrov D, Ettcheto M, Abad S, Sánchez-López E, García ML, Olloquequi J, Beas-Zarate C, Auladell C, Camins A. Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment. *Neural Plast.* 2016; 2016:8501693. doi: 10.1155/2016/8501693.
 21. Resthaven Aged Care and Retirement Living. <http://www.resthaven.asn.au> (stan z dnia 27.03.2023)
 22. Hausz-Piskorz B, Buczkowski K. Diagnostyka i leczenie choroby Alzheimera w warunkach praktyki lekarza rodzinnego. *Forum Med Rodz.* 2013; 7:198–207.
 23. Alzheimer's Association. <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/stages> (stan z dnia 09.03.2023).
 24. Światowy Raport 2019: Postawy wobec demencji. Alzheimer's Disease International. <https://www.alzheimer-waw.pl> (stan z dnia 15.12.2023).
 25. Opieka nad osobami chorymi na chorobę Alzheimera oraz wsparcie dla ich rodzin. Najwyższa Izba Kontroli, 2017. <https://www.nik.gov.pl/aktualnosci/nik-o-opiece-nad-chorymi-na-alzheimera.html> (stan z dnia 09.03.2023).
 26. Leszek J. Choroba Alzheimera: obecny stan wiedzy, perspektywy terapeutyczne. *Polski Przegląd Neurologiczny.* 2012; 8(3): 101-106.
 27. Desai AK, Grossberg GT. Diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Neurology.* 2005; 64(12 Suppl 3):S34-39. doi: 10.1212/wnl.64.12_suppl_3.s34.
 28. Li XY, Cui Y, Jing D, Xie K, Zhong X, Kong Y, Wang Y, Chu M, Wang C, Wu L. Novel PSEN1 and PSEN2 Mutations Identified in Sporadic Early-onset

- Alzheimer Disease and Posterior Cortical Atrophy. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2021; 35(3):208-213. doi: 10.1097/WAD.0000000000000438.
29. Palmqvist S, Janelidze S, Quiroz YT, Zetterberg H, Lopera F, Stomrud E, Su Y, Chen Y, Serrano GE, Leuzy A, Mattsson-Carlsson N, Strandberg O, Smith R, Villegas A, Sepulveda-Falla D, Chai X, Proctor NK, Beach TG, Blennow K, Dage JL, Reiman EM, Hansson O. Discriminative Accuracy of Plasma Phospho-tau217 for Alzheimer Disease vs Other Neurodegenerative Disorders. *JAMA.* 2020; 324(8):772-781. doi: 10.1001/jama.2020.12134.
 30. Telser J, Risch L, Saely CH, Grossmann K, Werner P. P-tau217 in Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta.* 2022; 531:100-111. doi: 10.1016/j.cca.2022.03.018.
 31. Alam J, Sharma L. Potential Enzymatic Targets in Alzheimer's: A Comprehensive Review. *Curr Drug Targets.* 2019; 20(3):316-339. doi: 10.2174/1389450119666180820104723.
 32. Churcher I. Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Top Med Chem.* 2006; 6(6):579-595. doi: 10.2174/156802606776743057.
 33. Shah H, Patel A, Parikh V, Nagani A, Bhimani B, Shah U, Bambharoliya T. The β -Secretase Enzyme BACE1: A Biochemical Enigma for Alzheimer's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2020; 19(3):184-194. doi: 10.2174/1871527319666200526144141.
 34. Pákási M, Kálmán J. Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2008; 53(5):103-111. doi: 10.1016/j.neuint.2008.06.005.
 35. Sanabria-Castro A, Alvarado-Echeverría I, Monge-Bonilla C. Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. *Ann Neurosci.* 2017; 24(1):46-54. doi: 10.1159/000464422.
 36. National Institutes of Health. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK552149/figure/Ch1-f0002/> (stan z dnia 11.08.2023).
 37. Jackson-Siegal J. Our current understanding of the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Adv Stud Pharm.* 2005; 2(4):126-135.
 38. Weller J, Budson A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res.* 2018; 7:F1000 Faculty Rev-1161. doi: 10.12688/f1000research.14506.1.
 39. Tickler AK, Wade JD, Separovic F. The role of Abeta peptides in Alzheimer's disease. *Protein Pept Lett.* 2005; 12(6):513-519. doi: 10.2174/0929866054395905.
 40. Chauhan V, Chauhan A. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology.* 2006; 13(3):195-208. doi: 10.1016/j.pathophys.2006.05.004.
 41. Huang WJ, Zhang X, Chen WW. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed Rep.* 2016; 4(5):519-522. doi: 10.3892/br.2016.630.
 42. Ul-Haq Z, Khan W, Kalsoom S, Ansari FL. In silico modeling of the specific inhibitory potential of thiophene-2,3-dihydro-1,5-benzothiazepine against

- BChE in the formation of beta-amyloid plaques associated with Alzheimer's disease. *Theor Biol Med Model.* 2010; 7:22. doi: 10.1186/1742-4682-7-22.
43. de la Monte SM. Type 3 diabetes is sporadic Alzheimer's disease: mini-review. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014; 24(12):1954-1960. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.06.008.
 44. Chen XQ, Mobley WC. Exploring the Pathogenesis of Alzheimer Disease in Basal Forebrain Cholinergic Neurons: Converging Insights From Alternative Hypotheses. *Front Neurosci.* 2019; 13:446. doi: 10.3389/fnins.2019.00446.
 45. Brewster JT 2nd, Dell'Acqua S, Thach DQ, Sessler JL. Classics in Chemical Neuroscience: Donepezil. *ACS Chem Neurosci.* 2019; 10(1):155-167. doi: 10.1021/acscchemneuro.8b00517.
 46. Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Khachaturian AS, Vergallo A, Farlow MR, Snyder PJ, Giacobini E, Khachaturian ZS. Revisiting the Cholinergic Hypothesis in Alzheimer's Disease: Emerging Evidence from Translational and Clinical Research. *J Prev Alzheimers Dis.* 2019; 6(1):2-15. doi: 10.14283/jpad.2018.43.
 47. Liu AK, Chang RC, Pearce RK, Gentleman SM. Nucleus basalis of Meynert revisited: anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2015; 129(4):527-540. doi: 10.1007/s00401-015-1392-5.
 48. Wang H, Zhang H. Reconsideration of Anticholinesterase Therapeutic Strategies against Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci.* 2019; 10(2):852-862. doi: 10.1021/acscchemneuro.8b00391.
 49. Volpato D, Holzgrabe U. Designing Hybrids Targeting the Cholinergic System by Modulating the Muscarinic and Nicotinic Receptors: A Concept to Treat Alzheimer's Disease. *Molecules.* 2018; 23(12):3230. doi: 10.3390/molecules23123230.
 50. Gould TJ, Leach PT. Cellular, molecular, and genetic substrates underlying the impact of nicotine on learning. *Neurobiol Learn Mem.* 2014; 107:108-132. doi: 10.1016/j.nlm.2013.08.004.
 51. Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA. Alzheimer disease. *Dis Mon.* 2010; 56(9):484-546. doi: 10.1016/j.disamonth.2010.06.001.
 52. Bugaj A, Jermakow N. Mechanisms underlying Alzheimer's disease. *Neuropsychiatria i Neuropsychologia/Neuropsychiatry and Neuropsychology.* 2016; 11(3):85-92. doi:10.5114/nan.2016.63650.
 53. Toledo JB, Shaw LM, Trojanowski JQ. Plasma amyloid beta measurements - a desired but elusive Alzheimer's disease biomarker. *Alzheimers Res Ther.* 2013; 5(2):8. doi: 10.1186/alzrt162.
 54. Pietras T. Toksyczność amyloidu beta a stres oksydacyjny w patogenezie choroby Alzheimer'a. *Postępy Psychiatrii i Neurologii.* 2007; 16 (1), 69-73.
 55. Gulisano W, Mauteri D, Baltrons MA, Fà M, Amato A, Palmeri A, D'Adamio L, Grassi C, Devanand DP, Honig LS, Puzzo D, Arancio O. Role of Amyloid- β and Tau Proteins in Alzheimer's Disease: Confuting the Amyloid Cascade. *J*

- Alzheimers Dis. 2018; 64(s1):S611-S631. doi: 10.3233/JAD-179935. Erratum in: J Alzheimers Dis. 2019; 68(1):415.
56. Sitnik K, Cichy J. Udział techniki warunkowej inaktywacji genów opartej na systemie Cre-loxP w postępie wiedzy na temat roli receptorów Notch. Postępy Biochemii. 2006; 52(1):49–55.
 57. Olry A, Chastagner P, Israël A, Brou C. Generation and characterization of mutant cell lines defective in gamma-secretase processing of Notch and amyloid precursor protein. J Biol Chem. 2005; 280(31):28564-28571. doi: 10.1074/jbc.M502199200.
 58. Klaver DW, Wilce MC, Cui H, Hung AC, Gasperini R, Foa L, Small DH. Is BACE1 a suitable therapeutic target for the treatment of Alzheimer's disease? Current strategies and future directions. Biol Chem. 2010; 391(8):849-859. doi: 10.1515/BC.2010.089.
 59. Mi K, Johnson GV. The role of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res. 2006; 3(5):449-463. doi: 10.2174/156720506779025279.
 60. Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur EL. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. Science. 2008; 319(5866):1086-1089. doi: 10.1126/science.1152993.
 61. Wippold FJ 2nd, Cairns N, Vo K, Holtzman DM, Morris JC. Neuropathology for the neuroradiologist: plaques and tangles. AJNR Am J Neuroradiol. 2008; 29(1):18-22. doi: 10.3174/ajnr.A0781.
 62. Price JL, Morris JC. So what if tangles precede plaques? Neurobiol Aging. 2004; 25(6):721-723; discussion 743-746. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2003.12.017.
 63. Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. Ann Neurol. 1999; 45(3):358-368. doi: 10.1002/1531-8249(199903)45:3<358::aid-ana12>3.0.co;2-x.
 64. Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. Science. 2007; 316(5825):750-754. doi: 10.1126/science.1141736.
 65. Birkner E, Zalejska-Fiolka J, Antoszewski Z. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych i rola witamin o charakterze antyoksydacyjnym w chorobie Alzheimera. Postępy Hig. Med. Dosw. 2004; 58: 264–269.
 66. Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. Redox Biol. 2018; 14:450-464. doi: 10.1016/j.redox.2017.10.014.
 67. Knapp MJ, Knopman DS, Solomon PR, Pendlebury WW, Davis CS, Gracon SI. A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. The Tacrine Study Group. JAMA. 1994; 271(13):985-991.
 68. O'Brien JT, Holmes C, Jones M, Jones R, Livingston G, McKeith I, Mittler P, Passmore P, Ritchie C, Robinson L, Sampson EL, Taylor JP, Thomas A,

- Burns A. Clinical practice with anti-dementia drugs: A revised (third) consensus statement from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol.* 2017; 31(2):147-168. doi: 10.1177/0269881116680924.
69. Shigeta M, Homma A. Donepezil for Alzheimer's disease: pharmacodynamic, pharmacokinetic, and clinical profiles. *CNS Drug Rev.* 2001; 7(4):353-368. doi: 10.1111/j.1527-3458.2001.tb00204.x.
 70. Heinrich M, Lee Teoh H. Galanthamine from snowdrop--the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J Ethnopharmacol.* 2004; 92(2-3):147-162. doi: 10.1016/j.jep.2004.02.012.
 71. Wilkinson DG. Galantamine: a new treatment for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2001; 1(2):153-159. doi: 10.1586/14737175.1.2.153.
 72. Rolinski M, Fox C, Maidment I, McShane R. Cholinesterase inhibitors for dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease dementia and cognitive impairment in Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012; 2012(3):CD006504. doi: 10.1002/14651858.CD006504.pub2.
 73. Onor ML, Trevisiol M, Aguglia E. Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *Clin Interv Aging.* 2007; 2(1):17-32. doi: 10.2147/cia.2007.2.1.17.
 74. Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych. <http://urpl.gov.pl/pl/produkty-lecznicze/zagadnienia-rejestracyjne/rejestr-produktow-leczniczych> (stan z dnia 15.03.2023).
 75. Gauthier S, Loft H, Cummings J. Improvement in behavioural symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease by memantine: a pooled data analysis. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2008; 23(5):537-545. doi: 10.1002/gps.1949.
 76. Winblad B, Poritis N. Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). *Int J Geriatr Psychiatry.* 1999; 14(2):135-146. doi: 10.1002/(sici)1099-1166(199902)14:2<135::aid-gps906>3.0.co;2-0.
 77. Sobów T. Kliniczne aspekty stosowania memantyny w monoterapii i politerapii choroby Alzheimerera. *Polski Przegląd Neurologiczny.* 2013; 9:16–23.
 78. Winslow B.T., Onysko M.K., Stob C.M., Hazlewood K.A. Leczenie choroby Alzheimerera. *Lekarz Rodzinny.* 2011; 12: 1166–1175.
 79. The BMJ. <https://blogs.bmj.com/bmj/2021/11/04/nothing-is-right-about-the-approval-of-aducanumab-and-nothings-new/> (stan z dnia 15.03.2023).
 80. The BMJ. <https://www.bmj.com/content/379/bmj.o3010/rapid-responses> (stan z dnia 27.03.2023).
 81. van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, Kanekiyo M, Li D, Reyderman L, Cohen S, Froelich L, Katayama S, Sabbagh M, Vellas B, Watson D, Dhadda S, Irizarry M, Kramer LD, Iwatsubo T. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 2023; 388(1):9-21. doi: 10.1056/NEJMoa2212948.

82. U.S. Food & Drug Administration. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-alzheimers-disease-treatment> (stan z dnia 15.03.2023).
83. The Lancet. Lecanemab for Alzheimer's disease: tempering hype and hope. *Lancet*. 2022; 400(10367):1899. doi: 10.1016/S0140-6736(22)02480-1.
84. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 2019; 179(2):312-339. doi: 10.1016/j.cell.2019.09.001.
85. Sudhakar V, Richardson RM. Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases. *Neurotherapeutics*. 2019; 16(1):166-175. doi: 10.1007/s13311-018-00694-0.
86. Jeremic D, Jiménez-Díaz L, Navarro-López JD. Past, present and future of therapeutic strategies against amyloid- β peptides in Alzheimer's disease: a systematic review. *Ageing Res Rev*. 2021; 72:101496. doi: 10.1016/j.arr.2021.101496.
87. Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, Jones RW, Bullock R, Love S, Neal JW, Zotova E, Nicoll JA. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet*. 2008; 372(9634):216-223. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61075-2.
88. Song C, Shi J, Zhang P, Zhang Y, Xu J, Zhao L, Zhang R, Wang H, Chen H. Immunotherapy for Alzheimer's disease: targeting β -amyloid and beyond. *Transl Neurodegener*. 2022; 11(1):18. doi: 10.1186/s40035-022-00292-3.
89. Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Porsteinsson AP, Ferris S, Reichert M, Ketter N, Nejadnik B, Guenzler V, Miloslavsky M, Wang D, Lu Y, Lull J, Tudor IC, Liu E, Grundman M, Yuen E, Black R, Brashear HR; Bapineuzumab 301 and 302 Clinical Trial Investigators. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2014; 370(4):322-333. doi: 10.1056/NEJMoa1304839.
90. Doody RS, Thomas RG, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, Raman R, Sun X, Aisen PS, Siemers E, Liu-Seifert H, Mohs R; Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering Committee; Solanezumab Study Group. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2014; 370(4):311-321. doi: 10.1056/NEJMoa1312889.
91. Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, He F, Sun X, Thomas RG, Aisen PS; Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering Committee; Siemers E, Sethuraman G, Mohs R; Semagacestat Study Group. A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2013; 369(4):341-350. doi: 10.1056/NEJMoa1210951.
92. Selkoe DJ. Alzheimer disease and aducanumab: adjusting our approach. *Nat Rev Neurol*. 2019; 15(7):365-366. doi: 10.1038/s41582-019-0205-1.
93. Green RC, Schneider LS, Amato DA, Beelen AP, Wilcock G, Swabb EA, Zavitz KH; Tarenflurbil Phase 3 Study Group. Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer

- disease: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2009; 302(23):2557-2564. doi: 10.1001/jama.2009.1866.
94. Henley D, Raghavan N, Sperling R, Aisen P, Raman R, Romano G. Preliminary Results of a Trial of Atabecestat in Preclinical Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2019; 380(15):1483-1485. doi: 10.1056/NEJMc1813435.
 95. Wessels AM, Lines C, Stern RA, Kost J, Voss T, Mozley LH, Furtek C, Mukai Y, Aisen PS, Cummings JL, Tariot PN, Vellas B, Dupre N, Randolph C, Michelson D, Andersen SW, Shering C, Sims JR, Egan MF. Cognitive outcomes in trials of two BACE inhibitors in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2020; 16(11):1483-1492. doi: 10.1002/alz.12164.
 96. Egan MF, Kost J, Voss T, Mukai Y, Aisen PS, Cummings JL, Tariot PN, Vellas B, van Dyck CH, Boada M, Zhang Y, Li W, Furtek C, Mahoney E, Harper Mozley L, Mo Y, Sur C, Michelson D. Randomized Trial of Verubecestat for Prodromal Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2019; 380(15):1408-1420. doi: 10.1056/NEJMoa1812840.
 97. Sperling R, Henley D, Aisen PS, Raman R, Donohue MC, Erntstrom K, Rafii MS, Streffer J, Shi Y, Karcher K, Raghavan N, Tymofyeyev Y, Bogert J, Brashear HR, Novak G, Thippahawong J, Saad ZS, Kolb H, Rofael H, Sanga P, Romano G. Findings of Efficacy, Safety, and Biomarker Outcomes of Atabecestat in Preclinical Alzheimer Disease: A Truncated Randomized Phase 2b/3 Clinical Trial. *JAMA Neurol*. 2021; 78(3):293-301. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.4857.
 98. Bullich S, Mueller A, De Santi S, Koglin N, Krause S, Kaplow J, Kanekiyo M, Roé-Vellvé N, Perrotin A, Jovalekic A, Scott D, Gee M, Stephens A, Irizarry M. Evaluation of tau deposition using 18F-PI-2620 PET in MCI and early AD subjects-a MissionAD tau sub-study. *Alzheimers Res Ther*. 2022; 14(1):105. doi: 10.1186/s13195-022-01048-x.
 99. Bazzari FH, Bazzari AH. BACE1 Inhibitors for Alzheimer's Disease: The Past, Present and Any Future? *Molecules*. 2022; 27(24):8823. doi: 10.3390/molecules27248823.
 100. Suzuki K, Iwata A, Iwatsubo T. The past, present, and future of disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2017; 93(10):757-771. doi: 10.2183/pjab.93.048.
 101. Tagami S, Yanagida K, Kodama TS, Takami M, Mizuta N, Oyama H, Nishitomi K, Chiu YW, Okamoto T, Ikeuchi T, Sakaguchi G, Kudo T, Matsuura Y, Fukumori A, Takeda M, Ihara Y, Okochi M. Semagacestat Is a Pseudo-Inhibitor of γ -Secretase. *Cell Rep*. 2017; 21(1):259-273. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.032.
 102. Mehta D, Jackson R, Paul G, Shi J, Sabbagh M. Why do trials for Alzheimer's disease drugs keep failing? A discontinued drug perspective for 2010-2015. *Expert Opin Investig Drugs*. 2017; 26(6):735-739. doi: 10.1080/13543784.2017.1323868.

103. Coric V, van Dyck CH, Salloway S, Andreasen N, Brody M, Richter RW, Soininen H, Thein S, Shiovitz T, Pilcher G, Colby S, Rollin L, Dockens R, Pachai C, Portelius E, Andreasson U, Blennow K, Soares H, Albright C, Feldman HH, Berman RM. Safety and tolerability of the γ -secretase inhibitor avagacestat in a phase 2 study of mild to moderate Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 2012; 69(11):1430-1440. doi: 10.1001/archneurol.2012.2194.
104. Martone RL, Zhou H, Atchison K, Comery T, Xu JZ, Huang X, Gong X, Jin M, Kreft A, Harrison B, Mayer SC, Aschmies S, Gonzales C, Zaleska MM, Riddell DR, Wagner E, Lu P, Sun SC, Sonnenberg-Reines J, Oganessian A, Adkins K, Leach MW, Clarke DW, Huryn D, Abou-Gharbia M, Magolda R, Bard J, Frick G, Raje S, Forlow SB, Balliet C, Burczynski ME, Reinhart PH, Wan HI, Pangalos MN, Jacobsen JS. Begacestat (GSI-953): a novel, selective thiophene sulfonamide inhibitor of amyloid precursor protein gamma-secretase for the treatment of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; 331(2):598-608. doi: 10.1124/jpet.109.152975.
105. Imbimbo BP, Hutter-Paier B, Villetti G, Facchinetti F, Cenacchi V, Volta R, Lanzillotta A, Pizzi M, Windisch M. CHF5074, a novel gamma-secretase modulator, attenuates brain beta-amyloid pathology and learning deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol*. 2009; 156(6):982-993. doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00097.x.
106. Marcade M, Bourdin J, Loiseau N, Peillon H, Rayet A, Drouin D, Schweighoffer F, Désiré L. Etazolate, a neuroprotective drug linking GABA(A) receptor pharmacology to amyloid precursor protein processing. *J Neurochem*. 2008; 106(1):392-404. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05396.x.
107. Nelson TJ, Sun MK, Lim C, Sen A, Khan T, Chirila FV, Alkon DL. Bryostatin Effects on Cognitive Function and PKC ϵ in Alzheimer's Disease Phase IIa and Expanded Access Trials. *J Alzheimers Dis*. 2017; 58(2):521-535. doi: 10.3233/JAD-170161.
108. Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *J Cent Nerv Syst Dis*. 2020; 12:1179573520907397. doi: 10.1177/1179573520907397.
109. Yen H, Yen H, Chi CC. Is psoriasis associated with dementia or cognitive impairment? A Critically Appraised Topic. *Br J Dermatol*. 2021; 184(1):34-42. doi: 10.1111/bjd.19025.
110. Holthoewer D, Endres K, Schuck F, Hiemke C, Schmitt U, Fahrenholz F. Acitretin, an enhancer of alpha-secretase expression, crosses the blood-brain barrier and is not eliminated by P-glycoprotein. *Neurodegener Dis*. 2012; 10(1-4):224-228. doi: 10.1159/000334300.
111. Park H, Yoo JS, Kim JY, Hwang BY, Han JS, Yeon SW, Kang JH. Anti-amyloidogenic effects of ID1201, the ethanolic extract of the fruits of *Melia toosendan*, through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014; 37(2):513-520. doi: 10.1016/j.etap.2014.01.008.

112. Cai Z, Liu N, Wang C, Qin B, Zhou Y, Xiao M, Chang L, Yan LJ, Zhao B. Role of RAGE in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol.* 2016; 36(4):483-495. doi: 10.1007/s10571-015-0233-3.
113. Khorassani F, Hilas O. Bapineuzumab, an investigational agent for Alzheimer's disease. *P T.* 2013; 38(2):89-91.
114. Abushouk AI, Elmaraezy A, Aglan A, Salama R, Fouda S, Fouda R, AlSafadi AM. Bapineuzumab for mild to moderate Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Neurol.* 2017; 17(1):66. doi: 10.1186/s12883-017-0850-1.
115. Honig LS, Vellas B, Woodward M, Boada M, Bullock R, Borrie M, Hager K, Andreasen N, Scarpini E, Liu-Seifert H, Case M, Dean RA, Hake A, Sundell K, Poole Hoffmann V, Carlson C, Khanna R, Mintun M, DeMattos R, Selzler KJ, Siemers E. Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 2018; 378(4):321-330. doi: 10.1056/NEJMoa1705971.
116. Ostrowitzki S, Bittner T, Sink KM, Mackey H, Rabe C, Honig LS, Cassetta E, Woodward M, Boada M, van Dyck CH, Grimmer T, Selkoe DJ, Schneider A, Blondeau K, Hu N, Quartino A, Clayton D, Dolton M, Dang Y, Ostaszewski B, Sanabria-Bohórquez SM, Rabbia M, Toth B, Eichenlaub U, Smith J, Honigberg LA, Doody RS. Evaluating the Safety and Efficacy of Crenezumab vs Placebo in Adults With Early Alzheimer Disease: Two Phase 3 Randomized Placebo-Controlled Trials. *JAMA Neurol.* 2022; 79(11):1113-1121. doi: 10.1001/jamaneurol.2022.2909.
117. Leurent C, Goodman JA, Zhang Y, He P, Polimeni JR, Gurol ME, Lindsay M, Frattura L, Sohur US, Viswanathan A, Bednar MM, Smith EE; Ponezumab Trial Study Group; Greenberg SM. Immunotherapy with ponezumab for probable cerebral amyloid angiopathy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2019; 6(4):795-806. doi: 10.1002/acn3.761.
118. Gao Y, Tan L, Yu JT, Tan L. Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Curr Alzheimer Res.* 2018; 15(3):283-300. doi: 10.2174/1567205014666170417111859.
119. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules.* 2020; 25(24):5789. doi: 10.3390/molecules25245789.
120. Plotkin SS, Cashman NR. Passive immunotherapies targeting A β and tau in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2020; 144:105010. doi: 10.1016/j.nbd.2020.105010.
121. Theunis C, Crespo-Biel N, Gafner V, Pihlgren M, López-Deber MP, Reis P, Hickman DT, Adolfsson O, Chuard N, Ndao DM, Borghgraef P, Devijver H, Van Leuven F, Pfeifer A, Muhs A. Efficacy and safety of a liposome-based vaccine against protein Tau, assessed in tau.P301L mice that model tauopathy. *PLoS One.* 2013; 8(8):e72301. doi: 10.1371/journal.pone.0072301.
122. Serenó L, Coma M, Rodríguez M, Sánchez-Ferrer P, Sánchez MB, Gich I, Agulló JM, Pérez M, Avila J, Guardia-Laguarta C, Clarimón J, Lleó A,

- Gómez-Isla T. A novel GSK-3 β inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiol Dis.* 2009; 35(3):359-367. doi: 10.1016/j.nbd.2009.05.025.
123. Gauthier S, Feldman HH, Schneider LS, Wilcock GK, Frisoni GB, Hardlund JH, Moebius HJ, Bentham P, Kook KA, Wischik DJ, Schelter BO, Davis CS, Staff RT, Bracoud L, Shamsi K, Storey JM, Harrington CR, Wischik CM. Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial. *Lancet.* 2016; 388(10062):2873-2884. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31275-2.
 124. Lauretti E, Dincer O, Praticò D. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020; 1867(5):118664. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118664.
 125. Novak P, Zilka N, Zilkova M, Kovacech B, Skrabana R, Ondrus M, Fialova L, Kontsejkova E, Otto M, Novak M. AADvac1, an Active Immunotherapy for Alzheimer's Disease and Non Alzheimer Tauopathies: An Overview of Preclinical and Clinical Development. *J Prev Alzheimers Dis.* 2019; 6(1):63-69. doi: 10.14283/jpad.2018.45.
 126. Song C, Shi J, Zhang P, Zhang Y, Xu J, Zhao L, Zhang R, Wang H, Chen H. Immunotherapy for Alzheimer's disease: targeting β -amyloid and beyond. *Transl Neurodegener.* 2022; 11(1):18. doi: 10.1186/s40035-022-00292-3.
 127. Cummings JL, Tong G, Ballard C. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *J Alzheimers Dis.* 2019; 67(3):779-794. doi: 10.3233/JAD-180766.
 128. Lozupone M, Berardino G, Mollica A, Sardone R, Dibello V, Zupo R, Lampignano L, Castellana F, Bortone I, Stallone R, Daniele A, Altamura M, Bellomo A, Solfrizzi V, Panza F. ALZT-OP1: an experimental combination regimen for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 2022; 31(8):759-771. doi: 10.1080/13543784.2022.2095261.
 129. Ettcheto M, Cano A, Sanchez-López E, Verdaguer E, Folch J, Auladell C, Camins A. Masitinib for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis Manag.* 2021; 11(4):263-276. doi: 10.2217/nmt-2021-0019.
 130. Folch J, Petrov D, Ettcheto M, Pedrós I, Abad S, Beas-Zarate C, Lazarowski A, Marin M, Olloquequi J, Auladell C, Camins A. Masitinib for the treatment of mild to moderate Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2015; 15(6):587-596. doi: 10.1586/14737175.2015.1045419.
 131. Grossmann K. Alzheimer's Disease-Rationales for Potential Treatment with the Thrombin Inhibitor Dabigatran. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(9):4805. doi: 10.3390/ijms22094805.
 132. Ono K, Tsuji M. Pharmacological Potential of Cilostazol for Alzheimer's Disease. *Front Pharmacol.* 2019; 10:559. doi: 10.3389/fphar.2019.00559.
 133. Kehoe PG, Turner N, Howden B, Jarutyte L, Clegg SL, Malone IB, Barnes J, Nielsen C, Sudre CH, Wilson A, Thai NJ, Blair PS, Coulthard E, Lane JA, Passmore P, Taylor J, Mutsaerts HJ, Thomas DL, Fox NC, Wilkinson I, Ben-

- Shlomo Y; RADAR investigators. Safety and efficacy of losartan for the reduction of brain atrophy in clinically diagnosed Alzheimer's disease (the RADAR trial): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 2021; 20(11):895-906. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00263-5.
134. Biomed. TRANEUROCIN™ (NA-831™). <https://www.biomedind.com/NA-831.html> (stan z dnia 20.03.2023)
 135. Tang M, Taghibiglou C. The Mechanisms of Action of Curcumin in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2017; 58(4):1003-1016. doi: 10.3233/JAD-170188.
 136. Reddy PH, Manczak M, Yin X, Grady MC, Mitchell A, Tonk S, Kuruva CS, Bhatti JS, Kandimalla R, Vijayan M, Kumar S, Wang R, Pradeepkiran JA, Ogunmokun G, Thamarai K, Quesada K, Boles A, Reddy AP. Protective Effects of Indian Spice Curcumin Against Amyloid- β in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018; 61(3):843-866. doi: 10.3233/JAD-170512.
 137. Dumont M, Kipiani K, Yu F, Wille E, Katz M, Calingasan NY, Gouras GK, Lin MT, Beal MF. Coenzyme Q10 decreases amyloid pathology and improves behavior in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2011; 27(1):211-223. doi: 10.3233/JAD-2011-110209.
 138. McCarthy S, Somayajulu M, Sikorska M, Borowy-Borowski H, Pandey S. Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble Coenzyme Q10. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004; 201(1):21-31. doi: 10.1016/j.taap.2004.04.019.
 139. Somayajulu M, McCarthy S, Hung M, Sikorska M, Borowy-Borowski H, Pandey S. Role of mitochondria in neuronal cell death induced by oxidative stress; neuroprotection by Coenzyme Q10. *Neurobiol Dis.* 2005; 18(3):618-627. doi: 10.1016/j.nbd.2004.10.021.
 140. Pritam P, Deka R, Bhardwaj A, Srivastava R, Kumar D, Jha AK, Jha NK, Villa C, Jha SK. Antioxidants in Alzheimer's Disease: Current Therapeutic Significance and Future Prospects. *Biology (Basel).* 2022; 11(2):212. doi: 10.3390/biology11020212.
 141. de la Monte SM, Wands JR. Alzheimer's disease is type 3 diabetes-evidence reviewed. *J Diabetes Sci Technol.* 2008; 2(6):1101-1113. doi: 10.1177/193229680800200619.
 142. Grozavescu MS, Butnariu M. Biochemical Aspects of Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res.* 2021; 3(2):1-7. doi: 10.47363/JDRR/2021(3)123.
 143. Barbagallo M, Dominguez LJ. Type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *World J Diabetes.* 2014; 5(6):889-893. doi: 10.4239/wjd.v5.i6.889.
 144. Hallschmid M. Intranasal Insulin for Alzheimer's Disease. *CNS Drugs.* 2021; 35(1):21-37. doi: 10.1007/s40263-020-00781-x.
 145. Cummings J, Ortiz A, Castellino J, Kinney J. Diabetes: Risk factor and translational therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci.* 2022; 56(9):5727-5757. doi: 10.1111/ejn.15619.

146. Vargas-Soria M, Carranza-Naval MJ, Del Marco A, Garcia-Alloza M. Role of liraglutide in Alzheimer's disease pathology. *Alzheimers Res Ther.* 2021; 13(1):112. doi: 10.1186/s13195-021-00853-0.
147. Wiciński M, Socha M, Malinowski B, Wódkiewicz E, Walczak M, Górski K, Słupski M, Pawlak-Osińska K. Liraglutide and its Neuroprotective Properties-Focus on Possible Biochemical Mechanisms in Alzheimer's Disease and Cerebral Ischemic Events. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(5):1050. doi: 10.3390/ijms20051050.
148. Shaikh S, Rizvi SM, Shakil S, Riyaz S, Biswas D, Jahan R. Forxiga (dapagliflozin): Plausible role in the treatment of diabetes-associated neurological disorders. *Biotechnol Appl Biochem.* 2016; 63(1):145-150. doi: 10.1002/bab.1319.
149. Vogt NM, Hunt JFV, Ma Y, Van Hulle CA, Adluru N, Chappell RJ, Lazar KK, Jacobson LE, Austin BP, Asthana S, Johnson SC, Bendlin BB, Carlsson CM. Effects of simvastatin on white matter integrity in healthy middle-aged adults. *Ann Clin Transl Neurol.* 2021; 8(8):1656-1667. doi: 10.1002/acn3.51421.
150. Gepner AD, Lazar K, Hulle CV, Korcarz CE, Asthana S, Carlsson CM. Effects of Simvastatin on Augmentation Index Are Transient: Outcomes From a Randomized Controlled Trial. *J Am Heart Assoc.* 2019; 8(20):e009792. doi: 10.1161/JAHA.118.009792.
151. ClinicalTrials.com. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00151502?cond=atorvastatin+AD&draw=2&rank=1> (stan z dnia 29.03.2023)
152. Gibson GE, Luchsinger JA, Cirio R, Chen H, Franchino-Elder J, Hirsch JA, Bettendorff L, Chen Z, Flowers SA, Gerber LM, Grandville T, Schupf N, Xu H, Stern Y, Habeck C, Jordan B, Fonzetti P. Benfotiamine and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease: Results of a Randomized Placebo-Controlled Phase IIa Clinical Trial. *J Alzheimers Dis.* 2020; 78(3):989-1010. doi: 10.3233/JAD-200896.
153. Calsolaro V, Antognoli R, Okoye C, Monzani F. The Use of Antipsychotic Drugs for Treating Behavioral Symptoms in Alzheimer's Disease. *Front Pharmacol.* 2019; 10:1465. doi: 10.3389/fphar.2019.01465.
154. Abraha I, Rimland JM, Trotta FM, Dell'Aquila G, Cruz-Jentoft A, Petrovic M, Gudmundsson A, Soiza R, O'Mahony D, Guaita A, Cherubini A. Systematic review of systematic reviews of non-pharmacological interventions to treat behavioural disturbances in older patients with dementia. The SENATOR-OnTop series. *BMJ Open.* 2017; 7(3):e012759. doi: 10.1136/bmjopen-2016-012759. Erratum in: *BMJ Open.* 2017; 7(7):e012759corr1.
155. Zhang Z, Xu J, Xu P, Liu W, He X, Fu K. Quetiapine Combined with Sodium Valproate in Patients with Alzheimer's Disease with Mental and Behavioral Symptoms Efficacy Observation. *J Healthc Eng.* 2022; 2022:1278092. doi: 10.1155/2022/1278092.

156. Creese B, Da Silva MV, Johar I, Ballard C. The modern role of antipsychotics for the treatment of agitation and psychosis in Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2018; 18(6):461-467. doi: 10.1080/14737175.2018.1476140.
157. Davies SJ, Burhan AM, Kim D, Gerretsen P, Graff-Guerrero A, Woo VL, Kumar S, Colman S, Pollock BG, Mulsant BH, Rajji TK. Sequential drug treatment algorithm for agitation and aggression in Alzheimer's and mixed dementia. *J Psychopharmacol.* 2018; 32(5):509-523. doi: 10.1177/0269881117744996.
158. De Deyn PP, Drenth AF, Kremer BP, Oude Voshaar RC, Van Dam D. Aripiprazole in the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother.* 2013; 14(4):459-474. doi: 10.1517/14656566.2013.764989.
159. Lanctôt KL, Amatniek J, Ancoli-Israel S, Arnold SE, Ballard C, Cohen-Mansfield J, Ismail Z, Lyketsos C, Miller DS, Musiek E, Osorio RS, Rosenberg PB, Satlin A, Steffens D, Tariot P, Bain LJ, Carrillo MC, Hendrix JA, Jurgens H, Boot B. Neuropsychiatric signs and symptoms of Alzheimer's disease: New treatment paradigms. *Alzheimers Dement (N Y).* 2017; 3(3):440-449. doi: 10.1016/j.trci.2017.07.001.
160. Creese B, Griffiths A, Brooker H, Corbett A, Aarsland D, Ballard C, Ismail Z. Profile of mild behavioral impairment and factor structure of the Mild Behavioral Impairment Checklist in cognitively normal older adults. *Int Psychogeriatr.* 2020; 32(6):705-717. doi: 10.1017/S1041610219001200.
161. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2018; 25(1):59-70. doi: 10.1111/ene.13439.
162. Masopust J, Protopopová D, Vališ M, Pavelek Z, Klímová B. Treatment of behavioral and psychological symptoms of dementias with psychopharmaceuticals: a review. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2018; 14:1211-1220. doi: 10.2147/NDT.S163842.
163. Caraci F, Santagati M, Caruso G, Cannavò D, Leggio GM, Salomone S, Drago F. New antipsychotic drugs for the treatment of agitation and psychosis in Alzheimer's disease: focus on brexpiprazole and pimavanserin. *F1000Res.* 2020; 9:F1000 Faculty Rev-686. doi: 10.12688/f1000research.22662.1.
164. Kishi T, Oya K, Iwata N. Long-acting injectable antipsychotics for the prevention of relapse in patients with recent-onset psychotic disorders: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Psychiatry Res.* 2016; 246:750-755. doi: 10.1016/j.psychres.2016.10.053.
165. Pharmindex.pl. <https://pharmindex.pl/listalekow#> (stan z dnia 16.08.2023)
166. Calsolaro V, Femminella GD, Rogani S, Esposito S, Franchi R, Okoye C, Rengo G, Monzani F. Behavioral and Psychological Symptoms in Dementia (BPSD) and the Use of Antipsychotics. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021; 14(3):246. doi: 10.3390/ph14030246.
167. Ameer MA, Saadabadi A. Neuroleptic Medications. 2022 Aug 29. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. PMID: 29083668.*

168. Parnowski T, Borzym A, Broczek K, Mastalerz-Migas A, Szafrński T. Rekomendacje leczenia pobudzenia u chorych z otępieniem dla lekarzy POZ. *Lekarz POZ*. 2018; 4(4):239-262.
169. Ballard C, Howard R. Neuroleptic drugs in dementia: benefits and harm. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7(6):492-500. doi: 10.1038/nrn1926.
170. Patel AN, Lee S, Andrews HF, Pelton GH, Schultz SK, Sultzer DL, Mintzer J, de la Pena D, Gupta S, Colon S, Schimming C, Levin B, Devanand DP. Prediction of Relapse After Discontinuation of Antipsychotic Treatment in Alzheimer's Disease: The Role of Hallucinations. *Am J Psychiatry*. 2017; 174(4):362-369. doi: 10.1176/appi.ajp.2016.16020226.
171. De Deyn PP, Carrasco MM, Deberdt W, Jeandel C, Hay DP, Feldman PD, Young CA, Lehman DL, Breier A. Olanzapine versus placebo in the treatment of psychosis with or without associated behavioral disturbances in patients with Alzheimer's disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2004; 19(2):115-126. doi: 10.1002/gps.1032.
172. Deberdt WG, Dysken MW, Rappaport SA, Feldman PD, Young CA, Hay DP, Lehman DL, Dossenbach M, Degenhardt EK, Breier A. Comparison of olanzapine and risperidone in the treatment of psychosis and associated behavioral disturbances in patients with dementia. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2005; 13(8):722-730. doi: 10.1176/appi.ajgp.13.8.722.
173. Zhong KX, Tariot PN, Mintzer J, Minkwitz MC, Devine NA. Quetiapine to treat agitation in dementia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Curr Alzheimer Res*. 2007; 4(1):81-93. doi: 10.2174/156720507779939805.
174. Vigen CL, Mack WJ, Keefe RS, Sano M, Sultzer DL, Stroup TS, Dagerman KS, Hsiao JK, Lebowitz BD, Lyketsos CG, Tariot PN, Zheng L, Schneider LS. Cognitive effects of atypical antipsychotic medications in patients with Alzheimer's disease: outcomes from CATIE-AD. *Am J Psychiatry*. 2011; 168(8):831-839. doi: 10.1176/appi.ajp.2011.08121844.
175. Ballard C, Margallo-Lana M, Juszczak E, Douglas S, Swann A, Thomas A, O'Brien J, Eversatt A, Sadler S, Maddison C, Lee L, Bannister C, Elvish R, Jacoby R. Quetiapine and rivastigmine and cognitive decline in Alzheimer's disease: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ*. 2005; 330(7496):874. doi: 10.1136/bmj.38369.459988.8F.
176. De Deyn P, Jeste DV, Swanink R, Kostic D, Breder C, Carson WH, Iwamoto T. Aripiprazole for the treatment of psychosis in patients with Alzheimer's disease: a randomized, placebo-controlled study. *J Clin Psychopharmacol*. 2005; 25(5):463-467. doi: 10.1097/01.jcp.0000178415.22309.8f. Erratum in: *J Clin Psychopharmacol*. 2005; 25(6):560. Carson, William H [added]; Iwamoto, Taro [added].
177. Streim JE, Porsteinsson AP, Breder CD, Swanink R, Marcus R, McQuade R, Carson WH. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of aripiprazole for the treatment of psychosis in nursing home patients with

- Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2008; 16(7):537-550. doi: 10.1097/JGP.0b013e318165db77.
178. Ahmed M, Malik M, Teselink J, Lanctôt KL, Herrmann N. Current Agents in Development for Treating Behavioral and Psychological Symptoms Associated with Dementia. *Drugs Aging*. 2019; 36(7):589-605. doi: 10.1007/s40266-019-00668-7.
179. Porsteinsson AP, Antonsdottir IM. An update on the advancements in the treatment of agitation in Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2017; 18(6):611-620. doi: 10.1080/14656566.2017.1307340.
180. Prior M, Chiruta C, Currais A, Goldberg J, Ramsey J, Dargusch R, Maher PA, Schubert D. Back to the future with phenotypic screening. *ACS Chem Neurosci*. 2014; 5(7):503-513. doi: 10.1021/cn500051h.
181. Croston GE. The utility of target-based discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2017; 12(5):427-429. doi: 10.1080/17460441.2017.1308351.
182. Park K. A review of computational drug repurposing. *Transl Clin Pharmacol*. 2019; 27(2):59-63. doi: 10.12793/tcp.2019.27.2.59.
183. Schcolnik-Cabrera A, Juárez-López D, Duenas-Gonzalez A. Perspectives on Drug Repurposing. *Curr Med Chem*. 2021; 28(11):2085-2099. doi: 10.2174/0929867327666200831141337.
184. Xue H, Li J, Xie H, Wang Y. Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. *Int J Biol Sci*. 2018; 14(10):1232-1244. doi: 10.7150/ijbs.24612.
185. Ihara M, Saito S. Drug Repositioning for Alzheimer's Disease: Finding Hidden Clues in Old Drugs. *J Alzheimers Dis*. 2020; 74(4):1013-1028. doi: 10.3233/JAD-200049.
186. Tan GSQ, Sloan EK, Lambert P, Kirkpatrick CMJ, Ilomäki J. Drug repurposing using real-world data. *Drug Discov Today*. 2023; 28(1):103422. doi: 10.1016/j.drudis.2022.103422.
187. Jourdan JP, Bureau R, Rochais C, Dallemagne P. Drug repositioning: a brief overview. *J Pharm Pharmacol*. 2020; 72(9):1145-1151. doi: 10.1111/jphp.13273.
188. Shukla R, Henkel ND, Alganem K, Hamoud AR, Reigle J, Alnafisah RS, Eby HM, Imami AS, Creeden JF, Miruzzi SA, Meller J, Mccullumsmith RE. Signature-based approaches for informed drug repurposing: targeting CNS disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2021; 46(1):116-130. doi: 10.1038/s41386-020-0752-6.
189. Delavan B, Roberts R, Huang R, Bao W, Tong W, Liu Z. Computational drug repositioning for rare diseases in the era of precision medicine. *Drug Discov Today*. 2018; 23(2):382-394. doi: 10.1016/j.drudis.2017.10.009.
190. Khairy GM, El-Sheikh SMA, Eleiwa NZ, Galal AAA. Sildenafil: From angina to SARS-CoV-2. *Sexologies*. 2021; 30(4):e149-154. doi: 10.1016/j.sexol.2021.05.002.
191. Vargesson N. Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2015; 105(2):140-156. doi: 10.1002/bdrc.21096.

192. Polamreddy P, Gattu N. The drug repurposing landscape from 2012 to 2017: evolution, challenges, and possible solutions. *Drug Discov Today*. 2019; 24(3):789-795. doi: 10.1016/j.drudis.2018.11.022.
193. Jourdan JP, Bureau R, Rochais C, Dallemagne P. Drug repositioning: a brief overview. *J Pharm Pharmacol*. 2020; 72(9):1145-1151. doi: 10.1111/jphp.13273.
194. Roder C, Thomson MJ. Auranofin: repurposing an old drug for a golden new age. *Drugs R D*. 2015; 15(1):13-20. doi: 10.1007/s40268-015-0083-y.
195. ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Auranofin&cntry=&state=&city=&dist=> (stan z dnia 9.04.2023)
196. ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Rasagiline&cntry=&state=&city=&dist=> (stan z dnia 9.04.2023)
197. Khatri DK, Kadbhane A, Patel M, Nene S, Atmakuri S, Srivastava S, Singh SB. Gauging the role and impact of drug interactions and repurposing in neurodegenerative disorders. *Curr Res Pharmacol Drug Discov*. 2021; 2:100022. doi: 10.1016/j.crphar.2021.100022.
198. Cummings JL, Tong G, Ballard C. Treatment Combinations for Alzheimer's Disease: Current and Future Pharmacotherapy Options. *J Alzheimers Dis*. 2019; 67(3):779-794. doi: 10.3233/JAD-180766.
199. Norins LC. Repurposing Licensed Drugs for Use Against Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2021; 81(3):921-932. doi: 10.3233/JAD-210080.
200. Ballard C, Aarsland D, Cummings J, O'Brien J, Mills R, Molinuevo JL, Fladby T, Williams G, Doher.ty P, Corbett A, Sultana J. Drug repositioning and repurposing for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2020; 16(12):661-673. doi: 10.1038/s41582-020-0397-4.
201. Bauzon J, Lee G, Cummings J. Repurposed agents in the Alzheimer's disease drug development pipeline. *Alzheimers Res Ther*. 2020; 12(1):98. doi: 10.1186/s13195-020-00662-x.
202. Sikora J, Podsiedlik M, Pietras T, Kosmalski M, Matłoka M, Moszczyński-Petkowski R, Wiczorek M, Markowicz-Piasecka M. Quetiapine and novel PDE10A inhibitors potentiate the anti-BuChE activity of donepezil. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2020; 35(1):1743-1750. doi: 10.1080/14756366.2020.1818739.
203. Coryell W, Miller DD, Perry PJ. Haloperidol plasma levels and dose optimization. *Am J Psychiatry*. 1998; 155(1):48-53. doi: 10.1176/ajp.155.1.48.
204. Regenthal R, Krueger M, Koepfel C, Preiss R. Drug levels: Therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs. *J ClinMonit* 1999; 15:529-544.
205. Someya T, Muratake T, Hirokane G, Shibasaki M, Shimoda K, Takahashi S. Interindividual variation in bromperidol metabolism and relationship to therapeutic effects. *J Clin Psychopharmacol*. 2000; 20(2):175-180. doi: 10.1097/00004714-200004000-00009.
206. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, Conca A, Dietmaier O, Egberts K, Fric M, Gerlach M, Greiner C, Gründer G, Haen E, Havemann-Reinecke U,

- Jaquenoud Sirot E, Kirchherr H, Laux G, Lutz UC, Messer T, Müller MJ, Pfuhlmann B, Rambeck B, Riederer P, Schoppek B, Stingl J, Uhr M, Ulrich S, Waschgl R, Zernig G. AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. *Pharmacopsychiatry*. 2011; 44(6):195-235. doi: 10.1055/s-0031-1286287.
207. Seiler W, Wetzel H, Hillert A, Schöllnhammer G, Langer M, Barlage U, Hiemke C. Pharmacokinetics and bioavailability of benperidol in schizophrenic patients after intravenous and two different kinds of oral application. *Psychopharmacology (Berl)*. 1994; 116(4):457-63. doi: 10.1007/BF02247478.
208. Schulz M, Schmoldt A. Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. *Pharmazie*. 2003; 58(7):447-474.
209. Kerbusch T, Desta Z, Soukhova NV, Thacker D, Flockhart DA. Sensitive assay for pimozone in human plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997; 694(1):163-168. doi: 10.1016/s0378-4347(97)00152-7.
210. Arabali V, Ebrahimi M, Karimi-Maleh H. Highly sensitive determination of promazine in pharmaceutical and biological samples using a ZnO nanoparticle-modified ionic liquid carbon paste electrode. *Chinese Chemical Letters*. 2016; 27(5):779-782. doi.org/10.1016/j.ccllet.2016.01.026.
211. Coin A, Pamio MV, Alexopoulos C, Granziera S, Groppa F, de Rosa G, Girardi A, Sergi G, Manzato E, Padriani R. Donepezil plasma concentrations, CYP2D6 and CYP3A4 phenotypes, and cognitive outcome in Alzheimer's disease. *Eur J Clin Pharmacol*. 2016; 72(6):711-717. doi: 10.1007/s00228-016-2033-1.
212. Yang YH, Chen CH, Chou MC, Li CH, Liu CK, Chen SH. Concentration of donepezil to the cognitive response in Alzheimer disease. *J Clin Psychopharmacol*. 2013; 33(3):351-355. doi: 10.1097/JCP.0b013e31828b5087.
213. Ortner M, Stange M, Schneider H, Schröder C, Buerger K, Müller C, Müller-Sarnowski F, Diehl-Schmid J, Förstl H, Grimmer T, Steimer W. Therapeutic Drug Monitoring of Rivastigmine and Donepezil Under Consideration of CYP2D6 Genotype-Dependent Metabolism of Donepezil. *Drug Des Devel Ther*. 2020; 14:3251-3262. doi: 10.2147/DDDT.S247259.
214. Kurz A, Farlow M, Lefèvre G. Pharmacokinetics of a novel transdermal rivastigmine patch for the treatment of Alzheimer's disease: a review. *Int J Clin Pract*. 2009; 63(5):799-805. doi: 10.1111/j.1742-1241.2009.02052.x.
215. Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C, Eyer P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta*. 1999; 288(1-2):73-90. doi: 10.1016/s0009-8981(99)00144-8.
216. Sikora J, Szymański P, Janus M, Mikiciuk-Olasik E. Test *in vitro* for the assessment of the biological activity of acetylcholinesterase inhibitors. *Problemy Terapii Monitorowanej*. 2010; 21(4):239-244.

217. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* 2006; 58(3):621-681. doi: 10.1124/pr.58.3.10
218. Chiu YJ, Hsieh YH, Lin TH, Lee GC, Hsieh-Li HM, Sun YC, Chen CM, Chang KH, Lee-Chen GJ. Novel compound VB-037 inhibits A β aggregation and promotes neurite outgrowth through enhancement of HSP27 and reduction of P38 and JNK-mediated inflammation in cell models for Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2019; 125:175-186. doi: 10.1016/j.neuint.2019.01.021.
219. Olasehinde TA, Odjadjare EC, Mabinya LV, Olaniran AO, Okoh AI. *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella minutissima* exhibit antioxidant potentials, inhibit cholinesterases and modulate disaggregation of β -amyloid fibrils. *Electronic Journal of Biotechnology Electronic Journal of Biotechnology.* 2019; 40:1-9, doi: 10.1016/j.ejbt.2019.03.008.
220. Mao F, Huang L, Luo Z, Liu A, Lu C, Xie Z, Li X. O-Hydroxyl- or o-amino benzylamine-tacrine hybrids: multifunctional biometals chelators, antioxidants, and inhibitors of cholinesterase activity and amyloid- β aggregation. *Bioorg Med Chem.* 2012; 20(19):5884-5892. doi: 10.1016/j.bmc.2012.07.045.
221. Markowicz-Piasecka M, Huttunen KM, Sikora J. Metformin and its sulphonamide derivative simultaneously potentiate anti-cholinesterase activity of donepezil and inhibit beta-amyloid aggregation. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2018; 33(1):1309-1322. doi: 10.1080/14756366.2018.1499627.
222. Catto M, Berezin AA, Lo Re D, Loizou G, Demetriades M, De Stradis A, Campagna F, Koutentis PA, Carotti A. Design, synthesis and biological evaluation of benzo[e][1,2,4]triazin-7(1H)-one and [1,2,4]-triazino[5,6,1-jk]carbazol-6-one derivatives as dual inhibitors of beta-amyloid aggregation and acetyl/butyryl cholinesterase. *Eur J Med Chem.* 2012; 58:84-97. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.10.003.
223. Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. Anti-amyloidogenic activity of tannic acid and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1690(3):193-202. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.06.008.
224. Tiiman A, Krishtal J, Palumaa P, Tõugu V. In vitro fibrillization of Alzheimer's amyloid β peptide (1-42). *AIP Advances.* 2015; 5:092401. doi: 10.1063/1.4921071.
225. Li YP, Ning FX, Yang MB, Li YC, Nie MH, Ou TM, Tan JH, Huang SL, Li D, Gu LQ, Huang ZS. Syntheses and characterization of novel oxoisoaporphine derivatives as dual inhibitors for cholinesterases and amyloid beta aggregation. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(5):1572-1581. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.02.005.
226. Baldivia DDS, Leite DF, Castro DTH, Campos JF, Santos UPD, Paredes-Gamero EJ, Carollo CA, Silva DB, de Picoli Souza K, Dos Santos EL. Evaluation of In Vitro Antioxidant and Anticancer Properties of the Aqueous

- Extract from the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens*. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(8):2432. doi: 10.3390/ijms19082432.
227. Takara. <https://www.takarabio.com/products/gene-function/cell-biology-assays/cell-biology-reagents/wst-1-cell-proliferation> (stan z dnia 22.08.2023).
 228. Magliulo L, Dahl ML, Lombardi G, Fallarini S, Villa LM, Biolcati A, Scordo MG. Do CYP3A and ABCB1 genotypes influence the plasma concentration and clinical outcome of donepezil treatment? *Eur J Clin Pharmacol*. 2011; 67(1):47-54. doi: 10.1007/s00228-010-0883-5.
 229. Valis M, Masopust J, Vysata O, Hort J, Dolezal R, Tomek J, Misik J, Kuca K, Karasova JZ. Concentration of Donepezil in the Cerebrospinal Fluid of AD Patients: Evaluation of Dosage Sufficiency in Standard Treatment Strategy. *Neurotox Res*. 2017; 31(1):162-168. doi: 10.1007/s12640-016-9672-y.
 230. Rakonczay Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta. Biol. Hung*. 2003; 54(2):183-189. doi: 10.1556/ABiol.54.2003.2.7.
 231. Shahrivar-Gargari M, Hamzeh-Mivehroud M, Hemmati S, Mojarrad JS, Tüylü Küçükkılınç T, Ayazgök B, Dastmalchi S. Hybridization-based design of novel anticholinesterase indanone-carbamates for Alzheimer's disease: Synthesis, biological evaluation, and docking studies. *Arch. Pharm*. 2021; 354:2000453. doi: 10.1002/ardp.202000453.
 232. Li F, Wang ZM, Wu JJ, Wang J, Xie SS, Lan JS, Xu W, Kong LY, Wang XB. Synthesis and pharmacological evaluation of donepezil-based agents as new cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the potential application against Alzheimer's disease. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016; 31(sup3):41-53. doi: 10.1080/14756366.2016.1201814.
 233. Wang L, Wang Y, Tian Y, Shang J, Sun X, Chen H, Wang H, Tan W. Design, synthesis, biological evaluation, and molecular modeling studies of chalcone-rivastigmine hybrids as cholinesterase inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2017; 25(1):360-371. doi: 10.1016/j.bmc.2016.11.002.
 234. Sang Z, Wang K, Shi J, Cheng X, Zhu G, Wei R, Ma Q, Yu L, Zhao Y, Tan Z, Liu W. Apigenin-rivastigmine hybrids as multi-target-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*. 2020; 187:111958. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111958.
 235. Vorčáková K, Májektivá M, Horáková E, Drabina P, Sedlák M, Štěpánková Š. Synthesis and characterization of new inhibitors of cholinesterases based on N-phenylcarbamates: In vitro study of inhibitory effect, type of inhibition, lipophilicity and molecular docking. *Bioorg Chem*. 2018; 78:280-289. doi: 10.1016/j.bioorg.2018.03.012.
 236. Grossberg GT. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2003; 64(4):216-235. doi: 10.1016/S0011-393X(03)00059-6.
 237. Tasso B, Catto M, Nicolotti O, Novelli F, Tonelli M, Giangreco I, Pisani L, Sparatore A, Boido V, Carotti A, Sparatore F. Quinolizidinyl derivatives of bi- and tricyclic systems as potent inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase

- with potential in Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(6):2170-2184. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.02.071.
238. Osmaniye D, Sağlık BN, Acar Çevik U, Levent S, Kaya Çavuşoğlu B, Özkay Y, Kaplancıklı ZA, Turan G. Synthesis and AChE Inhibitory Activity of Novel Thiazolylhydrazone Derivatives. *Molecules.* 2019; 24(13):2392. doi: 10.3390/molecules24132392.
239. Wilkinson DG. The pharmacology of donepezil: a new treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Pharmacother.* 1999; 1(1):121-135. doi: 10.1517/14656566.1.1.121.
240. Shintani EY, Uchida KM. Donepezil: an anticholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *Am J Health Syst Pharm.* 1997; 54(24):2805-2810. doi: 10.1093/ajhp/54.24.2805.
241. Jann MW. Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy.* 2000; 20(1):1-12. doi: 10.1592/phco.20.1.1.34664.
242. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemia.* Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN. 2005; 41-76.
243. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2019; 14(1):32. doi: 10.1186/s13024-019-0333-5.
244. Yang P, Sun F. Aducanumab: The first targeted Alzheimer's therapy. *Drug Discov Ther.* 2021; 15(3):166-168. doi: 10.5582/ddt.2021.01061.
245. Hoy SM. Lecanemab: First Approval. *Drugs.* 2023; 83(4):359-365. doi: 10.1007/s40265-023-01851-2.
246. Dunn B, Stein P, Cavazzoni P. Approval of Aducanumab for Alzheimer Disease-the FDA's Perspective. *JAMA Intern Med.* 2021; 181(10):1276-1278. doi: 10.1001/jamainternmed.2021.4607.
247. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y, O'Gorman J, Qian F, Arastu M, Li M, Chollate S, Brennan MS, Quintero-Monzon O, Scannevin RH, Arnold HM, Engber T, Rhodes K, Ferrero J, Hang Y, Mikulskis A, Grimm J, Hock C, Nitsch RM, Sandrock A. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature.* 2016; 537(7618):50-56. doi: 10.1038/nature19323. Update in: *Nature.* 2017; 546(7659):564.
248. Wojcieszak J. Adukanumab i lekanemab – dwa nowe przeciwciała przeciw patologicznym formom amyloidu beta w terapii choroby Alzheimer'a. *Farm Pol.* 2023; 79(1):21–31. doi: 10.32383/farmpol/166243.
249. Pawlowski M, Warnecke T. Kausale Therapie der Alzheimer-Krankheit: Amyloidantikörper [Causal treatment of Alzheimer's disease: amyloid antibodies]. *Inn Med (Heidelb).* 2022; 63(9):1000-1008. German. doi: 10.1007/s00108-022-01291-2.
250. Nisticò R, Borg JJ. Aducanumab for Alzheimer's disease: A regulatory perspective. *Pharmacol Res.* 2021; 171:105754. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105754.

251. Baker J, Schott JM. AD and its comorbidities: An obstacle to develop a clinically efficient treatment? *Rev Neurol (Paris)*. 2022; 178(5):450-459. doi: 10.1016/j.neurol.2022.03.001.
252. Salloway S, Chalkias S, Barkhof F, Burkett P, Barakos J, Purcell D, Suhy J, Forrestal F, Tian Y, Umans K, Wang G, Singhal P, Budd Haeberlein S, Smirnakis K. Amyloid-Related Imaging Abnormalities in 2 Phase 3 Studies Evaluating Aducanumab in Patients With Early Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*. 2022; 79(1):13-21. doi: 10.1001/jamaneurol.2021.4161.
253. Magierski R, Sobow T, Schwertner E, Religa D. Pharmacotherapy of Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia: State of the Art and Future Progress. *Front Pharmacol*. 2020; 11:1168. doi: 10.3389/fphar.2020.01168.
254. da Silva EM, Braga RCOP, Avelino-Silva TJ, Gil Junior LA. Antipsychotics in Alzheimer's disease: A critical analysis. *Dement Neuropsychol*. 2011; 5(1):38-43. doi: 10.1590/S1980-57642011DN05010007.
255. Ballard C, Waite J. The effectiveness of atypical antipsychotics for the treatment of aggression and psychosis in Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006; (1):CD003476. doi: 10.1002/14651858.CD003476.pub2.
256. Baker NC, Ekins S, Williams AJ, Tropsha A. A bibliometric review of drug repurposing. *Drug Discov Today*. 2018; 23(3):661-672. doi: 10.1016/j.drudis.2018.01.018.
257. Langedijk J, Mantel-Teeuwisse AK, Slijkerman DS, Schutjens MH. Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug Discov Today*. 2015; 20(8):1027-1034. doi: 10.1016/j.drudis.2015.05.001.
258. Jann MW. Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy*. 2000; 20(1):1-12. doi: 10.1592/phco.20.1.1.34664.
259. Caldwell GW, Yan Z, Lang W, Masucci JA. The IC(50) concept revisited. *Curr Top Med Chem*. 2012; 12(11):1282-1290. doi: 10.2174/156802612800672844.
260. Larik FA, Saeed A, Faisal M, Hamdani S, Jabeen F, Channar PA, Mumtaz A, Khan I, Kazi MA, Abbas Q, Hassan M, Korabecny J, Seo SY. Synthesis, inhibition studies against AChE and BChE, drug-like profiling, kinetic analysis and molecular docking studies of N-(4-phenyl-3-aryloyl-2(3H)-ylidene) substituted acetamides. *Journal of Molecular Structure*. 2020; 1203:127459. doi: 10.1016/j.molstruc.2019.127459.
261. Pinto T, Lanctôt KL, Herrmann N. Revisiting the cholinergic hypothesis of behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer's type. *Ageing Res Rev*. 2011; 10(4):404-412. doi: 10.1016/j.arr.2011.01.003.
262. Arendt T, Bigl V, Arendt A, Tennstedt A. Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease. *Acta Neuropathol*. 1983; 61(2):101-108. doi: 10.1007/BF00697388.

263. Makarian M, Gonzalez M, Salvador SM, Lorzadeh S, Hudson PK, Pecic S. Synthesis, kinetic evaluation and molecular docking studies of donepezil-based acetylcholinesterase inhibitors. *J Mol Struct.* 2022; 1247:131425. doi: 10.1016/j.molstruc.2021.131425.
264. Kareem RT, Abedinifar F, Mahmood EA, Ebadi AG, Rajabi F, Vessally E. The recent development of donepezil structure-based hybrids as potential multifunctional anti-Alzheimer's agents: highlights from 2010 to 2020. *RSC Adv.* 2021; 11(49):30781-30797. doi: 10.1039/d1ra03718h.
265. Zhou Y, Wang S, Zhang Y. Catalytic reaction mechanism of acetylcholinesterase determined by Born-Oppenheimer ab initio QM/MM molecular dynamics simulations. *J Phys Chem B.* 2010; 114(26):8817-8825. doi: 10.1021/jp104258d.
266. Tachikawa H, Igarashi M, Nishihira J, Ishibashi T. Ab initio model study on acetylcholinesterase catalysis: potential energy surfaces of the proton transfer reactions. *J Photochem Photobiol B.* 2005; 79(1):11-23. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2004.11.015.
267. Mostofi M, Ziarani GM, Lashgari N. Design, synthesis and biological evaluation of benzofuran appended benzothiazepine derivatives as inhibitors of butyrylcholinesterase and antimicrobial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2018; 26(12): 3076-3095. doi: 10.1016/j.bmc.2018.02.049.
268. Schwarthoff S, Tischer N, Sager H, Schätz B, Rohrbach MM, Raztsou I, Robaa D, Gaube F, Arndt HD, Winckler T. Evaluation of γ -carboline-phenothiazine conjugates as simultaneous NMDA receptor blockers and cholinesterase inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2021; 46:116355. doi: 10.1016/j.bmc.2021.116355.
269. Debord J, Merle L, Bollinger JC, Dantoine T. Inhibition of butyrylcholinesterase by phenothiazine derivatives. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2002; 17(3):197-202. doi: 10.1080/1475636021000003165.
270. Darvesh S, Pottie IR, Darvesh KV, McDonald RS, Walsh R, Conrad S, Penwell A, Mataija D, Martin E. Differential binding of phenothiazine urea derivatives to wild-type human cholinesterases and butyrylcholinesterase mutants. *Bioorg Med Chem.* 2010; 18(6):2232-2244. doi: 10.1016/j.bmc.2010.01.066.
271. Dighe SN, Deora GS, De la Mora E, Nachon F, Chan S, Parat MO, Brazzolotto X, Ross BP. Discovery and Structure-Activity Relationships of a Highly Selective Butyrylcholinesterase Inhibitor by Structure-Based Virtual Screening. *J Med Chem.* 2016; 59(16):7683-7689. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00356.
272. Tasso B, Catto M, Nicolotti O, Novelli F, Tonelli M, Giangreco I, Pisani L, Sparatore A, Boido V, Carotti A, Sparatore F. Quinolizidinyl derivatives of bi- and tricyclic systems as potent inhibitors of acetyl- and butyrylcholinesterase with potential in Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(6):2170-2184. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.02.071.

273. Obara K, Fujii A, Arie C, Harada N, Yamaki F, Matsuo K, Yoshio T, Tanaka Y. Inhibition of Recombinant Human Acetylcholinesterase Activity by Antipsychotics. *Pharmacology*. 2019;104(1-2):43-50. doi: 10.1159/000500227.
274. Silva MA, Kiametis AS, Treptow W. Donepezil Inhibits Acetylcholinesterase via Multiple Binding Modes at Room Temperature. *J Chem Inf Model*. 2020; 60(7):3463-3471. doi: 10.1021/acs.jcim.9b01073.
275. Bacalhau P, San Juan AA, Goth A, Caldeira AT, Martins R, Burke AJ. Insights into (S)-rivastigmine inhibition of butyrylcholinesterase (BuChE): Molecular docking and saturation transfer difference NMR (STD-NMR). *Bioorg Chem*. 2016; 67:105-109. doi: 10.1016/j.bioorg.2016.06.002.
276. Kandiah N, Pai MC, Senanarong V, Looi I, Ampil E, Park KW, Karanam AK, Christopher S. Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clin Interv Aging*. 2017; 12:697-707. doi: 10.2147/CIA.S129145.
277. Tsuno N. Donepezil in the treatment of patients with Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. 2009; 9(5):591-598. doi: 10.1586/ern.09.23.
278. Kabir MT, Uddin MS, Mamun AA, Jeandet P, Aleya L, Mansouri RA, Ashraf GM, Mathew B, Bin-Jumah MN, Abdel-Daim MM. Combination Drug Therapy for the Management of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(9):3272. doi: 10.3390/ijms21093272.
279. Hu Z, Wang L, Ma S, Kirisci L, Feng Z, Xue Y, Klunk WE, Kamboh MI, Sweet RA, Becker J, Lv Q, Lopez OL, Xie XQ. Synergism of antihypertensives and cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (NY)*. 2018; 4:542-555. doi: 10.1016/j.trci.2018.09.001.
280. Teo E, Fong S, Tolwinski N, Gruber J. Drug synergy as a strategy for compression of morbidity in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. *Geroscience*. 2020; 42(3):849-856. doi: 10.1007/s11357-020-00169-1.
281. Wadenberg ML, Fjällström AK, Federley M, Persson P, Stenqvist P. Effects of adjunct galantamine to risperidone, or haloperidol, in animal models of antipsychotic activity and extrapyramidal side-effect liability: involvement of the cholinergic muscarinic receptor. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2011; 14(5):644-654. doi: 10.1017/S1461145710000921.
282. Chandel TI, Zaidi N, Zaman M, Jahan I, Masroor A, Siddique IA, Nayeem SM, Ali M, Uversky VN, Khan RH. A multiparametric analysis of the synergistic impact of anti-Parkinson's drugs on the fibrillation of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2019; 1867(3):275-285. doi: 10.1016/j.bbapap.2018.10.003.
283. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 1991; 12(10):383-388. doi: 10.1016/0165-6147(91)90609-v.

284. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med.* 2016; 8(6):595-608. doi: 10.15252/emmm.201606210.
285. Cho JE, Kim JR. Recent approaches targeting beta-amyloid for therapeutic intervention of Alzheimer's disease. *Recent Pat CNS Drug Discov.* 2011; 6(3):222-233. doi: 10.2174/157488911796958002.
286. Mohamed T, Shakeri A, Rao PP. Amyloid cascade in Alzheimer's disease: Recent advances in medicinal chemistry. *Eur J Med Chem.* 2016; 113:258-272. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.02.049.
287. Chiao P, Bedell BJ, Avants B, Zijdenbos AP, Grand'Maison M, O'Neill P, O'Gorman J, Chen T, Koeppe R. Impact of Reference and Target Region Selection on Amyloid PET SUV Ratios in the Phase 1b PRIME Study of Aducanumab. *J Nucl Med.* 2019; 60(1):100-106. doi: 10.2967/jnumed.118.209130.
288. Nilsson MR. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods.* 2004; 34(1):151-160. doi:10.1016/j.ymeth.2004.03.012.
289. Jameson LP, Smith NW, Dzyuba SV. Dye-binding assays for evaluation of the effects of small molecule inhibitors on amyloid ($\text{A}\beta$) self-assembly. *ACS Chem Neurosci.* 2012; 3(11):807-819. doi: 10.1021/cn300076x.
290. Luo Z, Xu H, Liu L, Ohulchanskyy TY, Qu J. Optical Imaging of Beta-Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *Biosensors (Basel).* 2021; 11(8):255. doi: 10.3390/bios11080255.
291. Zhang X, Fu Z, Meng L, He M, Zhang Z. The Early Events That Initiate β -Amyloid Aggregation in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2018; 10:359. doi: 10.3389/fnagi.2018.00359.
292. Morris AM, Watzky MA, Finke RG. Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1794(3):375-397. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.10.016.
293. Wolff M, Zhang-Haagen B, Decker C, Barz B, Schneider M, Biehl R, Radulescu A, Strodel B, Willbold D, Nagel-Steger L. $\text{A}\beta$ 42 pentamers/hexamers are the smallest detectable oligomers in solution. *Sci Rep.* 2017; 7(1):2493. doi: 10.1038/s41598-017-02370-3.
294. Jiang D, Rauda I, Han S, Chen S, Zhou F. Aggregation pathways of the amyloid β (1-42) peptide depend on its colloidal stability and ordered β -sheet stacking. *Langmuir.* 2012; 28(35):12711-12721. doi: 10.1021/la3021436.
295. Pryor NE, Moss MA, Hestekin CN. Unraveling the early events of amyloid- β protein ($\text{A}\beta$) aggregation: techniques for the determination of $\text{A}\beta$ aggregate size. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(3):3038-3072. doi: 10.3390/ijms13033038.
296. Fändrich M. Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity. *J Mol Biol.* 2012; 421(4-5):427-440. doi: 10.1016/j.jmb.2012.01.006.
297. Rijal Upadhaya A, Capetillo-Zarate E, Kosterin I, Abramowski D, Kumar S, Yamaguchi H, Walter J, Fändrich M, Staufenbiel M, Thal DR. Dispersible amyloid β -protein oligomers, protofibrils, and fibrils represent diffusible but

- not soluble aggregates: their role in neurodegeneration in amyloid precursor protein (APP) transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2012; 33(11):2641-2660. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.12.032.
298. Higaki J, Murphy GM Jr, Cordell B. Inhibition of beta-amyloid formation by haloperidol: a possible mechanism for reduced frequency of Alzheimer's disease pathology in schizophrenia. *J Neurochem*. 1997; 68(1):333-336. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.68010333.x.
299. Palotás A, Penke B, Palotás M, Kenderessy AS, Kemény L, Kis E, Vincze G, Janka Z, Kálmán J. Haloperidol attenuates beta-amyloid-induced calcium imbalance in human fibroblasts. *Skin Pharmacol Physiol*. 2004; 17(4):195-199. doi: 10.1159/000078823.
300. Palotás A, Pákási M, Palotás M, Hügyecz M, Molnár J, Penke B, Janka Z, Kálmán J. Effect of haloperidol and risperidone on amyloid precursor protein levels in vivo. *Brain Res Bull*. 2003; 62(2):93-99. doi: 10.1016/j.brainresbull.2003.07.002.
301. Casanova MF, Carosella NW, Gold JM, Kleinman JE, Weinberger DR, Powers RE. A topographical study of senile plaques and neurofibrillary tangles in the hippocampi of patients with Alzheimer's disease and cognitively impaired patients with schizophrenia. *Psychiatry Res*. 1993; 49(1):41-62. doi: 10.1016/0165-1781(93)90029-g.
302. Arnold SE, Franz BR, Trojanowski JQ. Elderly patients with schizophrenia exhibit infrequent neurodegenerative lesions. *Neurobiol Aging*. 1994; 15(3):299-303. doi: 10.1016/0197-4580(94)90024-8.
303. Lukiw WJ. Amyloid beta (A β) peptide modulators and other current treatment strategies for Alzheimer's disease (AD). *Expert Opin Emerg Drugs*. 2012; 10.1517/14728214.2012.672559. doi: 10.1517/14728214.2012.672559.
304. Cordy JM, Hooper NM, Turner AJ. The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. *Mol Membr Biol*. 2006; 23(1):111-122. doi: 10.1080/09687860500496417.
305. Wolozin B, Manger J, Bryant R, Cordy J, Green RC, McKee A. Re-assessing the relationship between cholesterol, statins and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2006; 185:63-70. doi: 10.1111/j.1600-0404.2006.00687.x.
306. Pac-Soo C, Lloyd DG, Vizcaychipi MP, Ma D. Statins: the role in the treatment and prevention of Alzheimer's neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*. 2011; 27(1):1-10. doi: 10.3233/JAD-2011-110524.
307. Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ. Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: I. Review of epidemiological and preclinical studies. *Arch Neurol*. 2011; 68(10):1239-1244. doi: 10.1001/archneurol.2011.203.
308. Kumar N, Gahlawat A, Kumar RN, Singh YP, Modi G, Garg P. Drug repurposing for Alzheimer's disease: in silico and in vitro investigation of FDA-approved drugs as acetylcholinesterase inhibitors. *J Biomol Struct Dyn*. 2022; 40(7):2878-2892. doi: 10.1080/07391102.2020.1844054.

309. Persson T, Popescu BO, Cedazo-Minguez A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014:427318. doi: 10.1155/2014/427318.
310. Bradley MA, Xiong-Fister S, Markesbery WR, Lovell MA. Elevated 4-hydroxyhexenal in Alzheimer's disease (AD) progression. *Neurobiol Aging.* 2012; 33(6):1034-1044. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.08.016.
311. Butterfield DA, Reed T, Perluigi M, De Marco C, Coccia R, Cini C, Sultana R. Elevated protein-bound levels of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, in brain from persons with mild cognitive impairment. *Neurosci Lett.* 2006; 397(3):170-173. doi: 10.1016/j.neulet.2005.12.017.
312. Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbita SP, Wu JF, Carney JM, et al. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem.* 1995; 65(5):2146-2156. doi: 10.1046/j.1471-4159.1995.65052146.x.
313. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA. Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001; 60(8):759-767. doi: 10.1093/jnen/60.8.759.
314. Takuma K, Yao J, Huang J, Xu H, Chen X, Luddy J, Trillat AC, Stern DM, Arancio O, Yan SS. ABAD enhances A β -induced cell stress via mitochondrial dysfunction. *FASEB J.* 2005; 19(6):597-598. doi: 10.1096/fj.04-2582fje.
315. Feng Y, Wang X. Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012:472932. doi: 10.1155/2012/472932.
316. Santiago JA, Potashkin JA. The Impact of Disease Comorbidities in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2021; 13:631770. doi: 10.3389/fnagi.2021.631770.
317. Cadet JL, Lohr JB. Possible involvement of free radicals in neuroleptic-induced movement disorders. Evidence from treatment of tardive dyskinesia with vitamin E. *Ann N Y Acad Sci.* 1989; 570:176-185. doi: 10.1111/j.1749-6632.1989.tb14918.x.
318. Peet M, Laugharne J, Rangarajan N, Reynolds GP. Tardive dyskinesia, lipid peroxidation, and sustained amelioration with vitamin E treatment. *Int Clin Psychopharmacol.* 1993; 8(3):151-153. doi: 10.1097/00004850-199300830-00003.
319. Martins MR, Petronilho FC, Gomes KM, Dal-Pizzol F, Streck EL, Quevedo J. Antipsychotic-induced oxidative stress in rat brain. *Neurotox Res.* 2008; 13(1):63-69. doi: 10.1007/BF03033368.
320. Xu H, Wang H, Zhuang L, Yan B, Yu Y, Wei Z, Zhang Y, Dyck LE, Richardson SJ, He J, Li X, Kong J, Li XM. Demonstration of an anti-oxidative stress mechanism of quetiapine: implications for the treatment of Alzheimer's disease. *FEBS J.* 2008; 275(14):3718-3728. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06519.x.

321. Podsiedlik M, Markowicz-Piasecka M, Sikora J. Erythrocytes as model cells for biocompatibility assessment, cytotoxicity screening of xenobiotics and drug delivery. *Chem Biol Interact.* 2020; 332:109305. doi: 10.1016/j.cbi.2020.109305. Erratum in: *Chem Biol Interact.* 2020;109322.
322. Han JH, Tian HZ, Lian YY, Yu Y, Lu CB, Li XM, Zhang RL, Xu H. Quetiapine mitigates the ethanol-induced oxidative stress in brain tissue, but not in the liver, of the rat. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015; 11:1473-1482. doi: 10.2147/NDT.S80505.
323. Cobley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol.* 2018; 15:490-503. doi: 10.1016/j.redox.2018.01.008.
324. Wiklund ED, Catts VS, Catts SV, Ng TF, Whitaker NJ, Brown AJ, Lutze-Mann LH. Cytotoxic effects of antipsychotic drugs implicate cholesterol homeostasis as a novel chemotherapeutic target. *Int J Cancer.* 2010; 126(1):28-40. doi: 10.1002/ijc.24813.
325. Milkovic L, Cipak Gasparovic A, Cindric M, Mouthuy PA, Zarkovic N. Short Overview of ROS as Cell Function Regulators and Their Implications in Therapy Concepts. *Cells.* 2019; 8(8):793. doi: 10.3390/cells8080793.

Spis rysunków, tabel i wykresów

Rysunek 1. Czynniki biorące udział w patogenezie AD. Opracowanie własne na podstawie [36], z wykorzystaniem programu BioRender (<https://www.biorender.com>).

Rysunek 2. Rola APP oraz białka tau w patogenezie AD. Opracowanie własne na podstawie [55].

Rysunek 3. Aktualna farmakoterapia i nowe strategie w rozwoju leków przeciwko AD.

Rysunek 4. Wzory strukturalne leków należących do AChEIs – rywastygminy, donepezylu, galantaminy oraz antagonisty receptora NMDA - memantyny. Opracowanie własne z wykorzystaniem programu ChemSketch.

Rysunek 5. Algorytm postępowania w przypadku rozpoznania AD wg [22,78].

Rysunek 6. Porównanie procesu odkrywania leków *de novo* z koncepcją repozycjonowania leków wg [180-180].

Rysunek 7. Budowa chemiczna badanych leków przeciwpsychotycznych oraz zatwierdzonych do stosowania klinicznego inhibitorów AChE: donepezylu i rywastygminy. Dla każdego związku podano zakres stężeń terapeutycznych w osoczu [203-214]. Wzory strukturalne opracowane zostały z wykorzystaniem programu ChemSketch.

Rysunek 8. Szlak zachodzących reakcji w metodzie Ellmana. Opracowanie własne na podstawie [215,216], z wykorzystaniem programu ChemSketch.

Rysunek 9. Redukcja soli tetrazoliowej WST-1 do formazanu przez dehydrogenazy komórkowe. Opracowanie własne na podstawie [227].

Rysunek 10. Zmiany morfologii komórek HUVEC pod wpływem leków przeciwpsychotycznych w stężeniach odpowiadających $\frac{1}{2} TPC_{max}$ oraz TPC_{max} po 24-godzinnej inkubacji. Kontrolę stanowią komórki niestymulowane lekami przeciwpsychotycznymi. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu z kontrastem fazowym (powiększenie 100-krotne) zsynchronizowanym z komputerem, wyposażonym w program do analizy obrazu (Opta-Tech, oprogramowanie OptaView 7).

Rysunek 11. Zmiany morfologii astrocytów pod wpływem leków przeciwpsychotycznych w stężeniach odpowiadającym $\frac{1}{2} TPC_{max}$ oraz TPC_{max} po 24-godzinnej inkubacji. Kontrolę stanowią komórki niestymulowane lekami przeciwpsychotycznymi. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu z kontrastem

fazowym (powiększenie 100-krotne) zsynchronizowanym z komputerem, wyposażonym w program do analizy obrazu (Opta-Tech, oprogramowanie OptaView 7).

Rysunek 12. Zmiany morfologii komórek HUVEC pod wpływem AAPH (17,5 mmol/L) i AA (10 µg/mL) oraz AAPH (17,5 mmol/L) i leków przeciwpsychotycznych w stężeniach odpowiadających ich $\frac{1}{2}$ TPC_{max} oraz TPC_{max} . Kontrolę stanowią komórki stymulowane AAPH (17,5 mmol/L). Strzałkami oznaczono przykłady morfologicznie zmienionych komórek. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu z kontrastem fazowym (powiększenie 100-krotne) zsynchronizowanym z komputerem, wyposażonym w program do analizy obrazu (Opta-Tech, oprogramowanie OptaView 7).

Rysunek 13. Zmiany morfologii astrocytów pod wpływem AAPH (15 mmol/L) i AA (10 µg/mL) oraz AAPH (15 mmol/L) i leków przeciwpsychotycznych w stężeniach odpowiadających ich $\frac{1}{2}$ TPC_{max} oraz TPC_{max} . Kontrolę stanowią komórki stymulowane AAPH (15 mmol/L). Strzałkami oznaczono przykłady morfologicznie zmienionych komórek. Zdjęcia wykonano przy użyciu mikroskopu z kontrastem fazowym (powiększenie 100-krotne) zsynchronizowanym z komputerem, wyposażonym w program do analizy obrazu (Opta-Tech, oprogramowanie OptaView 7).

Tabela 1. Przebieg demencji i wpływ na zachowanie chorego [22,23].

Tabela 2. Porównanie podstawowych parametrów farmakodynamicznych i farmakokinetycznych zarejestrowanych produktów leczniczych będących AChEIs w leczeniu AD [74].

Tabela 3. Przykłady preparatów, które zostały wykluczone z badań klinicznych w terapii anty-amyloidowej AD [89-93].

Tabela 4. Przykłady przeciwciał monoklonalnych badanych pod kątem terapii anty-amyloidowej w AD [100,113-117].

Tabela 5. Przeciwciała ukierunkowane na białko tau w badaniach klinicznych [120,126].

Tabela 6. Aktualnie badania kliniczne prowadzone dla insulin w leczeniu AD [145].

Tabela 7. Badania kliniczne prowadzone dla leków o działaniu metabolicznym w AD [145].

Tabela 8. Ogólna klasyfikacja leków przeciwpsychotycznych. Opracowanie własne na podstawie [165].

Tabela 9. Przykłady leków repozycjonowanych [15,192-196].

Tabela 10. Przykłady leków, nad którymi były badania zmiany zastosowania ukierunkowane na terapię AD [199,200].

Tabela 11. *Badane związki z podziałem na generację i przynależność do grupy ATC.*

Tabela 12. *Skład próby kontrolnej w ocenie hamowania aktywności AChE lub BuChE.*

Tabela 13. *Skład próby badanej w ocenie hamowania aktywności AChE i BuChE.*

Tabela 14. *Wartości pomiarów hamowania AChE i BuChE wykonanych dla kontroli w celu walidacji metody. Wyniki przedstawiono dla czterech prób AChE oraz BuChE, przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach; odchylenie standardowe (SD), współczynniki zmienności (W) [%].*

Tabela 15. *Stężenia badanych związków w ocenie synergistycznego działania leków.*

Tabela 16. *Skład próby kontrolnej w ocenie synergistycznego działania leków.*

Tabela 17. *Skład próby badanej w ocenie synergistycznego działania leków.*

Tabela 18. *Stężenia leków przeciwpsychotycznych badanych w ocenie wpływu na agregację A β .*

Tabela 19. *Skład próby kontrolnej w ocenie wpływu leków przeciwpsychotycznych na agregację A β .*

Tabela 20. *Skład próby badanej w ocenie wpływu leków przeciwpsychotycznych na agregację A β .*

Tabela 21. *Przegląd literatury dotyczący warunków, w których przeprowadzane były badania agregacji A β [218-225].*

Tabela 22. *Wyniki pomiarów intensywności fluorescencji wykonane dla czterech kontroli, w trzech powtórzeniach, wyrażone jako względne jednostki fluorescencji (RFU) wraz ze średnią, odchyleniem standardowym (SD) oraz współczynnikiem zmienności (W); Ex/Em = 440/484 nm.*

Tabela 23. *Stężenia leków przeciwpsychotycznych badanych w ocenie aktywności hemolitycznej podstawowej oraz indukowanej stresem oksydacyjnym.*

Tabela 24. *Skład próby kontrolnej w pomiarze erytrotoksyczności.*

Tabela 25. *Skład próby odniesienia w pomiarze erytrotoksyczności - hemoliza.*

Tabela 26. *Skład próby odniesienia w pomiarze methemoglobinotwórczości.*

Tabela 27. *Skład próby badanej w pomiarze erytrotoksyczności oraz methemoglobinotwórczości.*

Tabela 28. *Wartości absorbancji pomiarów erytrotoksyczności oraz methemoglobinotwórczości wykonanych dla kontroli w celu walidacji metody.*

Wyniki przedstawiono dla czterech prób erytrotoksyczności oraz methemoglobinotwórczości, przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach; odchylenie standardowe (SD), współczynniki zmienności (W) [%].

Tabela 29. Skład próby odniesienia z czynnikiem indukującym stres oksydacyjny dla spontanicznej hemolizy w ocenie działania ochronnego badanych związków na erytrocyty w warunkach stresu oksydacyjnego.

Tabela 30. Skład próby kontrolnej z antyoksydantem (AA) w ocenie działania ochronnego badanych związków na erytrocyty w warunkach stresu oksydacyjnego.

Tabela 31. Skład próby odniesienia dla pomiaru methemoglobinotwórczości w ocenie działania ochronnego badanych związków na erytrocyty w warunkach stresu oksydacyjnego.

Tabela 32. Skład próby badanej w ocenie działania ochronnego badanych związków na erytrocyty oraz na methemoglobinotwórczość w warunkach stresu oksydacyjnego.

Tabela 33. Wartości absorbancji pomiarów erytrotoksyczności oraz methemoglobinotwórczości wykonanych dla kontroli w celu walidacji metody. Wyniki przedstawiono dla czterech prób erytrotoksyczności oraz methemoglobinotwórczości w warunkach stresu oksydacyjnego, przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach; odchylenie standardowe (SD), współczynniki zmienności (W) [%].

Tabela 34. Wartości absorbancji pomiarów dla żywotności komórek HUVEC oraz astrocytów wykonanych dla kontroli w celu walidacji metody. Wyniki przedstawiono dla sześciu prób dla HUVEC oraz astrocytów, przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach; odchylenie standardowe (SD), współczynniki zmienności (W) [%].

Tabela 35. Wartości absorbancji pomiarów dla żywotności komórek HUVEC oraz astrocytów w warunkach stresu oksydacyjnego wykonanych dla kontroli w celu walidacji metody. Wyniki przedstawiono dla pięciu prób dla HUVEC oraz astrocytów, przeprowadzonych w dwóch powtórzeniach; odchylenie standardowe (SD), współczynniki zmienności (W) [%].

Tabela 36. Maksymalne wartości inhibicji [%] AChE oraz BuChE dla leków przeciwpsychotycznych w badanych zakresach stężeń. Wartości statystycznie istotne na poziomie * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K), którą stanowiły próby nie traktowane lekami przeciwpsychotycznymi.

Tabela 37. Zestawienie wartości IC_{50} dla donepezylu, rywastygminy, promazyny i kwetiapiny uzyskanych w badaniach własnych i danych literaturowych [230-235].

Tabela 38. Wyznaczone parametry kinetyczne reakcji enzymatycznych dla AChE i BuChE: stała Michaelisa (K_m), pozorna stała Michaelisa ($K_{m(i)}$) oraz szybkość maksymalna reakcji (V_{max}) i szybkość maksymalna po inhibicji donepezilem, rywastygminą w stężeniach równych IC_{50} ($V_{max(i)}$) oraz kwetiapiną, promazyngą w stężeniach równych $\frac{1}{2} IC_{50}$ oraz IC_{50} ($V_{max(i)}$). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm SD$, $n = 3$.

Tabela 39. Wpływ leków przeciwpsychotycznych na siłę hamowania aktywności AChE i BuChE przez donepezil.

Tabela 40. Wpływ leków przeciwpsychotycznych na siłę hamowania aktywności AChE i BuChE przez rywastygminę.

Tabela 41. Analiza potencjalnych interakcji między donepezilem i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi względem AChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm.

Tabela 42. Analiza potencjalnych interakcji między rywastygminą i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi względem AChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm.

Tabela 43. Analiza potencjalnych interakcji między donepezilem i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi względem BuChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm.

Tabela 44. Analiza potencjalnych interakcji między rywastygminą i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi względem BuChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm.

Tabela 45. Wyznaczony procent inhibicji tworzenia agregatów $A\beta$ przez badane leki przeciwpsychotyczne w stężeniach $\frac{1}{2} TPC_{max}$ i TPC_{max} . Jako wzorcowy inhibitor agregacji $A\beta$ zastosowano TA w stężeniu $0,1 \mu\text{mol/L}$ i $10 \mu\text{mol/L}$ (odpowiednio $170,12 \mu\text{g/L}$ i $17012 \mu\text{g/L}$). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia $\pm SD$, $n = 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K), którą stanowił roztwór $A\beta_{42}$.

Tabela 46. Ocena siły działania badanych leków przeciwpsychotycznych w przeprowadzonych badaniach eksperymentalnych. Wartości statystycznie istotne na poziomie $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Tabela 47. Ocena potencjału antyoksydacyjnego badanych leków przeciwpsychotycznych w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego. Wartości

statystycznie istotne na poziomie $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wykres 1. Wpływ haloperidolu na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $*p < 0,05$, $***p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wykres 2. Wpływ bromperidolu na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wykres 3. Wpływ benperidolu na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wykres 4. Wpływ penfluridolu na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wykres 5. Wpływ pimozydu na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wykres 6. Wpływ kwetiapiny na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wykres 7. Wpływ promazyny na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wykres 8. Wpływ donepezylu na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K). Zakres stężeń terapeutycznych 30-75 $\mu\text{g/L}$ (0,072-0,180 $\mu\text{mol/L}$).

Wykres 9. Wpływ rywastygminy na aktywność AChE (A) i BuChE (B). Punkty pomiarowe przedstawione jako średnia \pm SD, $n = 6 - 9$. Wartości statystycznie istotne na poziomie $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ w odniesieniu do kontroli (K). Zakres stężeń terapeutycznych 5-22 $\mu\text{g/L}$ (0,012-0,055 $\mu\text{mol/L}$).

Wykres 10. Wykres Hanesa-Wolfa, przedstawiający stosunek początkowego stężenia substratu [S] do prędkości reakcji v wykreślonej względem [S]. Donepezyl w stężeniu równym wartości IC_{50} (0,025 $\mu\text{mol/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD, $n = 3$.

Wykres 11. Wykres Hanesa-Wolfa, przedstawiający stosunek początkowego stężenia substratu $[S]$ do prędkości reakcji v wykreślonej względem $[S]$. Donepezil w stężeniu równym wartości IC_{50} ($12,81 \mu\text{mol/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm SD$, $n = 3$.

Wykres 12. Wykres Hanesa-Wolfa, przedstawiający stosunek początkowego stężenia substratu $[S]$ do prędkości reakcji v wykreślonej względem $[S]$. Rywastygmina w stężeniu równym wartości IC_{50} ($64,29 \mu\text{mol/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm SD$, $n = 3$.

Wykres 13. Wykres Hanesa-Wolfa, przedstawiający stosunek początkowego stężenia substratu $[S]$ do prędkości reakcji v wykreślonej względem $[S]$. Rywastygmina w stężeniu równym wartości IC_{50} ($0,95 \mu\text{mol/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm SD$, $n = 3$.

Wykres 14. Wykres Hanesa-Wolfa, przedstawiający stosunek początkowego stężenia substratu $[S]$ do prędkości reakcji v wykreślonej względem $[S]$. Kwetiapina w stężeniu równym wartości IC_{50} ($6,08 \mu\text{mol/L}$) oraz $\frac{1}{2} IC_{50}$ ($3,04 \mu\text{mol/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm SD$, $n = 3$.

Wykres 15. Wykres Hanesa-Wolfa, przedstawiający stosunek początkowego stężenia substratu $[S]$ do prędkości reakcji v wykreślonej względem $[S]$. Promazyna w stężeniu równym wartości IC_{50} ($0,186 \mu\text{mol/L}$) oraz $\frac{1}{2} IC_{50}$ ($0,093 \mu\text{mol/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm SD$, $n = 3$.

Wykres 16. Wpływ promazyny w stężeniu TPC_{max} ($0,15 \mu\text{mol/L}$; $450 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności BuChE przez donepezil w zakresie stężeń $1,96 - 98 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm SD$, $n = 6 - 9$. Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samego donepezilu.

Wykres 17. Wpływ bromperidolu w stężeniu TPC_{max} ($0,06 \mu\text{mol/L}$; $25 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności BuChE przez donepezil w zakresie stężeń $1,96 - 98 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm SD$, $n = 6 - 9$. Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samego donepezilu.

Wykres 18. Wpływ benperidolu w stężeniu TPC_{max} ($0,03 \mu\text{mol/L}$; $10 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności BuChE przez donepezil w zakresie stężeń $1,96 - 98 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm SD$, $n = 6 - 9$. Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samego donepezilu.

Wykres 19. Wpływ pimozydu w stężeniu TPC_{max} ($0,03 \mu\text{mol/L}$; $25 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności BuChE przez donepezil w zakresie stężeń $1,96 - 98 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm SD$, $n = 6 - 9$. Istnieje różnica

statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samego donepezilu.

Wykres 20. Wpływ kwetiapiny w stężeniu TPC_{max} ($0,91 \mu\text{mol/L}$; $400 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności BuChE przez donepezil w zakresie stężeń $1,96 - 98 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm SD$, $n = 6 - 9$. Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samego donepezilu.

Wykres 21. Wpływ pimozydu w stężeniu TPC_{max} ($0,03 \mu\text{mol/L}$; $25 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności AChE przez rywastygminę w zakresie stężeń $5 - 100 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm SD$, $n = 6 - 9$; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samej rywastygminy.

Wykres 22. Wpływ bromperidolu w stężeniu TPC_{max} ($0,06 \mu\text{mol/L}$; $25 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności AChE przez rywastygminę w zakresie stężeń $5 - 100 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm SD$, $n = 6 - 9$; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samej rywastygminy.

Wykres 23. Wpływ kwetiapiny w stężeniu TPC_{max} ($0,91 \mu\text{mol/L}$; $400 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności AChE przez rywastygminę w zakresie stężeń $5 - 100 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm SD$, $n = 6 - 9$; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samej rywastygminy.

Wykres 24. Wpływ benperidolu w stężeniu TPC_{max} ($0,03 \mu\text{mol/L}$; $10 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności AChE przez rywastygminę w zakresie stężeń $5 - 100 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm SD$, $n = 6 - 9$; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samej rywastygminy.

Wykres 25. Wpływ promazyny w stężeniu TPC_{max} ($0,15 \mu\text{mol/L}$; $450 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności AChE przez rywastygminę w zakresie stężeń $5 - 100 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm SD$, $n = 6 - 9$; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samej rywastygminy.

Wykres 26. Wpływ haloperidolu w stężeniu TPC_{max} ($0,07 \mu\text{mol/L}$; $50 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności AChE przez rywastygminę w zakresie stężeń $5 - 100 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie $\pm SD$, $n = 6 - 9$; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samej rywastygminy.

Wykres 27. Wpływ penfluridolu w stężeniu TPC_{max} ($0,05 \mu\text{mol/L}$; $25 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności BuChE przez rywastygminę w zakresie stężeń $0,05 - 5 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $n = 6 - 9$; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samej rywastygminy.

Wykres 28. Wpływ promazyny w stężeniu TPC_{max} ($0,15 \mu\text{mol/L}$; $450 \mu\text{g/L}$) na siłę hamowania aktywności BuChE przez rywastygminę w zakresie stężeń $0,05 - 5 \mu\text{mol/L}$. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie \pm SD, $n = 6 - 9$; Istnieje różnica statystycznie istotna na poziomie $p < 0,05$ wobec wartości IC_{50} wyznaczonej dla samej rywastygminy.

Wykres 29. Analiza graficzna potencjalnych interakcji między donepezilem i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi, względem AChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm. Wyniki przedstawiono jako wartości CI wyznaczone za pomocą oprogramowania ComboSyn dla mieszanin binarnych o zmiennym stężeniu donepezilu ($5 - 100 \mu\text{mol/L}$) oraz stałym TPC_{max} .

Wykres 30. Analiza graficzna potencjalnych interakcji między rywastygminą i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi, względem AChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm. Wyniki przedstawiono jako wartości CI wyznaczone za pomocą oprogramowania ComboSyn dla mieszanin binarnych o zmiennym stężeniu rywastygminy ($5 - 100 \mu\text{mol/L}$) oraz stałym TPC_{max} .

Wykres 31. Analiza graficzna potencjalnych interakcji między donepezilem i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi, względem BuChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm. Wyniki przedstawiono jako wartości CI wyznaczone za pomocą oprogramowania ComboSyn dla mieszanin binarnych o zmiennym stężeniu donepezilu ($2 - 100 \mu\text{mol/L}$) oraz stałym TPC_{max} .

Wykres 32. Analiza graficzna potencjalnych interakcji między rywastygminą i badanymi lekami przeciwpsychotycznymi, względem BuChE wykonana przy użyciu metody Chou-Talalay. Interakcja leków obliczona na podstawie wskaźnika kombinacji (CI), gdzie $CI < 1$, $= 1$ i > 1 wskazują odpowiednio na synergizm, efekt addytywny i antagonizm. Wyniki przedstawiono jako wartości CI wyznaczone za pomocą oprogramowania ComboSyn dla mieszanin binarnych o zmiennym stężeniu rywastygminy ($0,05 - 5 \mu\text{mol/L}$) oraz stałym TPC_{max} .

Wykres 33. Wpływ badanych leków przeciwpsychotycznych w stężeniach $\frac{1}{2} TPC_{max}$ i TPC_{max} na agregację $A\beta$. Pomiar wykonano po 10 i 30 min inkubacji odpowiednio z HAL-haloperidol; BRMP-bromperidol; BNP-benperidol; PNF-penfluridol; PIM-pimozyd; KWET-kwetiapina; PROM-promazyna. Jako wzorcowy inhibitor agregacji $A\beta$ zastosowano TA w stężeniu 0,1 $\mu\text{mol/L}$ i 10 $\mu\text{mol/L}$ (odpowiednio 170,12 $\mu\text{g/L}$ i 17012 $\mu\text{g/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm SD$, $n = 9$. Istnieje różnica statystycznie znamiennej na poziomie $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wykres 34. Wpływ badanych leków przeciwpsychotycznych w stężeniach $\frac{1}{2} TPC_{max}$ i TPC_{max} na agregację $A\beta$. Pomiar wykonano po 60 i 90 min inkubacji odpowiednio z HAL-haloperidol; BRMP-bromperidol; BNP-benperidol; PNF-penfluridol; PIM-pimozyd; KWET-kwetiapina; PROM-promazyna. Jako wzorcowy inhibitor agregacji $A\beta$ zastosowano TA w stężeniu 0,1 $\mu\text{mol/L}$ i 10 $\mu\text{mol/L}$ (odpowiednio 170,12 $\mu\text{g/L}$ i 17012 $\mu\text{g/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm SD$, $n = 9$. Istnieje różnica statystycznie znamiennej na poziomie $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wykres 35. Wpływ badanych leków przeciwpsychotycznych w stężeniach $\frac{1}{2} TPC_{max}$ i TPC_{max} na agregację $A\beta$. Pomiar wykonano po 24 i 48 h inkubacji odpowiednio z HAL-haloperidol; BRMP-bromperidol; BNP-benperidol; PNF-penfluridol; PIM-pimozyd; KWET-kwetiapina; PROM-promazyna. Jako wzorcowy inhibitor agregacji $A\beta$ zastosowano TA w stężeniu 0,1 $\mu\text{mol/L}$ i 10 $\mu\text{mol/L}$ (odpowiednio 170,12 $\mu\text{g/L}$ i 17012 $\mu\text{g/L}$). Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm SD$, $n = 9$. Istnieje różnica statystycznie znamiennej na poziomie $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wykres 36. Wpływ badanych leków przeciwpsychotycznych w stężeniach $\frac{1}{5} TPC_{max}$, TPC_{max} i $5 \times TPC_{max}$ na hemolizę erytrocytów mierzoną po 5 i 24 h inkubacji. AAPH zastosowano w stężeniu 50 mmol/L, a AA w stężeniu 10 $\mu\text{g/mL}$. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm SD$, $n = 6 - 12$, $***p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wykres 37. Wpływ badanych leków przeciwpsychotycznych w stężeniach $\frac{1}{5} TPC_{max}$, TPC_{max} i $5 \times TPC_{max}$ na tworzenie methemoglobiny mierzony po 5 i 24 h inkubacji. AAPH zastosowano w stężeniu 50 mmol/L, a AA w stężeniu 10 $\mu\text{g/mL}$. Wyniki przedstawiono jako średnie $\pm SD$, $n = 6 - 12$, $p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wykres 38. Wpływ badanych leków przeciwpsychotycznych w stężeniach $\frac{1}{5} TPC_{max}$, TPC_{max} i $5 \times TPC_{max}$ na hemolizę erytrocytów mierzony po 5 i 24 godzinach inkubacji. Wyniki przedstawiono jako średnią $\pm SD$, $n = 4 - 12$. $*p < 0,05$, $***p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K), którą stanowiły próby z AAPH.

Wykres 39. Wpływ kwetiapiny i promazyny w stężeniach $\frac{1}{5} \times TPC_{max}$, TPC_{max} i $5 \times TPC_{max}$ z AAPH na tworzenie methemoglobiny mierzony po 5 i 24 godzinach inkubacji. AAPH zastosowano w stężeniu 50 mmol/L, a AA w stężeniu 10 $\mu\text{g/mL}$. Wyniki

przedstawiono jako średnie \pm SD, $n = 6 - 12$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ w odniesieniu do kontroli (K).

Wykres 40. Wpływ badanych leków przeciwpsychotycznych na żywotność komórek HUVEC i astrocytów. Związki testowano w dwóch stężeniach odpowiadających $\frac{1}{2} TPC_{max}$ oraz TPC_{max} . Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD, $n = 8 - 9$. Żaden z badanych związków nie przyczynił się do istotnego spadku żywotności komórek ($p > 0,05$).

Wykres 41. Potencjalne działanie antyoksydacyjne wybranych leków przeciwpsychotycznych na komórki HUVEC. Komórki inkubowane były przez 1 godzinę z badanymi związkami, a następnie dodano AAPH, który był induktorem stresu oksydacyjnego. Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli traktowanej samym medium (100% żywotności). Obliczenia statystyczne wykonano w odniesieniu do kontroli (K), którą stanowią komórki traktowane AAPH w stężeniu 17,5 mmol/L; $p < 0,001$.

Wykres 42. Potencjalne działanie antyoksydacyjne wybranych leków przeciwpsychotycznych na astrocyty. Komórki inkubowane były przez 1 godzinę z badanymi związkami, a następnie dodano AAPH, który był induktorem stresu oksydacyjnego. Wyniki przedstawiono w odniesieniu do kontroli traktowanej samym medium (100% żywotności). Obliczenia statystyczne wykonano w odniesieniu do kontroli (K), którą stanowią komórki traktowane AAPH w stężeniu 15 mmol/L; $*p < 0,5$, $**p < 0,01$

Dorobek naukowy

Dorobek całkowity

Suma IF: 28,668 Suma MNiSW: 778

Część danych i wyników zawartych w tej rozprawie doktorskiej zostało

opublikowanych w pracy:

Podsiedlik M, Markowicz-Piasecka M, Sikora J. The Influence of Selected Antipsychotic Drugs on Biochemical Aspects of Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* **2022**; 23(9):4621. doi: 10.3390/ijms23094621

IF: 5,6 MNiSW: 140

Pozostały dorobek naukowy

1. **Podsiedlik M**, Markowicz-Piasecka M, Sikora J. Erythrocytes as model cells for biocompatibility assessment, cytotoxicity screening of xenobiotics and drug delivery. *Chem Biol Interact.* **2020**; 332:109305. doi:10.1016/j.cbi.2020.109305. Erratum in: *Chem Biol Interact.* 2020; 109322.

IF: 5,194 MNiSW: 100

2. **Podsiedlik M**, Markowicz-Piasecka M, Mikiciuk-Olasik E, Sikora J. The Associations between Central Nervous System Diseases and Haemostatic Disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* **2019**; 18(4):307-316. doi: 10.2174/1871527318666190314101946.

MNiSW: 70

3. Markowicz-Piasecka M, Sadkowska A, Huttunen KM, **Podsiedlik M**, Mikiciuk-Olasik E, Sikora J. An investigation into the pleiotropic activity of metformin. A glimpse of haemostasis. *Eur J Pharmacol.* **2020**; 872:172984. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.172984.

IF: 4,432 MNiSW: 100

4. Sikora J, **Podsiedlik M**, Pietras T, Kosmalski M, Matłoka M, Moszczyński-Petkowski R, Wiczorek M, Markowicz-Piasecka M. Quetiapine and novel PDE10A inhibitors potentiate the anti-BuChE activity of donepezil. *J Enzyme Inhib Med Chem.* **2020**; 35(1):1743-1750. doi: 10.1080/14756366.2020.1818739.

IF: 5,051 MNiSW: 140

5. Zajda A, Huttunen KM, Sikora J, **Podsiedlik M**, Markowicz-Piasecka M. Is metformin a geroprotector? A peek into the current clinical and experimental data. *Mech Ageing Dev.* **2020**; 191:111350. doi: 10.1016/j.mad.2020.111350.

IF: 5,432 MNiSW: 100

6. Markowicz-Piasecka M, Sadkowska A, **Podsiedlik M**, Mikiciuk-Olasik E, Sikora J. Generation 2 (G2) - Generation 4 (G4) PAMAM dendrimers disrupt key plasma coagulation parameters. *Toxicol In Vitro*. **2019**; 59:87-99. doi: 10.1016/j.tiv.2019.04.010.
IF: 2,959 MNiSW: 100
7. **Podsiedlik M**. Leczenie farmakologiczne w nowotworze jelita grubego. *Farmakoekonomika Szpitalna*, **2020**, vol. 2, nr 50, s.27-30.
MNiSW: 5
8. **Podsiedlik M**. Terapeutyczne kwasy nukleinowe. *Farmakoekonomika Szpitalna*, **2020**, vol. 1, nr 49, s.24-28.
MNiSW: 5
9. **Podsiedlik M**. Bezpieczeństwo stosowania leków miejscowo znieczulających. *Farmakoekonomika Szpitalna*, **2019**, nr 47, s.13-15.
MNiSW: 5
10. **Podsiedlik M**. Farmakoterapia w chorobie Parkinsona. *Farmakoekonomika Szpitalna*, **2019**, nr 45, s.21-24.
MNiSW: 5
11. **Podsiedlik M**. Zastosowanie leków o działaniu analeptycznym. *Farmakoekonomika Szpitalna*, **2019**, nr 46, s.20-21.
MNiSW: 5
12. **Podsiedlik M**. Leki stosowane w chorobach alergicznych. *Farmakoekonomika Szpitalna*, **2018**, nr 43, s.14-18.
MNiSW: 1
13. **Podsiedlik M**. Patofizjologia i farmakologia choroby Alzheimerera. *Farmakoekonomika Szpitalna*, **2018**, nr 44, s.18-22.
MNiSW: 1
14. Sikora J, **Podsiedlik M**. Przeciwwakrzepowe leki nowej generacji. *Farmakoekonomika Szpitalna*, **2017**, nr 41, s.9-12.
MNiSW: 1

Doniesienia zjazdowe

1. **Podsiedlik M**, Markowicz-Piasecka M, Sikora J. Wpływ wybranych leków przeciwpsychotycznych na biochemiczne aspekty choroby Alzheimerera. XXIV Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego „Salus aegroti

suprema lex” - Streszczenia wykładów i prezentacji posterowych, **2021**, Lublin, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, s.152-152, ISBN 978-83-64968-24-2.

2. Markowicz-Piasecka M, **Podsiedlik M**, Sikora J, i in. Synteza i ocena aktywności biologicznej sulfonamidowych pochodnych metforminą. IV Sympozjum "Szkoła Chemii Medycznej": 25-27 września 2019 Wrocław, **2019**, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, s.1-1.
3. **Podsiedlik M**. Czy choroby ośrodkowego układu nerwowego indukują zaburzenia hemostaticzne? III Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Studentów Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, 12-13.04.**2019**: książka kongresowa, 2019, Łódź, s.35-35.

Projekty

1. W poszukiwaniu nowych proleków metforminy. Badania in vitro - biogodność farmakokinetyka. Kierownik projektu w UM: Magdalena Markowicz-Piasecka, data rozpoczęcia 18-01-2017, data zakończenia 17-01-2020, zakończony ostatecznie rozliczony.

Aktywności

1. 2021 - Uczestniczenie w szkoleniach służących podnoszeniu umiejętności dydaktycznych i naukowych: Kreatywne Metody Przekazywania Wiedzy
2. 2020-2022 - prowadzenie zajęć dydaktycznych z zakresu studiów podyplomowych „Qualified Person”
3. 2019-2020 - prowadzenie zajęć dydaktycznych z zakresu kształcenia podyplomowego w ramach specjalizacji „Farmacja Apteczna”
4. 2017-2018 - ukończenie szkolenia w zakresie obsługi systemu do analizy formowania się czopu płytkowego i skrzepu białego, bazującego na platformie T- TAS[®]
5. 2014-2015 - studia podyplomowe "Farmacja Medyczna"

Osiągnięcia

1. Nagroda naukowa II stopnia za pracę: pt.: Sikora J, Podsiedlik M, Pietras T, Kosmalski M, Matłoka M, Moszczyński-Petkowski R, Wieczorek M, Markowicz-Piasecka M. Quetiapine and novel PDE10A inhibitors potentiate the anti-BuChE activity of donepezil. J Enzyme Inhib Med Chem. 2020; 35(1):1743-1750. doi: 10.1080/14756366.2020.1818739. IF: 5,051, MNiSW: 140.

Załączniki do pracy

Załącznik 1. Oświadczenie autorów publikacji



Załącznik nr 7
do Regulaminu postępowania w sprawie nadania stopnia doktora
w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi

Łódź, 11.02.2024

Maria Podsiedlik
(imię i nazwisko Kandydata)

PRZEWODNICZĄCY RADY NAUKOWEJ
DYSCYPLINY / UNIWERSYTETU*

OŚWIADCZENIE

Współautorów określające ich wkład w powstanie artykułu lub monografii¹

Oświadczam, że mój udział w następującej pracy²:

Podsiedlik M, Markowicz-Piasecka M, Sikora J. The Influence of Selected Antipsychotic Drugs on Biochemical Aspects of Alzheimer's Disease. Int J Mol Sci. 2022 Apr 21;23(9):4621. doi: 10.3390/ijms23094621. PMID: 35563011; PMCID: PMC9102502.

przedstawia się jak poniżej:

Autor	Udział %	Opis udziału własnego	Podpis
Maria Podsiedlik	70%	przegląd literatury, walidacja metod analitycznych, przeprowadzenie badań eksperymentalnych, interpretacja i opracowanie uzyskanych wyników, przygotowanie manuskryptu, wizualizacja wyników	<i>Maria Podsiedlik</i>
Magdalena Markowicz-Piasecka	15%	przygotowanie planu i koncepcji badań, nadzór nad przygotowaniem manuskryptu, recenzowanie manuskryptu	<i>Magdalena Markowicz-Piasecka</i>
Joanna Sikora	15%	przygotowanie planu i koncepcji badań, nadzór nad przygotowaniem manuskryptu, recenzowanie manuskryptu	<i>Joanna Sikora</i>

¹ W przypadku, gdy dorobek stanowi autorstwo dwóch lub więcej osób

² Należy wskazać: autorów, tytuł, czasopismo, rok wydania, tom, strony

**Załącznik 2. Zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
(RNN/278/19/KE)**

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W ŁODZI
Pl. Hallera 1B, 90-647 Łódź, tel. 0 785 911 596, 42 272-52-43, *bioetyka@umed.lodz.pl*

UCHWAŁA
KOMISJI BIOETYCZNEJ O PROJEKCIE EKSPERYMENTU MEDYCZNEGO
Numer RNN/278/19/KE z dnia 13 czerwca 2019 r.

(przy korespondencji dotyczącej niniejszej decyzji prosimy powoływać się każdorazowo na powyższy numer i datę Uchwały)

Główny badacz i wykonawca:

Dr hab.n.med.prof.nadzw. Marlena Broncel, Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi;

Mgr farm Maria Podsiedlik, Pracownia Bioanalizy Zakładu Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji UM w Łodzi, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź

Promotorzy: dr hab.n.med.prof.nadzw. Joanna Sikora; dr n.farm. Magdalena Markowicz-Piasecka, Zakład Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji UM w Łodzi

Tytuł badania:

Wpływ wybranych leków przeciwpsychotycznych na biochemiczne aspekty choroby Alzheimerera.

Na podstawie ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentysty (t. j. Dz. U. z 2017 r. poz. 125, z późn. zm.), ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2016 r. poz. 2142 z późn. zm.), rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. z 2012 r., poz.491), ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (Dz. U. z 2017 r. poz. 211 ze zm.), rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. w sprawie wzorów wniosków przedkładanych w związku z badaniem klinicznym, wysokości opłat za złożenie wniosków oraz sprawozdania końcowego z wykonania badania klinicznego (Dz. U. poz. 208), rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47 poz. 480), zarządzenia nr 8/2015 z 16 lutego 2015 r. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w sprawie wprowadzenia Regulaminu pracy Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi oraz zarządzenia nr 57/2017 z dnia 5 września 2017 r. Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w sprawie powołania Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi po przeanalizowaniu wniosku, zapoznaniu się z projektem opinii dotyczącej zgłoszonego badania, w głosowaniu tajnym, Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (wypełniając zobowiązania ICH GCP) uchwala, co następuje:

§ 1

1. Opiniuje wniosek **pozytywnie, bez zastrzeżeń**, na podstawie złożonych dokumentów, których wykaz określa załącznik nr 1. Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

§ 2

Opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku z uwzględnieniem przedstawionego projektu. Każda zmiana i modyfikacja wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, zdarzeniach niepożądanych oraz nieprzewidzianych okolicznościach.

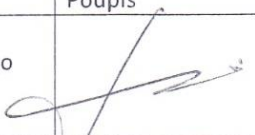
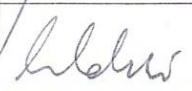

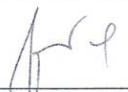

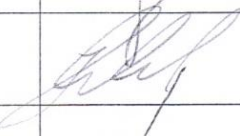

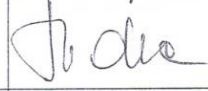
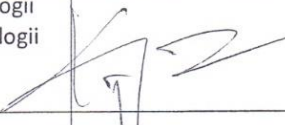

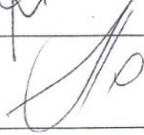
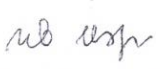
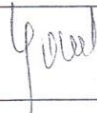
Odwolanie od niniejszej uchwały wnosi się za pośrednictwem Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi do Odwoławczej Komisji Bioetycznej, w terminie 14 dni od dnia otrzymania uchwały wyrażającej opinię.

Przewodniczący Komisji Bioetycznej
przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi

prof. dr hab. n. med. Józef Drzewoski

Lista obecności na posiedzeniu Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi

w dniu 13 czerwca 2019 r.

Lp.	Imię i nazwisko	Zawód, specjalność	Miejsce pracy	Podpis
1.	Prof. dr hab. n. med. Józef Drzewoski Przewodniczący Komisji	Lekarz medycyny, internista, diabetolog farmakolog kliniczny	Emerytowany profesor Uniwersytetu Medycznego w Łodzi	
2.	Ks. dr hab. Jan Wolski Z-ca Przewodniczącego Komisji	Duchowny, bioetyk	Wyższe Seminarium Duchowne w Łodzi	
3.	Prof. dr hab. n. med. Andrzej Głębiński	Lekarz medycyny, neurolog	Klinika Neurologii i Udarów Mózgu UM w Łodzi	
4.	Prof. dr hab. n. med. Iwona Kłoszewska	Lekarz medycyny psychiatra	Klinika Psychiatrii Wieku Podeszłego i Zaburzeń Psychotycznych UM w Łodzi	
5.	Dr n.med. Maja Kufelnicka- Babout	Lekarz medycyny położnik, ginekolog	Klinika Perinatologii, I Katedry Ginekologii i Położnictwa UM w Łodzi	
6.	Prof. dr hab. n. med. Janusz Piekarski	Lekarz medycyny, chirurg onkolog	Klinika Chirurgii Onkologicznej UM w Łodzi	
7.	Prof. dr hab. n. med. Henryk Stępień	Lekarz medycyny, endokrynologia	Zakład Immunoendokrynologii UM w Łodzi	
8.	Dr hab. n. med. prof. nadzw. Marta Woldańska- Okońska	Rehabilitacja medyczna	Klinika Rehabilitacji i Medycyny Fizykalnej UM w Łodzi	
9.	Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Zeman	Lekarz medycyny, pediatria, immunologia kliniczna	Klinika Pediatrii, Kardiologii Prewencyjnej i Immunologii Wieków Rozwojowego UM w Łodzi	
10.	Dr n. prawn. Rafał Budzisz	Prawnik	Uniwersytet Łódzki w Łodzi	
11.	Mgr Elżbieta Kubańska	Pielęgniarka	Pracownik emerytowany	
12.	Mgr Elżbieta Piotrowska- Rutkowska	Farmaceutka	Naczelna Izba Aptekarska, ul. Długa 16 w Warszawie	
13.	Dr n. med. Elżbieta Jaszczuk	Lekarz medycyny, anestezjologia i intensywna terapia	Przedstawicielka Okręgowej Rady Lekarskiej w Łodzi	

ZAŁĄCZNIK Nr 1 DO UCHWAŁY
KOMISJI BIOETYCZNEJ O PROJEKCIE EKSPERYMENTU MEDYCZNEGO
Numer RNN/278/19/KE z dnia 13 czerwca 2019 r.

(przy korespondencji dotyczącej niniejszej decyzji prosimy powoływać się każdorazowo na powyższy numer i datę Uchwały)

Główny badacz i wykonawca:

Dr hab.n.med.prof.nadzw. Marlena Broncel, Klinika Chorób Wewnętrznych i Farmakologii Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi;

Mgr farm. Maria Podsiedlik, Pracownia Bioanalizy Zakładu Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji UM w Łodzi, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź

Promotorzy: dr hab.n.med.prof.nadzw. Joanna Sikora; dr n.farm. Magdalena Markowicz-Piasecka, Zakład Chemii Farmaceutycznej, Analizy Leków i Radiofarmacji UM w Łodzi

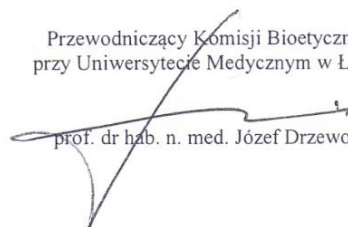
Tytuł badania:

Wpływ wybranych leków przeciwpsychotycznych na biochemiczne aspekty choroby Alzheimerera.

Do Komisji wpłynęły następujące dokumenty:

1. Wniosek do Komisji Bioetycznej
2. Protokół badania
3. Życiorysy: dr hab.n.med.prof.nadzw. Marlena Broncel, mgr farm. Maria Podsiedlik
4. Zgoda kierownika Działu Diagnostyki Laboratoryjnej WSSz. im. Wł. Biegańskiego w Łodzi na wykorzystanie do badań *in vitro* próbek krwi przeznaczonej do utylizacji.

Przewodniczący Komisji Bioetycznej
przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi


prof. dr hab. n. med. Józef Drzewoski