

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Disolučné štúdie nových potenciálnych liečiv na Alzheimerovu chorobu
Bakalárska práca

2023

Darina Adamcová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Darina Adamcová**
Osobní číslo: **C20316**
Studijní program: **B0531A130012 Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Disoluční studie nových potenciálních léčiv na Alzheimerovu chorobu**
Téma práce anglicky: **Dissolution Study of New Potential Drugs on Alzheimer's Disease**
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma "Přístupy ve farmakoterapii Alzheimerovy choroby". Zaměřte se především na léčiva na bázi inhibitorů acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy.
2. Metodou přímého lisování připravte matricové tablety s vybranými potenciálními léčivy na bázi sulfonamidů.
3. Proveďte disoluční test připravených matricových tablet v disolučních médiích simulujících trávicí trakt člověka.
4. Získané disoluční profily kvantitativně vyhodnoťte pomocí vhodných matematických modelů a výsledky diskutujte.
5. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce v souladu se Směrnicí UPCE č. 7/2019 "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací" v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy: **doporučený rozsah 35 stran**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
veškerá dostupná odborná literatura

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Alena Komersová, Ph.D.**
Katedra fyzikální chemie
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Marie Nevyhoštěná**

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prehlasujem:

Prácu s názvom Disolučné štúdie nových potenciálnych liečiv na Alzheimerovú chorobu som vypracovala samostatne. Všetky literárne pramene a informácie, ktoré som v práci využila, sú uvedené v zozname použitej literatúry.

Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov, hlavne so skutočnosťou, že Univerzita Pardubice má právo na uzavretie licenčnej zmluvy o užití tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona a s tým, že ak dôjde k užitiu tejto práce mnou, alebo bude poskytnutá licencia o použití inému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávnená odo mňa požadovať primeraný príspevok na úhradu nákladov, ktoré na vytvorenie diela vynaložila, a to podľa okolností až do ich skutočnej výšky.

Beriem na vedomie, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov, a smernice Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pre odovzdávanie, zverejňovanie a formálnu úpravu záverečných prací, v znení neskorších dodatkov, bude práca zverejnená prostredníctvom Digitálnej knižnice Univerzity Pardubice.

V Pardubiciach dňa 30. 6. 2023

Darina Adamcová v.r.

POĎAKOVANIE

Rada by som na prvom mieste poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce doc. Ing. Alene Komersovej, Ph.D. z Katedry fyzikálnej chémie za pomoc so spracovaním výsledkov, trpezlivý prístup a množstvo cenných rád. Ďalej by som chcela poďakovať konzultantke práce Ing. Marií Nevyhoštěnej, za obrovskú pomoc pri spracovaní výsledkov a vykonávaní experimentálnej časti.

Obrovské poďakovanie patrí mojej rodine, hlavne mamke a jej manželovi, za ich neustálu dôveru a podporu počas celého štúdia, priateľovi a spolužiakom, bez ktorých by som to nikdy nedotiahla až do konca.

V Pardubiciach dňa 30. 6. 2023

Darina Adamcová

ANOTÁCIA

Táto bakalárska práca je zameraná na prípravu a testovanie matricových tabliet obsahujúcich sulfónamidy ako potenciálne účinné látky pri liečbe Alzheimerovej choroby. Teoretická časť je venovaná popisu vybraných farmakoterapeutických prístupov používaných v súčasnosti, doplnená informáciami o potenciálnych liečivách. Ďalej je popisovaný priebeh a vyhodnotenie disolučnej skúšky a matematické modely používané pri tejto bakalárskej práci. V experimentálnej časti je hlavným predmetom testovanie pripravených matricových tabliet so sulfónamidmi pomocou disolučnej skúšky a ich vyhodnotenie pomocou vhodných disolučných modelov.

KĹÚČOVÉ SLOVÁ

Alzheimerová choroba, disolučný test, liečiva, Acetylcholinesteráza, inhibítory

ZADÁNÍ

Disoluční studie nových potenciálních léčiv na Alzheimerovu chorobu

ANOTACE

Bakalářská práce je zaměřená na přípravu a testování matricových tablet obsahujících sulfonamidy jako potenciální účinné látky při léčbě Alzheimerovy choroby. Teoretická část je věnovaná popisu vybraných farmakoterapeutických přístupů používaných v současnosti, doplněná informacemi o potenciálních léčivech. Dále je popisován průběh a vyhodnocení disoluční zkoušky a matematické modely používané v rámci bakalářské práce. V experimentální části je hlavním předmětem testování připravených matricových tablet se sulfonamidy pomocí disoluční zkoušky a jejich vyhodnocení pomocí vhodných disolučních modelů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Alzheimerová choroba, disoluční test, léčiva, acetylcholinesteráza, inhibitory

TITLE

Dissolution Study of New Potential Drugs on Alzheimer's Disease

ANNOTATION

This bachelor thesis is focusing on the preparation and testing of matrix tablets, containing sulfonamides as potential active substances in treatment of Alzheimer disease. The theoretical part is devoted to the description of selected pharmacotherapeutic ways used in the present, supplemented with information about new potential drugs. Next, the process and evaluation of dissolution study is described, as well as mathematic models used during this bachelor thesis. In the experimental part, main subject is testing of prepared matrix tablets containing sulfonamides, using dissolutin test and evaluation through recieved dissolution models.

KEYWORDS

Alzheimer disease, dissolution test, drugs, Acetylcholinesterase, inhibitors

OBSAH

ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ	11
ZOZNAM GRAFOV	12
ZOZNAM TABULIEK	12
ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK	13
ÚVOD	14
1. TEORETICKÁ ČASŤ	15
1.1. Inhibítory acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy	15
1.2. Antagonisti NMDA receptorov	17
1.3. Liečivá β -amyloidového typu.....	19
1.4. Liečba spojená s proteínom TAU	20
1.5. Skúška disolúcie pevných liekových foriem	22
1.5.1. Prístroj s pádielkami.....	22
1.5.2. Matricové tablety.....	22
1.5.3. Disolučné média.....	23
1.5.4. Vyhodnotenie disolučných profilov	24
1.5.5. Matematické modely	24
2. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	27
2.1. Disolučný test	27
2.1.1. Laboratórne prístroje a pomôcky	27
2.1.2. Použité chemikálie a roztoky	27
2.1.3. Zloženie, homogenizácia a lisovanie tabliet	27
2.1.4. Príprava disolučných médií.....	30
2.1.5. Priebeh disolučnej skúšky	30
2.1.6. UV/VIS spektrometria	31
2.1.7. Príprava kalibračných roztokov	32

2.1.8. Kalibračná krivka	32
2.2. Výsledky a diskusia	32
2.2.1. Disolučné profily	33
2.2.2. Regresná analýza disolučných profilov	38
ZÁVER.....	41
PRÍLOHY.....	42
POUŽITÁ LITERATÚRA	45

ZOZNAM ILUSTRÁCIÍ

Obrázok 1: Rozdielna štruktúra Takrínu (A) a amiridínu (B).....	17
<i>Obrázok 2: zjednodušená štruktúra NMDA receptoru, prevzaté a upravené z [15].....</i>	<i>17</i>
<i>Obrázok 3: Porovnanie zdravého mikrotubulu a mikrotubulu poškodeného pri AD, prevzaté z [31].....</i>	<i>21</i>
Obrázok 4: Nalisované tablety pripravené k disolučnému testu (4 s API + 1 blank).....	29
Obrázok 5: Disolučná aparátúra SOTAX AT 7 smart	31
Obrázok 6: Tablety s látkou A (vľavo) a B (vpravo) v médiu o pH 6,8 po disolučnej skúške	34

ZOZNAM GRAFOV

Graf 1: Disolučné profily látky A v pH 1,2; 4,5 a 6,8 preložené modelom Weibull a kinetickým modelom I. rádu	34
Graf 2: Disolučné profily látky B v pH 1,2; 4,5 a 6,8 preložené modelom Weibull a kinetickým modelom I. rádu	36
Graf 3: Disolučné profily látky A v pH 1,2; 4,5 a 6,8 preložené modelom Korsmeyer-Peppas	37
Graf 4: Disolučné profily látky B v pH 1,2; 4,5 a 6,8 preložené modelom Korsmeyer-Peppas	37

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Hodnoty molekulových hmotností a biologických aktivít pre testované sulfónamidy	28
Tabuľka 2: zloženie tabliet v hm. % a mg zložky na celkovú hmotnosť tablety (500 mg)	29
Tabuľka 3: rovnice lineárnej závislosti látky A a B v jednotlivých disolučných médiách	32
Tabuľka 4: Vyhodnotenie disolučných profilov látky A pomocou kinetického modelu I. rádu	38
Tabuľka 5: Vyhodnotenie disolučných profilov látky B pomocou kinetického modelu I. rádu	38
Tabuľka 6: Vyhodnotenie disolučných profilov látky A pomocou modelu Weibull	39
Tabuľka 7: Vyhodnotenie disolučných profilov látky B pomocou modelu Weibull	39
Tabuľka 8: Vyhodnotenie disolučného profilu látky A pomocou modelu Korsmeyer-Peppas	39
Tabuľka 9: Vyhodnotenie disolučného profilu látky B pomocou modelu Korsmeyer-Peppas	40

ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK

A β	β -amyloid
AD	Alzheimerová choroba
Ach	acetylcholín
AChE	acetylcholínesteráza
API	účinná látka (active pharmaceutical ingredient)
APP	amyloidový prekursorový proteín (amyloid precursor protein)
BACE1	β -sekretáza
BCh	butyrylcholín
BChE	butyrylcholínesteráza
CNS	centrálne nervová sústava
GIT	gastrointestinálny trakt
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMDAR	N-methyl-D-aspartátový receptor
p-TAU	proteín TAU
UV	ultrafialová oblasť spektra
VIS	viditeľná oblasť spektra

ÚVOD

Alzheimerová choroba (AD) patrí medzi najzávažnejšie a najrozšírenejšie neurodegeneratívne ochorenie na svete, ktoré postihuje 40-50 miliónov ľudí celosvetovo. Klinicky sa prejavuje ako progresívna, neliečiteľná a nevratná demencia sprevádzaná okrem iného zmenou chovania a stratou krátkodobej pamäti. Celkovo predstavuje 60-70 % zo všetkých diagnostikovaných prípadov demencie.^[1] Z neuropatologického hľadiska je AD charakterizovaná ako úbytok mozgového tkaniva, ktorý je spôsobený masovým odumieraním nervových buniek, hlavne vo frontálnom laloku a limbickom systéme.^[2]

Medzi najkritickejšie faktory pre rozvoj AD je vek. V roku 2019 bol u seniorov vo veku 65- 75 rokov výskyt ochorenia približne u 3% ľudí, vo veku 75-84 rokov je to približne 17% a u ľudí starších ako 84 rokov sa prevalencia ochorenia šplhá až na 32%.^[3] Celkovo AD obsadzuje štvrté, až piate miesto v najčastejších príčinách smrti.^[1]

Klinická diagnostika ochorenia, hlavne v skorých štádiách, je veľmi ťažká, pretože symptómy môžu pripomínať klasický priebeh starnutia. Okrem diagnostiky je mimoriadne problémová aj liečba. Komplexná a efektívna liečba, ktorá by zabránila postupu závažných patologických zmien a pomohla k obnoveniu kognitívnych funkcií je, bohužiaľ, stále v nedohľadne, avšak pri včasnej diagnostike ochorenia a zahájení liečby existuje vysoká šanca na potlačenie šírenia ochorenia a zlepšenie kvality života u pacientov.^[4]

Táto bakalárska práca je zameraná na výskum nových potenciálnych prístupov v liečbe AD. Teoretická časť je venovaná prehľadu niektorých farmakologických prístupov využívaných pri symptomatickej liečbe Alzheimerovej choroby. Experimentálna časť sa zaoberá prípravou matricových tabliet so sulfónamidmi ako aktívnymi látkami a ich disolučnými testami v médiách, ktoré simulujú prechod tráviacim traktom. V závere práce sú zhrnuté dosiahnuté výsledky.

1. TEORETICKÁ ČASŤ

1.1. Inhibítory acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy

Najdôležitejšou a najvyužívanejšou triedou liečiv pri symptomatickej liečbe Alzheimerovej choroby sú inhibítory acetylcholinesterázy (AChE) a butyrylcholinesterázy (BChE).^[5]

Acetylcholín (ACh), ktorý je z chemického hľadiska ester kyseliny octovej a cholínu, radíme medzi hlavné excitačné neurotransmitery. V periférnej nervovej sústave je súčasťou parasympatického autonómneho systému a taktiež prenáša signály na nervosvalových platničkách. Je schopný pôsobiť na dva typy receptorov: muskarínové a nikotínové. Butyrylcholín je na rozdiel od ACh neurotransmitterom syntetickým. Z funkčného hľadiska sa však ich aktivita výrazne nelíši.^[6]

ACh hrá kritickú rolu pri udržovaní kognitívnych funkcií, z ktorých hlavne pôsobí na učenie a pamäť. Jeho nedostatok sa prejavuje napríklad stratou pamäti, dezorientáciou, alebo rečovými poruchami a môže teda byť jednou z potenciálnych príčin vzniku AD.

Princípom pôsobenia AChE a BChE je inaktivácia neurotransmiteru ACh, spôsobená jeho hydrolytickým štiepením na jednoduchšie molekuly: cholín a acetát.^[5] V momente inhibície AChE, alebo BChE účinkom liečiva, sa začína ACh akumulovať na synapsií, čo má za následok zvýšenú cholinergnú aktivitu.^[7]

Doteraz je známych niekoľko licencovaných liečiv uvedených na trh, ktoré práve princíp inhibície enzýmov využívajú. Takrín, na trh uvedený ako prvý v roku 1993, bol kvôli svojej hepatotoxicite z predaja stiahnutý. Dostupné sú dnes aj ďalšie tri liečiva s obchodnými názvami Rivastigmin, Galantamín a Donepezil.^[5]

Vyššie uvedené inhibítory AChE a BChE však ako symptomatické lieky na AD neposkytujú dlhodobú ochranu od postupu choroby. Aj keď tieto látky vykazujú významné zlepšenie kognitívnych, ale aj nekognitívnych funkcií, pozitívny účinok možno pozorovať iba po dobu jedného roku užívania, s najvyšším účinkom v prvých troch rokoch od diagnostikovania ochorenia.^[8] Liečba je určená predovšetkým k tlmeniu ľahkých a stredne ťažkých prejavov a často býva spojená s radou nežiaducich účinkov, medzi ktoré patrí napríklad nevoľnosť, chudnutie, alebo svalová slabosť.^[9]

Krátky účinok, neefektívna liečba ochorenia, ale taktiež rada nežiaducich účinkov sú hlavnými dôvodmi neustálej snahy vedeckých tímov po celom svete syntetizovať látky,

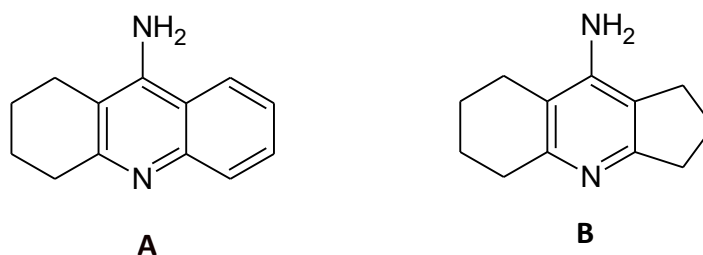
ktoré svojou nízkou toxicitou a efektívnosťou v liečbe budú pomáhať miliónom pacientov nielen pri AD, ale aj iných neurodegeneratívnych ochoreniach.

Jedným z niekoľkých druhov potenciálnych liečiv na AD sú sulfónamidy. Tieto liečiva sú vďaka svojim bakteriostatickým účinkom najstarším druhom syntetických antibiotík. Dnes sú však ako antibiotika takmer nepoužívané z dôvodu vzniku bakteriálnej rezistencie, avšak výskum ich farmakologického použitia stále pokračuje.

Veľmi priaznivé výsledky nielen v inhibícií AChE a BChE vykazujú indolové sulfónamidy. Indol a jeho deriváty sú pomerne častým cieľom štúdií, pretože sa vďaka svojej štruktúre dokážu naviazať na významné množstvo receptorov s vysokou afinitou. Štúdie ukazujú významnú inhibičnú aktivitu AChE u niekoľkých indolových sulfónamidov v porovnaní s Donepezilom, používaným ako štandard. Významný vplyv na silu účinku má počet, pozícia a druh funkčných skupín naviazaných na aromatickom kruhu sulfónamidového skeletu.^[10]

Inou široko študovanou skupinou látok sú deriváty amiridínu. Amiridín je tricyklická zlúčenina obsahujúca vo svojej molekule cyklopentán a chinolín. Svojou štruktúrou sú amiridíny podobné takrínu, avšak na rozdiel od neho vykazujú podstatne menej vedľajších účinkov, nie sú hepatotoxické a majú širšie terapeutické využitie. Ich biologická aktivita spočíva okrem vratnej inhibície AChE a BChE napríklad aj v metabolizme fosfolipidov, alebo znižovaní permeability membrány pre draslíkové ióny. Veľmi významnou vlastnosťou amiridínov je ich schopnosť rýchleho preniknutia do mozgového tkaniva a hromadenie hlavne v mozgovej kôre a hipokampe, takže štruktúrach najviac náchylných k poškodeniu pri AD.^[11]

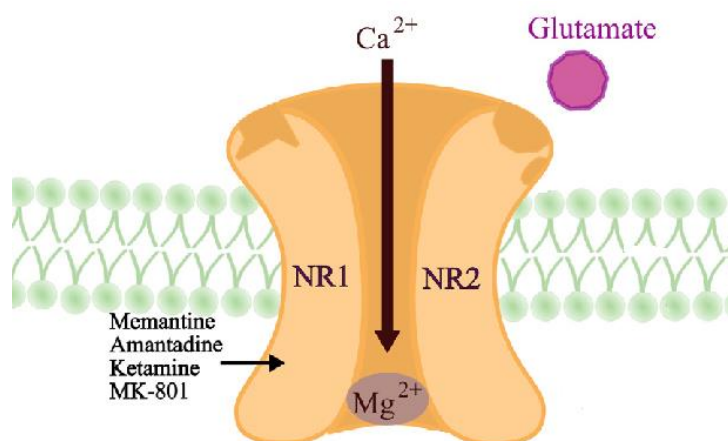
Amiridíny sú ako potenciálne liečiva na AD študované ako rôzne deriváty. Sem radíme napríklad bis-amiridíny, alebo deriváty amiridínu a piperazínu. Problémom u tejto skupiny látok však môže byť ich relatívne nízka dostupnosť a štruktúra, ktorá vykazuje v porovnaní s takrínom nižšiu aktivitu. To môže byť spôsobené stericným faktorom dvoch polymethylenových kruhov nachádzajúcich sa v molekule.^[12] Rozdiel v molekule takrínu a amiridínu je zobrazený na **obrázku 1**.



Obrázok 1: Rozdielna štruktúra Takrínu (A) a amiridínu (B)

1.2. Antagonisti NMDA receptorov

Excitačná glutaminergná neurotransmisia sprostredkovaná pomocou N-methyl-D-aspartátových receptorov (NMDAR), hra kritickú rolu v udržovaní plasticity synapsí pri prenose excitačného vzruchu, či vývoji nervového tkaniva. Konkrétne možno povedať, že NMDAR zodpovedajú za funkcie spojené s učením a pamäťou, ovplyvňujú stavy úzkosti a s ich funkciou úzko súvisí niekoľko chorôb spojených s depresiou.^[13] Zvýšená aktivita týchto receptorov spojená s nadmernou prítomnosťou glutamátu môže vykazovať známky excitotoxicity. Glutamát teda vo zvýšenom množstve pôsobí ako nervový jed a spôsobuje bunecnú smrť. Tento mechanizmus je považovaný za jeden z potenciálnych príčin neurodegenerácie spojenej s AD.^[14] Zjednodušená schéma NMDA receptoru je zobrazená na **obrázku 2**.



Obrázok 2: zjednodušená štruktúra NMDA receptoru, prevzaté a upravené z [15]

Ionotropné NMDAR sa na rozdiel od iných glutaminergných receptorov vyznačujú vyššou permeabilitou pre vápnikové ióny. Za normálnych okolností je ich funkcia zabezpečená pomocou extracelulárneho Mg^{2+} , ktorý reguluje priestupnosť membrány pre Ca^{2+} ióny. Prestupom Ca^{2+} do buniek sú sprostredkované fyziologické funkcie spojené s glutamátom.^[16] Pri nadmernom množstve glutamátu je spôsobená depolarizácia postsynaptickej membrány a následne uvoľnenie Mg^{2+} blokády, čím sa NMDAR aktivujú a zapríčia predĺžený tok Ca^{2+} do neurónu. Patologické množstvo vápnikových iónov v bunkách spôsobuje postupnú stratu synaptických funkcií a smrť neurónov.^[14]

Dôležitosť NMDA receptorov viedla nemalé množstvo výskumných tímov k testovaniu nekompetitívnych antagonistov NMDAR. Väčšina týchto látok ale stroskotala počas klinických a preklinických štúdií, predovšetkým kvôli ich slabému účinku a nízkej tolerancii, spojených s relatívne závažnými vedľajšími účinkami ako napríklad vznik psychóz a nevoľnosť.^[16]

Antagonisti NMDA receptorov blokujú tieto receptory a tým znižujú prítok vápnikových iónov do nervových buniek, čím sú potlačené patologické vnútrobunecné procesy.^[17] Jedným z mála nekompetitívnych NMDAR antagonistov s pomerne dobrou toleranciou je Memantin. Na rozdiel od používaných liečiv zo skupiny AChE a BChE inhibítorov, je Memantin používaný k symptomatickej liečbe stredne ťažkých, až ťažkých príznakov AD.^[16]

Okrem už používaného Memantinu sú skúmané aj ďalšie potenciálne látky so schopnosťou antagonizmu NMDA receptorov. Za zmienku však stoja aj štúdie zameriavajúce sa na duálnu, alebo kombinovanú liečbu, ktorá má za úlohu cieľiť na viacero potenciálnych príčin vzniku AD. Najčastejšou kombináciou sú antagonisti NMDAR spolu s inhibítormi AChE a BChE. Ku štádiu klinických štúdií sa prebojovali Memantin spolu s Galantamínom, avšak ich spoločný priaznivý účinok v porovnaní so samostatnými liečivami, nebol dostatočne preukázaný.^[18] Jedným z mnohých skupín viac cieľových potenciálnych liečiv, ktoré sa podobne radia medzi inhibítory AChE a BChE a zároveň medzi antagonistov NMDAR sú napríklad benzohomoadamantan-chlortakríny, ktorých výskum je momentálne v začiatkoch, avšak doteraz vykazujú priaznivé účinky na zmienené receptory.^[19]

1.3. Liečivá β -amyloidového typu

β -amyloidy ($A\beta$) sú látky radené medzi peptidy, ktoré vznikajú štiepením transmembránového glykoproteínu- amyloidového prekursorového proteínu (APP). Za normálnych podmienok je APP štiepený postupne pomocou enzýmov α -sekretázy a γ -sekretázy za vzniku rozpustného peptidu bez tendencie agregovať.^[20] V prípade, ak je APP štiepený β -sekretázou (BACE1) a γ -sekretázou, biosyntetizuje sa neurotoxický peptid zvaný β -amyloid. Akumulácia $A\beta$ mimo bunku, má za následok agregáciu v oligoméroch, protofibrilách, fibrilách a postupne sa ukladá vo forme nerozpustných plakov, ktoré spôsobujú narušenie synapsí až dokonca smrť neurónov. Okrem toho je ukladanie $A\beta$ a tvorba plakov zodpovedné za poškodenie ciev a tvorbu neurofibrilárných klobiek spojených s proteínom TAU (p-TAU).^[21]

Potenciálnym terapeutickým terčom pre AD sa stal enzým BACE1, obsahujúci vo svojej molekule okrem iného aj aminokyselinu aspartát. BACE1 hrá významnú úlohu pri tvorbe $A\beta$ a amyloidových plakov, čo je hlavný dôvod nutnosti inhibovať enzým a tým modulovať spracovanie APP. Najväčšou prekážkou je však skutočnosť, že BACE1 sa za fyziologických podmienok nachádza v bunkách a vykazuje značnú štruktúrnu podobnosť s inými aspartátovými enzýmami. Je preto dosť veľkou výzvou docieľiť selektívnu výhradne pre BACE1 bez ovplyvnenia ďalších enzýmov a tým minimalizovať počet nežiadúcich účinkov.^[22] Zostáva tiež otázkou, ako vyvinúť štruktúru schopnú prechádzať do mozgového tkaniva cez hematoencefalickú bariéru, čo však predstavuje veľký problém u väčšiny liečiv určených k liečbe neurodegeneratívnych porúch.^[23]

Navzdory početným prekážkam sa mnohým tímom podarilo vyvinúť dostatočne selektívne, účinné a biologicky dostupné inhibítory. Mnoho z nich dokonca vykazovalo sľubné klinické efekty avšak ani jedna látka neprešla konečnými fázami klinického testovania.

Farmakoterapeutická metóda, ktorá sa v prípade amyloidových plakov dočkala úspechu je liečba monoklonálnymi protilátkami. Tie sú v dnešnej dobe terčom intenzívneho výskumu, nielen pri AD, ale aj iných neurodegeneratívnych ochoreniach. Dve liečiva, ktoré sa dočkali obrovského úspechu sú Lecanemab a Aducanumab.

Lecanemab je humanizovaná IgG monoklonálna protilátka, ktorá sa viaže vďaka svojej vysokej afinite na $A\beta$ rozpustné protofibrily. Bolo spozorované zredukovanie amyloidových plakov a mierne nižší pokles kognície v porovnaní s podávaným placebom.^[24] Liečivo bolo

6. januára 2023 schválene Americkou FDA na použitie pri miernych kognitívnych poruchách a miernych štádiách demencie. [25]

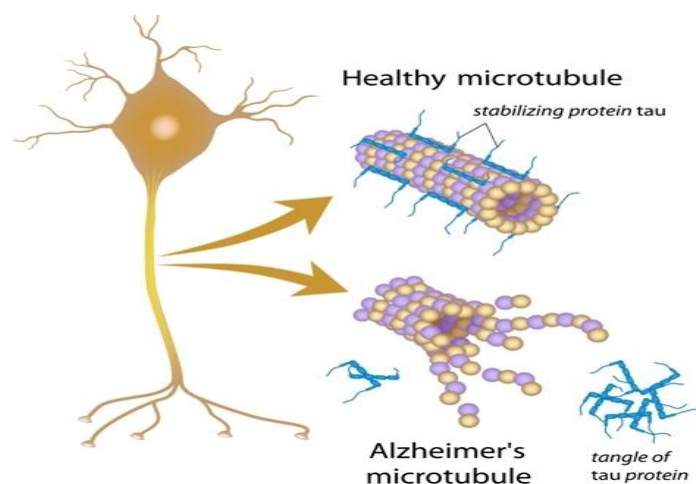
Aducanumab, schválený FDA 7. júna 2021, je podobne ako Lecanemab monoklonálnou IgG protilátkou. Je vôbec prvým schváleným liečivom na AD od roku 2003, kedy bol schválený Memantin. Je rovnako určený k použitiu pri miernych kognitívnych poruchách a miernych štádiách demencie. [26] Obe látky sú aj napriek svojmu schváleniu spojené s radou závažných vedľajších účinkov, napríklad vznikom edémov, alebo uvoľnením hemosiderínu. Ich pozitívny prínos je ale zrejme vyšší a v spojení s neúspechom vo výskume liečebných variant po takmer dve dekády sú najvhodnejšími alternatívami.

1.4. Liečba spojená s proteínom TAU

Neuropatologicky je možné AD charakterizovať prítomnosťou neurofibrilárnych lézií vo vnútri neurónov tvorených proteínmi TAU (p-TAU), ktoré sa radia medzi kľúčové proteíny spojené s mikrotubulami. [27] Dokážu neuronálne mikrotubuly stabilizovať a vo vysokej miere sa vyskytujú v CNS. Mikrotubuly patria medzi zložky cytoskeletu a podieľajú sa na niekoľkých procesoch v bunke, napríklad na procese delenia. Dôležitú úlohu hrajú pri transporte organel vo vnútri bunky, predovšetkým pri axonálnom transporte, vďaka ktorému je sprostredkovaný prenos nervových vzruchov. [28]

V zdravých neurónoch je na p-TAU naviazaný veľký počet fosfátových skupín, ktoré sa z väčšiny nachádzajú na mieste jeho styku s mikrotubulami. [29] V tomto mieste, za fyziologických podmienok vysoko rozpustný p-TAU, interaguje s tubulínom a podporuje jeho včlenenie do mikrotubulov, čím sa ich štruktúra dokáže stabilizovať. [30]

V poškodenom mozgu sa TAU stáva abnormálne hyperfosforylovaným, čo má okrem straty afinity k naviazaniu mikrotubulov za následok aj agregáciu voľných molekúl proteínu TAU do párových helikálnych vlákien. Tieto vlákna nie sú rozpustné a hromadia sa v cytosole a do takzvaných klobiek, alebo tangels. Predpokladá sa, že hyperfosforylácia p-TAU je výsledkom poškodenej bunecnej signalizácie, ktorá vzniká predovšetkým nerovnováhou medzi rôznymi proteín-kinázami a fosfátmi. [30] Schematické znázornenie zdravého mikrotubulu a mikrotubulu po hyperfosforylácii p-TAU je na **obrázku 3**.



Obrázok 3: Porovnanie zdravého mikrotubulu a mikrotubulu poškodeného pri AD, prevzaté z [31]

Výskumníci čoraz viac obracajú svoju pozornosť k terapiám zameraným na TAU proteín, pretože sa zdá, že takáto liečba výraznejšie zlepšuje kognitívny úpadok spôsobený AD, napríklad v porovnaní s liečbou zameranou na β -amyloidy. Väčšina potenciálnych látok pôsobiacich na TAU sú momentálne v začiatočnom štádiu klinických štúdií, avšak v posledných rokoch sa dostali štyri látky zo skupiny monoklonálnych protilátok a jedna vakcína až do druhej fázy klinického testovania. Jedná sa konkrétne o látky Gosuranemab, Tilavonemab, Semorinemab a Zagotenemab.^[27] Aj keď boli všetky tieto látky pacientami dobre tolerované, ich štúdie v druhej fáze zlyhali, pretože sa nepreukázal dostatočný klinický pokrok. Monoklonálne protilátky však stále zostávajú terčom pre štúdie a to aj vďaka úspechu liečiv Aducanumab a Lecanemab.

Inhibícia kináz, zodpovedných za hyperfosforyláciu p-TAU, sa taktiež javí ako zaujímavá stratégia s potenciálnou schopnosťou zablockovať ukladanie p-TAU. Jedným z najviac skúmaných prvkov s takouto schopnosťou je lítium. Problémom pri takomto type liečby by však mohol byť fakt, že kinázy sú dynamicky regulované a zúčastňujú sa v mnohých životne dôležitých dráhach a preto je potreba zamerať sa na reguláciu vedľajších účinkov spojenú s ich užívaním.^[32]

1.5. Skúška disolúcie pevných liekových foriem

Touto skúškou stanovujeme, aké množstvo účinnej látky sa uvoľní z pevnej liekovej formy v kvapaline s definovanými vlastnosťami v určenom čase (in vitro). Vďaka tejto skúške je možné posúdiť kvalitu a stabilitu liečiv. Sú známe 4 základné typy disolučných prístrojov: košíčkový, pádielkový, prístroj s prietokovou celou a prístroj s vratným valcom. Časti prístroja, ktoré sa môžu dostať do kontaktu s disolučným médiom, alebo skúmaným vzorkám, musia byť chemicky inertné. Spôsoby prevedenia disolučného testu, ako aj prístroj pre disolučnú skúšku je popísaný v Českom liekopise.^[33]

1.5.1. Prístroj s pádielkami

Prístroj je zložený z miešadla, vodného kúpeľu a valcovitej nádoby s guľatým dnom, ktorá je najčastejšie vyrobená z borosilikátového skla o objeme 1 l. Na vrchnej časti nádoby sa nachádza príklop v ktorom sú umiestnené otvory pre hnací hriadeľ, teplomer a otvor pre odber disolučnej kvapaliny. Miešadlo, alebo tiež pádielko, je zostavené z hnacieho hriadeľa, na ktorého spodnom konci sa nachádzajú dve lopatky, pričom ich spodný okraj prechádza spodným koncom hriadeľa. Správna funkcia prístroja je zabezpečená vtedy, ak sa hnací hriadeľ nachádza v strede nádoby a jeho spodný koniec je umiestnený približne 25 mm od dna nádoby. Na svojom hornom konci je hnací hriadeľ pripojený k motorovej jednotke, ktorá reguluje otáčky. Musí byť zabezpečené plynulé otáčanie miešadla, bez akéhokoľvek chvenia. Poslednou, nemenej dôležitou súčasťou prístroja, je vodný kúpeľ. Jeho úlohou je udržiavanie konštantnej teploty počas celej disolučnej skúšky a to na hodnote $37 \pm 0,5$ °C.^[33]

1.5.2. Matricové tablety

Matricové tablety s predĺženým uvoľňovaním liečiva zabezpečujú, že liečiva budú vstrebávané a následne vylučované postupne. Všeobecné zloženie takejto tablety je účinná látka (API) a excipienty. Excipienty, alebo pomocné latky, tvoria akúkoľvek zložku liečivého prípravku, s výnimkou API a obalového materiálu. Môžeme sem zaradiť lubrikačné látky, spojiva, farbiva, emulgátory, nosné polyméry, plniva, modifikátory chuti a iné.

Matricové tablety môžeme zaradiť medzi veľmi často využívané formy liekov a to hlavne vďaka ich schopnosti predĺženého uvoľňovania liečiva. Pozorujeme u nich rovnomerne

rozptýlenie API v nosnej pomocnej látke. Podľa vlastností nosnej pomocnej látky ich možno rozdeliť na hydrofilné gélové matrice (napríklad hydrofilné bobtnajúce polyméry), lipofilné matrice (napríklad tuky a vosky), nerozpustné matrice, napríklad skeletové matrice a na zmiešané matrice, v ktorých sa kombinujú predchádzajúce typy nosných excipientov. K najčastejšie využívaným pomocným látkam môžeme zaradiť napríklad: škrob, laktózu, hypromelózu, ethylcelulózu, methylcelulózu, hydroxypropylcelulózu a iné.^[36] Množstvo liečiva v závislosti na čase, ktoré sa uvoľní z matricovej tablety je stanovované pomocou metódy disolučnej skúšky, ktorej priebeh je popísaný v lékopise. Disolučná skúška poskytuje ako výsledok disolučný profil liečiva, ktorý radíme medzi najdôležitejšie vlastnosti liekovej formy. Vďaka nej možno určiť typ uvoľňovania liečiva (okamžité, riadené), typ riadeného uvoľňovania (predĺžené, pulzné, oneskorené) a taktiež mechanizmus a kinetiku uvoľnenia.

1.5.3. Disolučné média

Vo všeobecnosti sa ako disolučné médium využíva vodné prostredie, ktorého zloženie je starostlivo vyberané v závislosti na fyzikálnych a chemických vlastnostiach daného liečiva a pomocných látok. Veľký vplyv na výber média majú taktiež podmienky, ktorým bude po podaní s najväčšou pravdepodobnosťou lieková forma vystavená. To sa vzťahuje najmä k iónovej sile disolučného média a hodnote pH, meniacej sa v jednotlivých častiach tráviacej sústavy.^[33]

Pri disolučných testoch používané disolučné média sa odlišujú hodnotou pH, ktorá sa vo väčšine prípadov pohybuje od 1 do 8. Disolučné média sa delia na základné a biorelevantné. Perorálnym podaním sa liečivo dostáva do žalúdka, kde sa vďaka prítomnosti kyseliny chlorovodíkovej pohybuje pH v rozmedzí 1-3. V dvanástniku sa kyslý obsah žalúdka zneutralizuje a hodnota pH stúpa na 4,3-5. Hodnota pH sa prechodom do ďalej pasáže tenkého čreva opäť zvyšuje. Dosahuje až hodnoty 6-7 a prostredie sa z kyslého mení na slabo alkalické.^[33,34]

Základne disolučné média sú navrhnuté hlavne pre kontrolu liekovej formy a sú predložené v lékopisoch. Môžeme k nim zaradiť vodu (pH 7), umelú žalúdočnú šťavu (pH 1- 1,2), umelú dvanástnikovú šťavu (pH 3,5- 6,1), umelú črevnú šťavu (pH 6,8- 7,2) a umelú tračnikovú šťavu (pH 5,8- 7,8). Zloženie základných disolučných médií však dostatočne neodráža skutočné podmienky v tráviacom trakte (GIT). Nezohľadňujú hľadiska, ktoré môžu výrazne ovplyvňovať

proces uvoľňovania účinnej látky z liekovej formy a jej vstrebávanie. Sú to napríklad iónová sila, osmolarita, povrchové napätie, viskozita, ale aj naplnenosť GIT spojenú s príjmom potravy. Boli preto navrhnuté biorelevantné disolučné média, u ktorých sú k zloženiu základných médií pridané taktiež zložky bežne sa nachádzajúce v GIT. K nim radíme umelú žalúdočnú šťavu na lačno a po jedle, umelú dvanástnikovú šťavu po jedle, umelú črevnú šťavu na lačno a po jedle a umelú tračníkovú šťavu na lačno a po jedle.^[35]

1.5.4. Vyhodnotenie disolučných profilov

Disolučné dáta sú využívané pri posudzovaní rýchlosti a mechanizmu uvoľnenia liečiva z liekovej formy. Možno použiť niekoľko matematických modelov, v ktorých je množstvo uvoľneného liečiva viazané na jednotku času. Zhoda zo špecifickým matematickým modelom je najčastejšie určená pomocou regresných funkcií. Môže sa stať, že je behom prvých 15 minút uvoľnených viac ako 85 % liečiva z liekovej formy. V takom prípade možno disolučné profily považovať za zhodné a to aj bez ďalšieho matematického hodnotenia.^[37]

Je známe veľké množstvo matematických modelov k popisu disolučných profilov, napríklad: kinetické, štatistické, empirické, alebo semiempirické. V experimentálnej časti tejto práce sú využité kinetické a semiempirické modely.

1.5.5. Matematické modely

1.5.5.1. Kinetický model I. rádu

Rýchlosť uvoľňovania pri kinetike I. rádu je typický závislosťou množstva liečiva v liekovej forme, ktoré v závislosti na čase vykazuje klesajúcu tendenciu. Rýchlosť uvoľňovania API s časom taktiež klesá. Najväčšie množstvo liečiva je uvoľňovaná ihneď po aplikácii. Všeobecne platí, že pre lieky s predĺženým uvoľňovaním, pri ktorých je potrebná stála plazmatická koncentrácia, je vhodnejšie k uvoľňovaniu použiť namiesto kinetiky I. rádu, kinetiku 0. rádu a pre liečiva používané pri akútnych stavoch je preferované uvoľňovanie kinetikou I. rádu. Kinetický model I. rádu je možné zapísať v nasledujúcom tvare:

$$M_t = M_\infty(1 - \exp(-k_1 t)) \quad (1)$$

kde M_t je množstvo účinnej látky uvoľnenej v čase t , M_∞ je maximum uvoľneného množstva účinnej látky z liekovej formy a k_1 je rýchlostnou konštantou I. rádu s rozmerom čas⁻¹.^[37]

1.5.5.2. Model Weibull

Tento model bol popísaný v roku 1951 Weibullom, ako všeobecný empirický model distribučnej funkcie. V roku 1972 bol Langenbucherom upravený pre popis disolučného profilu liečiva. Túto úpravu, v tvare pre kvantitatívnu analýzu disolučných dát, je možné vyjadriť rovnicou:

$$M_t = M_\infty(1 - \exp(-k_W t^\beta)) \quad (2)$$

V prípade, ak nastane oneskorené uvoľňovanie, prejaví sa „burst efekt“, alebo nastane rýchlejšie uvoľnenie liečiva na začiatku disolučného testu, ktoré je typické pre matricové tablety, je vhodnejšou možnosťou použitie rovnice v nasledujúcom tvare:

$$M_t = M_\infty(1 - \exp(-k_W(t - T_t)^\beta)) \quad (3)$$

kde M_t je množstvo uvoľnenej účinnej látky v čase t , M_∞ je maximum uvoľneného množstva účinnej látky z liekovej formy, k_W je konštanta s rozmerom čas^{-β} a T_t je oneskorenie v uvoľňovaní účinnej látky na začiatku disolučného testu, tzv. „lag time“ (čas oneskorenia).

Ak je hodnota parametru T_t záporná, ide o tzv. „burst efekt“. Parametrom β je charakterizovaný tvar exponenciálnej krivky. Ak $T_t = 0$ a zároveň $\beta = 1$, vykazuje model Weibull zhodu s kinetickým modelom I. rádu. Parameter T_t určuje začiatok uvoľňovania účinnej látky z liekovej formy. Z praktických dôvodov sa však „lag time“ zvyčajne vyhodnocuje ako čas, pri ktorom je uvoľnené množstvo liečiva podľa špecifikácie. Napríklad v Českom liekopise je pre liekové formy s oneskoreným uvoľňovaním uvedené, že je prípravok vyhovujúci, ak spĺňa podmienku o tom, že uvoľnené množstvo liečiva v priebehu disolučnej skúšky simulujúcej prechod žalúdkom, nepresiahne hodnotu 10 %.

Výhodou tohto modelu je fakt, že dosahuje dobrú zhodu s experimentálnymi dátami. Parameter β je možné použiť pri popise kvantitatívnych zmien disolučného profilu, napríklad v procese vývoja liekových foriem.^[37]

1.5.5.3. Model Korsmeyer-Peppas

Model bol odvodený v roku 1983 Kosmeyerom a spol. ako jednoduchý semi-empirický model:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} t^n \quad (4)$$

kde M_t je množstvo účinnej látky uvoľnenej v čase t , M_∞ maximum uvoľneného množstva účinnej látky z liekovej formy, k_{KP} konštanta s rozmerom čas⁻ⁿ, kde parameter n charakterizuje transportný mechanizmus a mechanizmus uvoľňovania liečiva z liekovej formy. Predchádzajúca rovnica je platná iba v prípade, že uvoľnené množstvo účinnej látky nepresiahne 60 %.

Pri zderivovaní rovnice (4) je získaný vzťah popisujúci rýchlosť uvoľňovania účinnej látky, z ktorého jasne vyplýva, že pre $n = 1$ je rýchlosť uvoľňovania nezávislá na čase a liečivo je teda uvoľňované kinetikou 0. rádu. Pre hodnoty $n = 0,5$ a $n = 1$ popisuje rovnica (4) dva fyzikálne úplne odlišné transportné mechanizmy. Pre $n = 0,5$ ide o uvoľňovanie liečiva mechanizmom „čistej“ difúzie a pre $n = 1$ ide o uvoľňovanie založené na bobtnaní a relaxácii reťazcov nosného polyméru. Pre hodnotu n v intervale (0,5; 1) je transportný mechanizmus indikovaný na základe superpozície oboch vyššie zmienených mechanizmov. Jedná sa o tzv. anomálny transport. Je potrebné brať do úvahy to, že uvedené limitné hodnoty exponentu n (0,5 a 1) platia iba v prípade, že ide o geometriu tenkej vrstvy.^[37]

2. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

2.1. Disolučný test

2.1.1. Laboratórne prístroje a pomôcky

- analytické váhy AA-200 – Denver Instrument Company, Colorado, USA
- homogenizátor Retsch MM 200 – Retsch GmbH, Haan, Nemecko
- ručný lis H-62 – TRYSTOM spol. s r.o., Olomouc, Česká republika
- disolučná aparatúra SOTAX AT 7 Smart – SOTAX Pharmaceutical Testing s.r.o., Allschwil, Švajčiarsko
- Agilent 8453 UV/VIS spektrometer – Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Nemecko
- kyveta 5 mm
- bežné laboratórne sklo a pomôcky

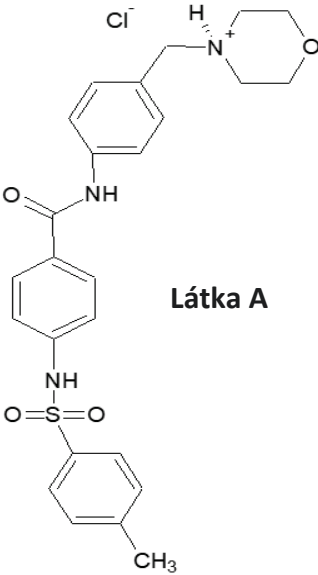
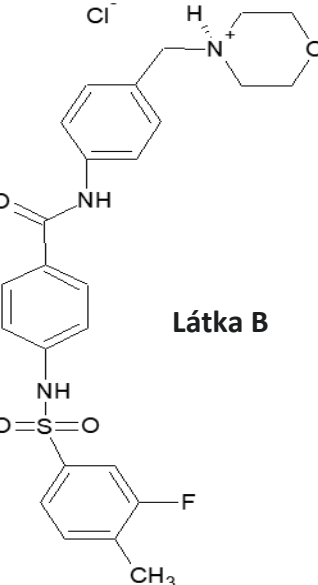
2.1.2. Použité chemikálie a roztoky

- Kyselina chlorovodíková –Penta s.r.o., Praha, ČR, p.a. čistota
- Chlorid sodný –LachNer s.r.o., Neratovice, ČR, p.a. čistota
- Dihydrogenfosforečnan draselný – LachNer s.r.o., Neratovice, ČR, p.a. čistota
- Hydroxid sodný – Penta s.r.o., Praha, ČR, p.a. čistota
- Prosolv® SMCC 90 – JPS PHARMA GMBH & CO. KG Rosenberg, Nemecko
- Stearát horečnatý – Acros Organics, USA
- Hypromelosa K4M – Sigma-Aldrich, USA
- Destilovaná a redestilovaná voda

2.1.3. Zloženie, homogenizácia a lisovanie tabliet

Pre správne prevedenie disolučného testu je liekopisom predpísaných vždy 6 tabliet obsahujúcich API (jednotkových liekových foriem skúšaného prípravku) a k tomu 1 tableta neobsahujúca API, takzvaný slepý pokus, alebo blank.^[33] Táto bakalárska práca bola zameraná na štúdium matricových tabliet hydrofilného charakteru. Ich zloženie je zapísané v **tabuľke 2**. Ako aktívne látky boli použité dva sulfónamidy vo forme hydrochloridov (**látka A a B v tabuľke 1**), ktoré boli pripravené Ing. Marií Nevyhoštěnou na ÚOChT FChT

Univerzity Pardubice^[38]. Tieto látky boli vybrané na základe ich biologickej aktivity uvedenej v **tabuľke 1**. Biologická aktivita bola stanovená na KBBV FChT Univerzity Pardubice.

	Molekulová hmotnosť [g/mol]	AChE IC50 [μM]	BChE IC50 [μM]
4-(4-(4-((4-methylfenyl)sulfonamido)benzamido)benzyl)morfolin-4-ium chlorid			
 <p>Látka A</p>	502,03	7,95 ± 0,43	30,17 ± 1,17
4-(4-(4-((4-methyl-3-fluor-fenyl)sulfonamido)benzamido)benzyl)morfolin-4-ium chlorid			
 <p>Látka B</p>	520,02	7,35 ± 0,01	47,34 ± 0,71

Tabuľka 1: Hodnoty molekulových hmotností a biologických aktivít pre testované sulfónamidy

Hydrofilná matrica	%	mg
Prosolv	39	195
Aktívna látka	20	100
Hypromelosa K4M	40	200
Stearát horečnatý	1	5

Tabuľka 2: zloženie tabliet v hm. % a mg zložky na celkovú hmotnosť tablety (500 mg)

Jedná tableta dosahovala hmotnosť 500 mg \pm 5 mg. V tablete blank bolo celé množstvo aktívnej látky nahradené zmesovým suchým spojivom Prosolv® SMCC 90. Všetky zložky nachádzajúce sa v tabletách boli navážené na analytických váhach a kvantitatívne prevedené do homogenizačnej patróny, ktorá bola následne vložená do homogenizátoru. Zmes zložiek liečiva bola trepaná po dobu 1 minúty trikrát pri intenzite 10, 13 a 15 kmitov za sekundu. Zhomogenizovaná zmes bola v nasledujúcom kroku prevedená do ručnej lisovacej jednotky s priemerom 13 mm, kde bola pri tlaku 8 kN lisovaná do konečnej podoby tabliet (**obrázok 4**) po dobu 5 minút. Tablety boli v tomto stave pripravené k použitiu pri disolučných testoch.



Obrázok 4: Nalisované tablety pripravené k disolučnému testu (4 s API + 1 blank)

2.1.4. Príprava disolučných médií

V priebehu disolučných testov sa používali disolučné média s hodnotami pH 1,2; 4,5 a 6,8. Tieto hodnoty mali simulovať hodnoty pH v jednotlivých častiach tráviaceho traktu, konkrétne v žalúdku (pH 1,2), v dvanástniku (pH 4,5) a v hrubom čreve (pH 6,8). Každé disolučné médium bolo pripravené v súlade s Českým liekopisom.^[33]

2.1.4.1. Disolučné médium s pH 1,2

K príprave disolučného média s hodnotou pH 1,2, nachádzajúceho sa v žalúdku, bola použitá dvojlitrová odmerná banka. Do nej bolo kvantitatívne prevedené 500 ml 0,2M roztoku chloridu sodného a 850 ml 0,2M roztoku kyseliny chlorovodíkovej. Tento roztok bol doplnený redestilovanou vodou na celkový objem 2 litre.

2.1.4.2. Disolučné médium s pH 4,5

K príprave disolučného média s hodnotou pH 4,5, nachádzajúceho sa v dvanástniku, bola použitá dvojlitrová odmerná banka. Bolo navážených 27,22 g dihydrogenfosforečnanu draselného a kvantitatívne rozpustené v 1500 redestilovanej vody. Podľa potreby bolo možné upraviť pH hydroxidom sodným s koncentráciou 0,1 mol/l. Tento roztok bol doplnený redestilovanou vodou na celkový objem 2 litre.

2.1.4.3. Disolučné médium s pH 6,8

K príprave disolučného média s hodnotou pH 6,8, nachádzajúceho sa v tenkom čreve, bola použitá dvojlitrová odmerná banka. Do nej bolo kvantitatívne prevedených 500 ml 0,2 M roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného a 224 ml 0,2 M roztoku hydroxidu sodného. Tento roztok bol doplnený redestilovanou vodou na celkový objem 2 litre.

2.1.5. Priebeh disolučnej skúšky

S nalisovanými tabletami s dvomi liečivami (*látka A*, *látka B*) bola vykonaná séria disolučných testov. Tieto testy boli zrealizované podľa podmienok uvedených v Českom liekopise^[33] v pádielkovom usporiadaní. Aparatúra použitá na vykonanie disolučného testu je zobrazená na **obrázku 5**.

Do jednotlivých nádob bolo vždy odmeraných 900 ml vybraného disolučného média a tie boli umiestnené do disolučnej aparatury. Disolučná skúška prebiehala pri pH 1,2; 4,5; alebo 6,8 vždy 24 hodín v určitom disolučnom médiu. Táto doba bola vybraná kvôli neznámemu správaniu sulfónamidov. Teplota vodného kúpeľa bola udržiavaná na hodnote $37 \pm 0,5$ °C počas celého priebehu testu, v súlade s požiadavkami liekopisu. Frekvencia miešania bola 100 rpm.



Obrázok 5: Disolučná aparatura SOTAX AT 7 smart

2.1.6. UV/VIS spektrometria

Z odobraných vzoriek v rôznych časových intervaloch prebiehajúceho disolučného testu, bolo pomocou UV/VIS spektrometrie stanovované množstvo uvoľneného liečiva. Bola meraná absorbanca pri absorpčnom maxime danej látky v danom pH pri trojbodovej korekcií pozadia. Hodnoty absorbancie boli porovnávané proti hodnote absorbancie tablety blank. Získané absorbancie pre dané liečivo v danom disolučnom médiu boli prepočítané na percentá uvoľnenej účinnej látky, pomocou metódy kalibračnej krivky. Percentá, predstavujúce koncentráciu, boli vynesené do grafu v závislosti na čase a bol získaný disolučný profil liečiva. Profily boli pomocou matematických modelov uvedených v kapitole 1.5.5. kvantitatívne vyhodnotené.

2.1.7. Príprava kalibračných roztokov

Boli pripravené zásobné roztoky obsahujúce účinné látky skúmaných liečiv (**látky A a B**) s koncentráciou 0,1 mol/l. 10 mg danej látky bolo navážených na analytických váhach a kvantitatívne prevedených do 100 ml odmernej banky. Liečiva boli následne rozpustené v disolučných médiách s hodnotou pH 1,2; 4,5 a 6,8 a doplnené na celkový objem 100 ml.

Kalibračná rada bola pripravená tzv. dvojkovým riedením. Z koncentrovanejšieho roztoku boli vždy odobrané 3 ml a doplnené 3 ml disolučného média s určitým pH. Rada obsahovala 5 roztokov, vždy s polovičnou koncentráciou účinnej látky.

2.1.8. Kalibračná krivka

Na premeranie kalibračnej rady bola použitá 5 mm kvjeta. Závislosť absorbancie na koncentrácií liečiva bola vynesená do grafu (viď prílohy) a metódou lineárnej regresie získane regresné rovnice uvedené v **tabuľke 3**.

	Látka 1	Látka 2
pH 1,2	$A = 0,0081c + 0,004$	$A = 0,0087c - 0,0015$
pH 4,5	$A = 0,0132c - 0,0031$	$A = 0,0158c + 0,0015$
pH 6,8	$A = 0,0004c + 0,0043$	$A = 0,0011c - 0,0008$

Tabuľka 3: rovnice lineárnej závislosti látky A a B v jednotlivých disolučných médiách

Tieto rovnice boli ďalej použité pri prepočtoch absorbancie na koncentráciu a percentá uvoľneného liečiva.

2.2. Výsledky a diskusia

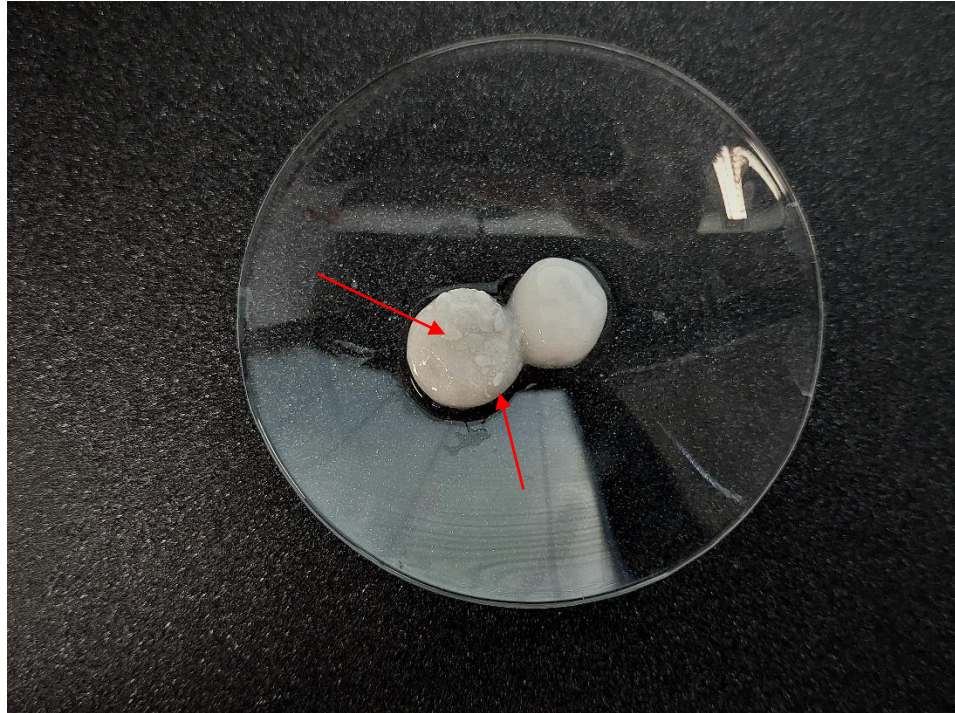
Predmetom tejto práce bolo štúdium matricových tabliet hydrofilného charakteru, ktoré obsahovali dva rôzne sulfónamidy vo forme hydrochloridov ako účinné látky (**tabuľka 1**). Sulfónamidy boli vybrané na základe ich biologických aktivít a pripravené Ing. Marií Nevyhoštěnou z ÚOChT FChT Univerzity Pardubice. Disolučné skúšky prebiehali v súlade s podmienkami uvedenými v Českom liekopise^[37] v pádielkovom usporiadaní a boli pri nich

použité disolučné média s hodnotami pH 1,2; 4,5 a 6,8, simulujúce prostredie v rôznych častiach tráviaceho traktu. Množstvo liečiva uvoľneného z tabliet bolo následne stanovené UV/VIS spektrometriou, pomocou ktorej boli získané hodnoty absorbančie pre jednotlivé vzorky. Absorbancie boli prepočítané na percentá uvoľnenej účinnej látky metódou kalibračnej krivky. Do grafov bola vynesená závislosť percent uvoľnenej látky na čase a získané disolučné profily liečiv boli následne kvantitatívne vyhodnocované vhodnými matematickými modelmi.

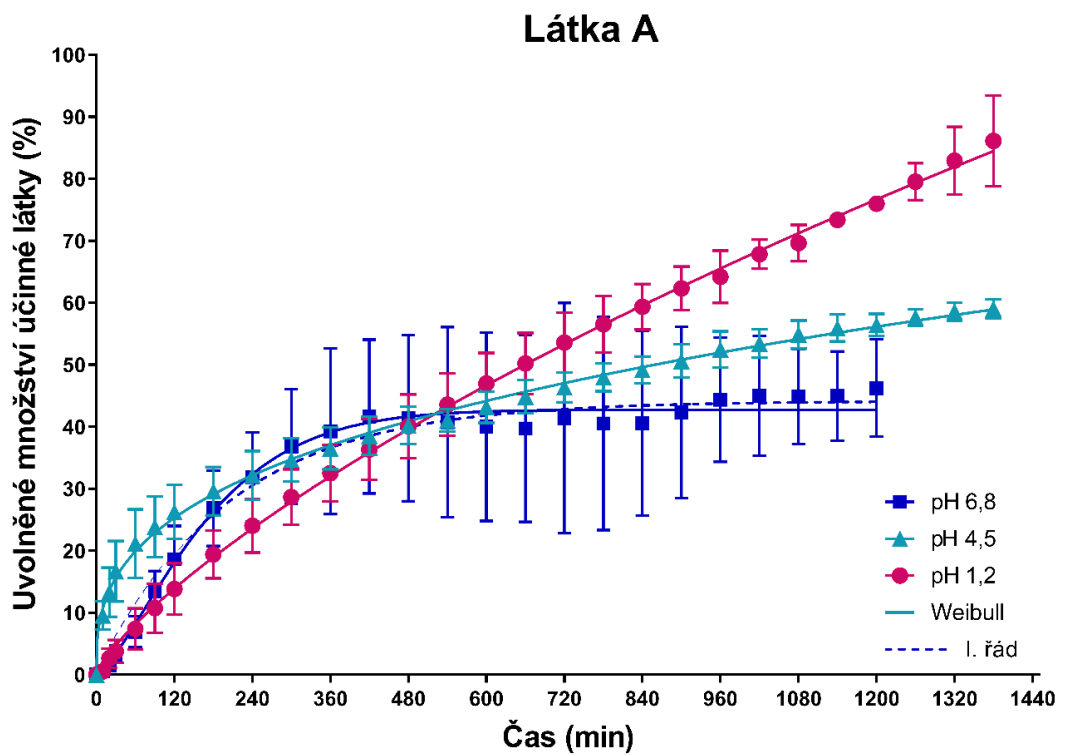
2.2.1. Disolučné profily

Grafy 1 až 4 zobrazujú disolučné profily **látky A** a **látky B**. Kvantitatívne vyhodnotenie profilov bolo realizované pomocou programu GraphPad Prism metódou nelineárnej regresnej analýzy. K tomuto vyhodnoteniu boli využité metódy Weibull a kinetický model I. rádu. Kinetické parametre získané pri analýze disolučných profilov sú uvedené v **tabuľke 4 až 7**.

Je potreba zdôrazniť, že u hydrofilných matríc dochádza k bobtnaniu v dôsledku nasatia disolučného média. Toto bobtnanie má za následok rozvoľnenie polymérnych reťazcov v matrici a uvoľňovanie účinnej látky z tablety na základe princípu difúzie. Počas bobtnania sa vytvára gél a nastáva tzv. gelovatenie tablety. Do gélu sa následne difúziou dostáva účinná látka z jadra tablety. Po čase sa gél začína postupne omývať spoločne s účinnou látkou rozpustenou v tejto vrstve. Tento proces je nasledovaný tvorbou novej gélovej vrstvy a prebieha kontinuálne. V prípade, ak je liečivo málo rozpustné v danom disolučnom médiu, môže dochádzať k zadržovaniu účinnej látky v jadre tablety. Na **obrázku 6** sú zobrazené tablety po ukončení disolučného testu pri pH 6,8. Tableta naľavo obsahovala **látku A** a tableta napravo **látku B**. V tablete naľavo môžeme v porovnaní s tabletou naľavo pozorovať nerozpustené kúsky účinnej látky. Ako vyplýva z **grafov 1 a 2**, tableta obsahujúca **látku B** v médiu s pH 6,8 bola rozpustená zo 100 %, zatiaľ čo tableta s **látkou A** iba zo 40 %.



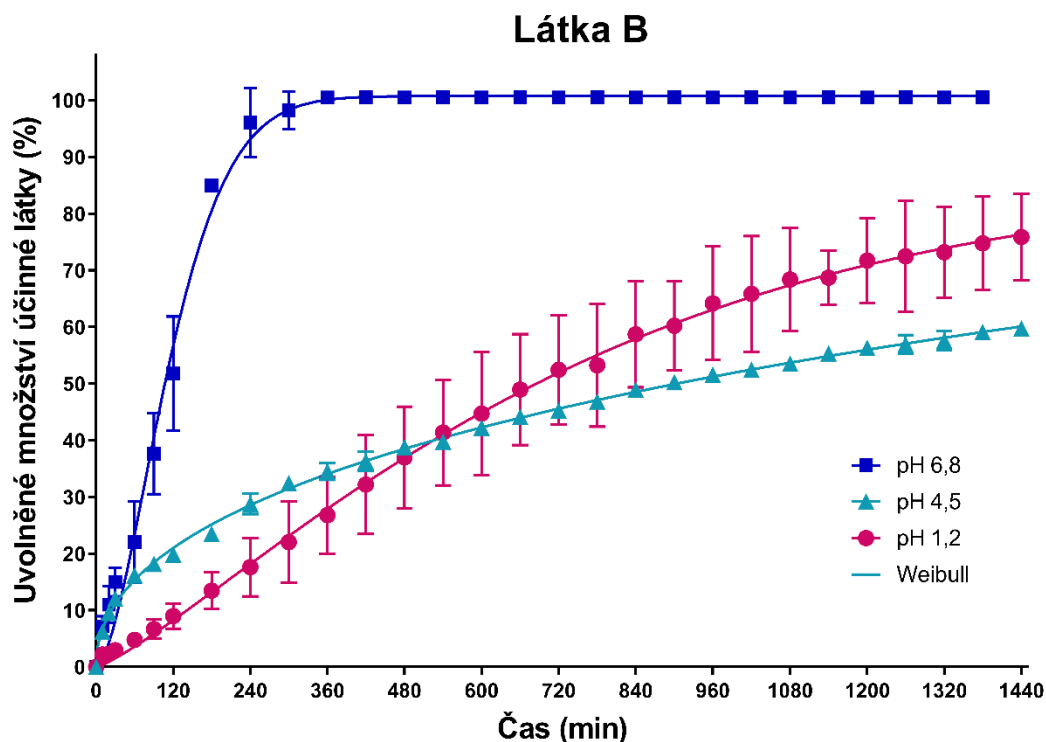
Obrázok 6: Tablety s látkou A (vľavo) a B (vpravo) v médiu o pH 6,8 po disolučnej skúške



Graf 1: Disolučné profily látky A v pH 1,2; 4,5 a 6,8 preložené modelom Weibull a kinetickým modelom I. rádu

V **grafe 1** sú zobrazené disolučné profily **látky A** v disolučných médiách s hodnotami pH 1,2; 4,5 a 6,8. V závislosti na hodnotách v **tabuľke 4 a 5** možno konštatovať, že hodnoty koeficientu R^2 boli pre profily s pH 4,5 a 6,8 vyššie pre Weibull model, avšak pri profile v pH 6,8 je po preložení model Weibull takmer zhodný s kinetickým modelom I. rádu (vid'. **Graf 1**). U profilu pri pH 1,2 je hodnota koeficientu R^2 uvedená v **tabuľkách 4 a 5** nepatrne vyššia u kinetického modelu I. rádu, po grafickom preložení je však model Weibull pre tento profil vhodnejší (vid'. **graf 1**).

V priebehu disolučnej skúšky sa najrýchlejšie uvoľňovala účinná látka pri pH 1,2, teda v prostredí, simulujúcom zloženie žalúdočných štiav. Na konci disolučného testu, teda po 24 hodinách, bolo z tablety uvoľnených takmer 90 % účinnej látky. U tablety v disolučnom médiu s pH 6,8 z **grafu 1** vyplýva, že približne počas prvých piatich hodín disolučného testu došlo k výraznému uvoľňovaniu účinnej látky, kedy sa uvoľnilo takmer 40 %, po uplynutí tohto času sa však látka prestala uvoľňovať, a tak na konci disolučného testu bolo uvoľnených len približne 40 %, čo je v porovnaní s profilmi v pH 1,2 a 4,8 najnižšia hodnota. U disolučného profilu o pH 6,8, možno taktiež pozorovať široké smerodatné odchýlky, čo je pravdepodobne spôsobené nedostatočným rozpustením **látky A** v kalibračných roztokoch. Z tohto dôvodu nie je možné v plnej miere aplikovať Lambert-Beerov zákon popisujúci vzťah medzi absorbanciou, koncentráciou absorbujúcej látky a dĺžkou dráhy svetla. Tento zákon je aplikovateľný iba pri čírych roztokoch bez nerozpustených častíc.

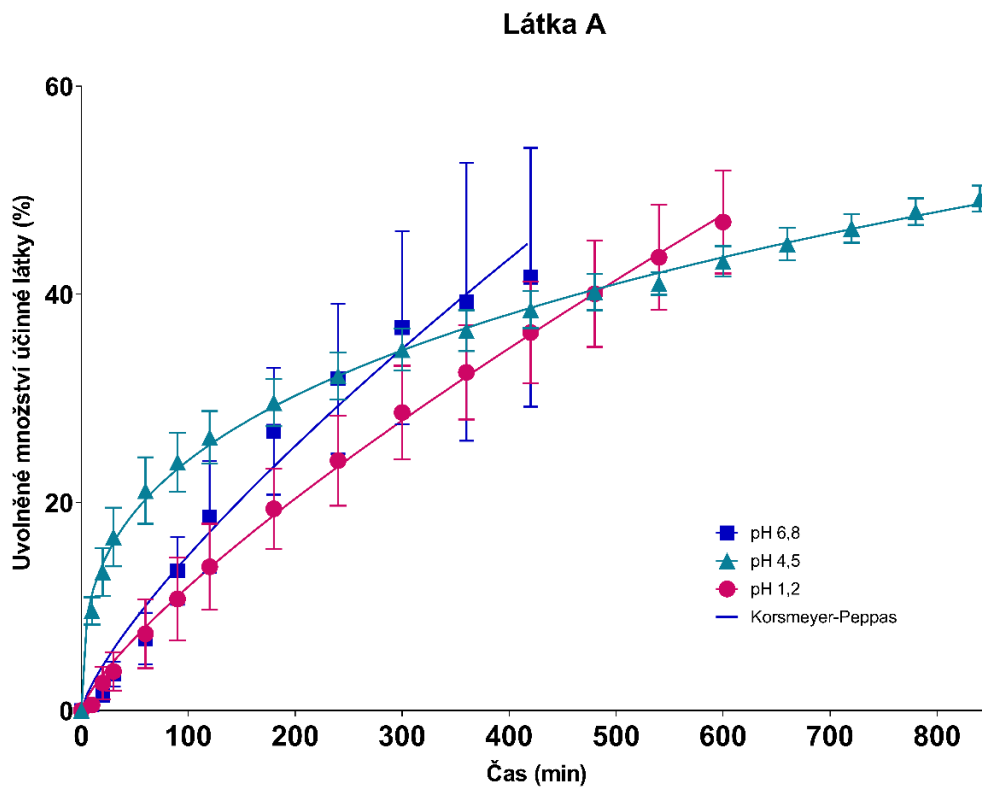


Graf 2: Disolučné profily látky B v pH 1,2; 4,5 a 6,8 preložené modelom Weibull a kinetickým modelom I. rádu

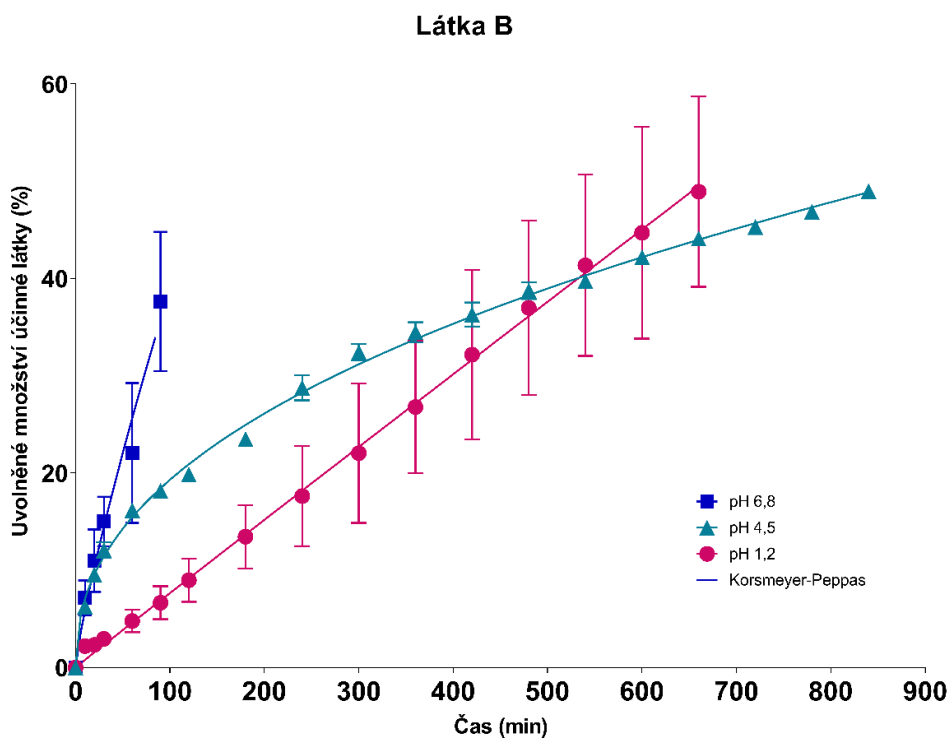
V **grafe 2** sú zobrazené disolučné profily **látky B** v disolučných médiách s hodnotami pH 1,2; 4,5 a 6,8. V závislosti na hodnotách obsiahnutých v **tabuľkách 6 a 7** je zrejmé, že hodnoty koeficientu R^2 sú pre všetky tri profily vyššie pri modeli Weibull, v porovnaní s kinetickým modelom I. rádu. Tomu odpovedajú aj údaje preložené v **grafe 2**, kde sa pri všetkých profiloch ukázal model Weibull ako vhodnejší.

V priebehu disolučnej skúšky, bola **látka B** vylučovaná najrýchlejšie v disolučnom médiu s pH 6,8, ktoré simuluje prostredie v hrubom čreve. Na začiatku disolučného testu sa látka začala uvoľňovať pomerne rýchlo a už po približne piatich hodinách bolo uvoľnených 100 % účinnej látky. To je v porovnaní s profilom **látky A** pri rovnakom pH značný rozdiel, keďže v tomto prípade bolo na konci disolučného testu uvoľnených iba 40 % účinnej látky (viď. **graf 1**). **Látka B** sa najmenej uvoľnila v disolučnom médiu s pH 4,5. Na konci disolučného testu, teda po 24 hodinách, bolo z tablety uvoľnených približne 50 % látky.

U oboch liečiv bol študovaný mechanizmus uvoľňovania z tablety pomocou modelu Korsmeyer-Peppas. Získané kinetické parametre sú uvedené v **tabuľkách 8 a 9**.



Graf 3: Disolučné profily látky A v pH 1,2; 4,5 a 6,8 preložené modelom Korsmeyer-Peppas



Graf 4: Disolučné profily látky B v pH 1,2; 4,5 a 6,8 preložené modelom Korsmeyer-Peppas

2.2.2. Regresná analýza disolučných profilov

Nasledujúce tabuľky zobrazujú zhrnuté výsledky vyhodnotenia nameraných dát za použitia matematických modelov (I. rád, model Weibull a Korsmeyer-Peppas). V tabuľkách sú uvedené údaje odpovedajúce parametrom príslušného matematického modelu, absolútna suma štvorcov (ASS) a koeficient determinácie (R^2).

Látka A	I. rád: $M_t = M_\infty(1 - \exp(-k_1 t))$			
	$k_1 \pm SD [min^{-1}]$	$M_\infty \pm SD [\%]$	ASS	R^2
pH 1,2	0,0008 ± 0,0002	121,6 ± 18,5	581,8	0,9862
pH 4,5	0,0038 ± 0,0010	54,67 ± 2,99	2805	0,8734
pH 6,8	0,0049 ± 0,0021	44,14 ± 4,29	3069	0,8080

Tabuľka 4: Vyhodnotenie disolučných profilov látky A pomocou kinetického modelu I. rádu

Látka B	I. rád: $M_t = M_\infty(1 - \exp(-k_1 t))$			
	$k_1 \pm SD [min^{-1}]$	$M_\infty \pm SD [\%]$	ASS	R^2
pH 1,2	0,0008 ± 0,0003	111,3 ± 29,06	1761	0,9589
pH 4,5	0,0026 ± 0,0004	57,24 ± 2,92	750,1	0,9578
pH 6,8	0,0072 ± 0,0007	102,2 ± 2,2	1871	0,9732

Tabuľka 5: Vyhodnotenie disolučných profilov látky B pomocou kinetického modelu I. rádu

<i>Weibull model: $M_t = M_\infty(1 - \exp(-k_W t^\beta))$</i>				
<i>Látka A</i>	<i>$M_\infty \pm SD$ [%]</i>	<i>$\beta \pm SD$</i>	<i>ASS</i>	<i>R²</i>
<i>pH 1,2</i>	86,02 ± 8,167	1,06 ± 0,07	693,3	0,9835
<i>pH 4,5</i>	174,7 ± 45,4	0,44 ± 0,03	651,2	0,9706
<i>pH 6,8</i>	100,7 ± 0,6	1,36 ± 0,31	2972	0,8140

Tabuľka 6: Vyhodnotenie disolučných profilov látky A pomocou modelu Weibull

<i>Weibull model: $M_t = M_\infty(1 - \exp(-k_W t^\beta))$</i>				
<i>Látka B</i>	<i>$k_W \pm SD$ [min^{-β}]</i>	<i>$\beta \pm SD$</i>	<i>ASS</i>	<i>R²</i>
<i>pH 1,2</i>	0,0003 ± 0,0002	1,24 ± 0,13	1663	0,9612
<i>pH 4,5</i>	0,0129 ± 0,0025	0,48 ± 0,02	49,22	0,9972
<i>pH 6,8</i>	0,0003 ± 0,0001	1,64 ± 0,08	653,6	0,9907

Tabuľka 7: Vyhodnotenie disolučných profilov látky B pomocou modelu Weibull

<i>Korsmeyer-Peppas: $\frac{M_t}{M_\infty} = k_{PT} t^n$</i>				
<i>Látka A</i>	<i>$n \pm SD$</i>	<i>ASS</i>	<i>R²</i>	
<i>pH 1,2</i>	0,77 ± 0,04	236,9	0,9699	
<i>pH 4,5</i>	0,33 ± 0,01	470,1	0,9581	
<i>pH 6,8</i>	0,77 ± 0,10	685,8	0,8918	

Tabuľka 8: Vyhodnotenie disolučného profilu látky A pomocou modelu Korsmeyer-Peppas

<i>Látka B</i>	Korsmeyer-Peppas: $\frac{Mt}{M_\infty} = k_{PT}t^n$		
	$n \pm SD$	ASS	R^2
<i>pH 1,2</i>	0,99 ± 0,09	615,0	0,9307
<i>pH 4,5</i>	0,44 ± 0,01	37,02	0,9955
<i>pH 6,8</i>	0,83 ± 0,11	159,9	0,9050

Tabuľka 9: Vyhodnotenie disolučného profilu látky B pomocou modelu Korsmeyer-Peppas

Parameter n u matematického modelu Korsmeyer-Peppas určuje mechanizmus uvoľňovania účinnej látky z tablety (**tabuľky 8 a 9**).

Látka A bola v disolučnom médiu o pH 1,2 uvoľňovaná tzv. anomálnym transportom, teda kombináciou difúzie a iných druhov transportu. V disolučnom médiu o pH 4,5 dochádza k uvoľňovaniu „čistou“ difúziou a v pH 6,8, rovnako ako v prvom prípade je liečivo uvoľňované anomálnym transportom kombinujúcim difúziu a iné deje.

U **látky B** je v disolučnom médiu o pH 1,2 hodnota parametru n takmer rovná 1, čo znamená, že látka bola uvoľňovaná kinetikou 0. rádu. V médiu o pH 4,5 dochádza k uvoľňovaniu mechanizmom „čistej“ difúzie a v pH 6,8 sa uplatňuje mechanizmus tzv. anomálneho transportu a kombinuje sa teda difúzia a iné transportné mechanizmy.

ZÁVER

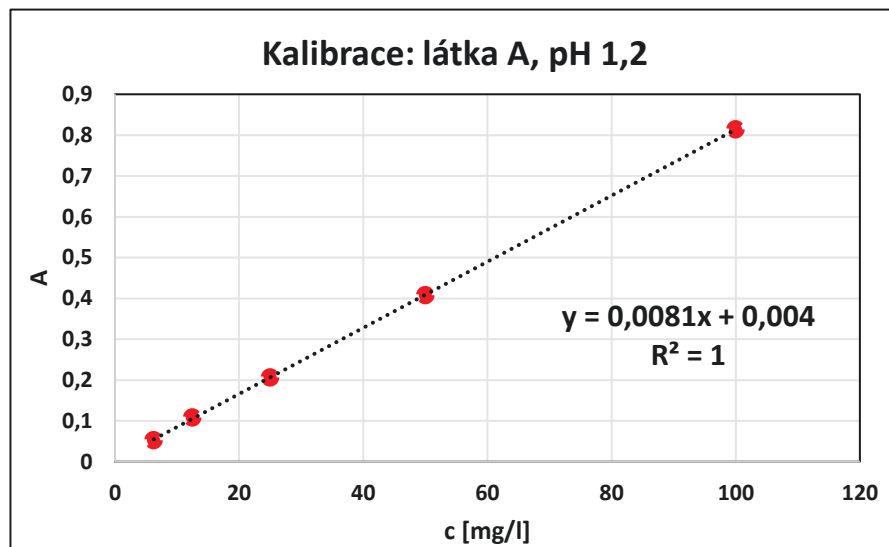
Táto bakalárska práca je zameraná na výskum nových potenciálnych prístupov v liečbe Alzheimerovej choroby, prípravu pevných liekových foriem a ich testovanie.

Teoretická časť sa venuje prehľadu niektorých farmakoterapeutických prístupov používaných pri symptomatickej liečbe, založených na možných príčinách vzniku ochorenia a doplnená informáciami o nových potenciálnych liečivách. Posledná kapitola teoretickej časti sa zaoberá popisom disolučnej skúšky pevných liekových foriem a taktiež obsahuje popis matematických modelov, použitých pri kvantitatívnom vyhodnocovaní disolučných profilov nachádzajúcich sa v práci.

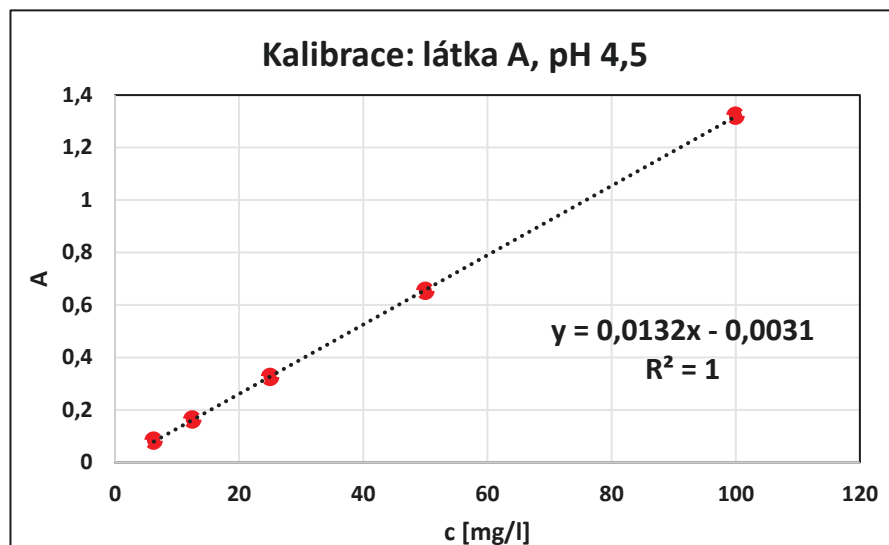
Experimentálna časť je venovaná testovaniu matricových tabliet obsahujúcich novo syntetizované liečiva (**látky A a B**) ako účinné látky, radiace sa do skupiny sulfónamidov. Tieto matricové tablety hydrofilného charakteru boli podrobené disolučnému testu v disolučných médiách s hodnotami pH 1,2; 4,5 a 6,8, ktoré simulujú prostredie v rôznych častiach tráviaceho traktu, konkrétne žalúdka, dvanástniku a tračníku. Bol študovaný vplyv pH. Bolo zistené, že hodnota pH má vplyv na uvoľňovanie látok z liekovej formy. Jednotlivé vzorky boli preložené vhodnými matematickými modelmi (I. rád, model Weibull a Korsmeyer-Peppas). Parametre získané matematickými metódami sú uvedené v tabuľkách a preložené v grafoch.

Záverom možno konštatovať že disolučné profily testovaných sulfónamidov vykazovali priaznivé výsledky a sú preto určené na ďalšie testovanie ako potenciálne liečiva na Alzheimerovú chorobu.

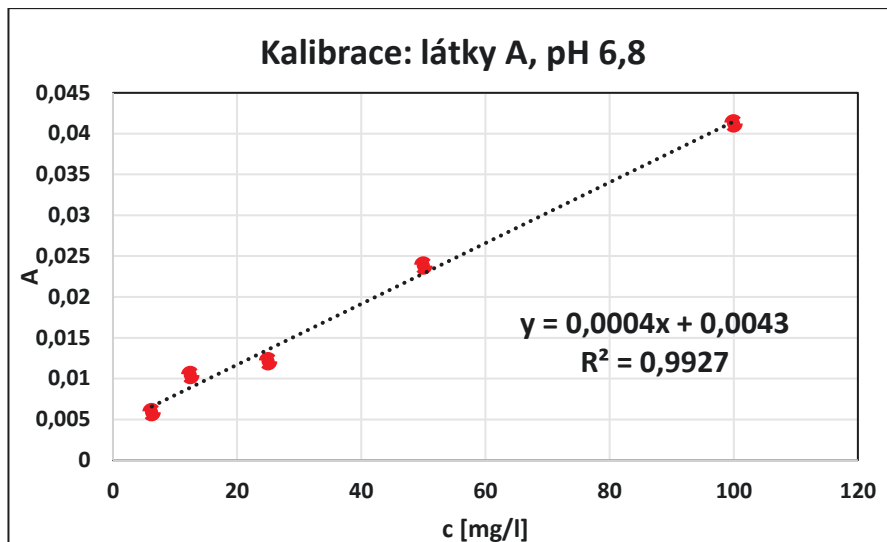
PRÍLOHY



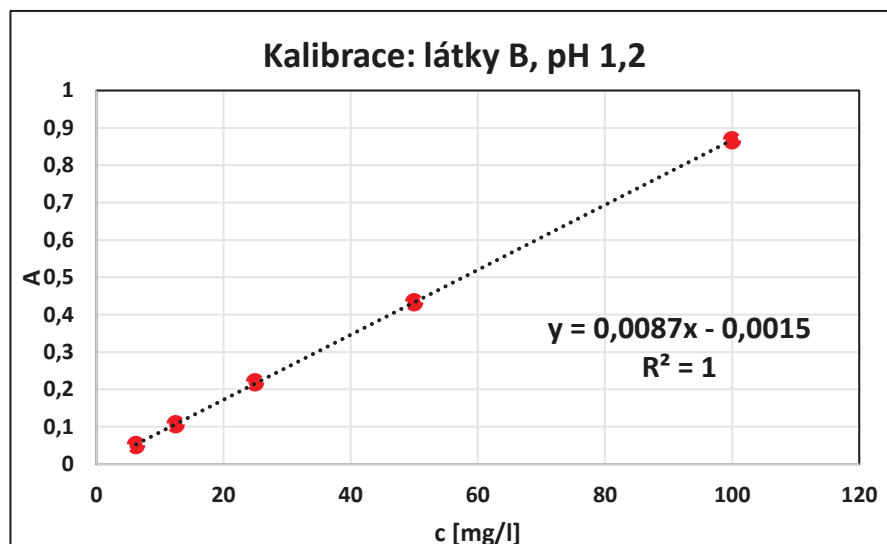
Príloha 1: Kalibračná krivka látky A v disolučnom médiu s pH 1,2



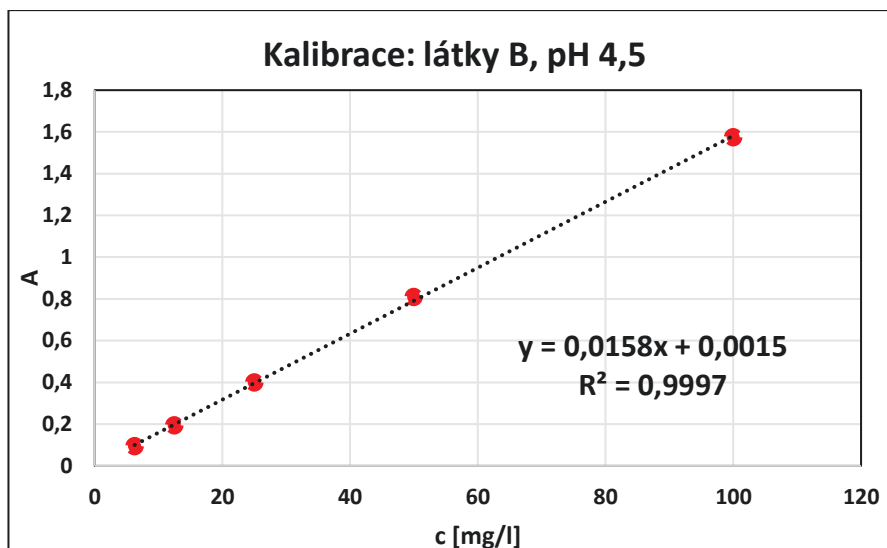
Príloha 2: Kalibračná krivka látky A v disolučnom médiu s pH 4,5



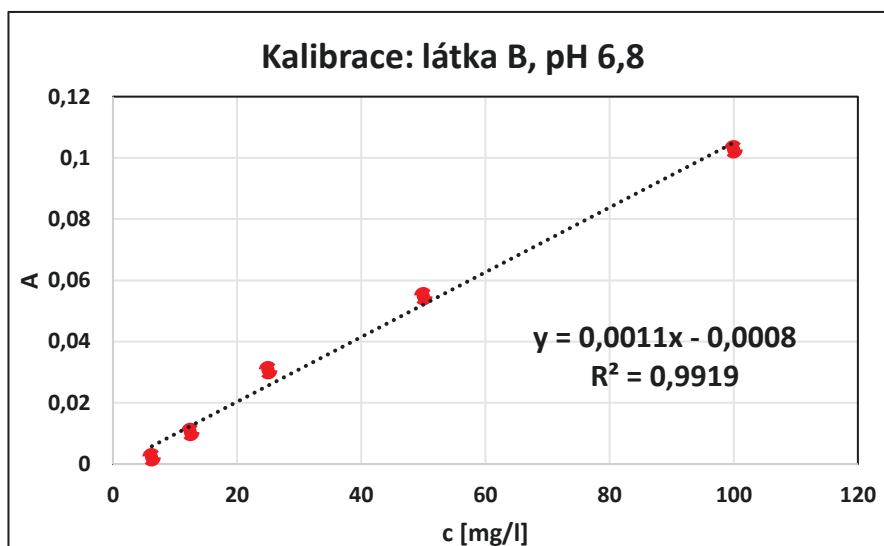
Príloha 3: Kalibračná krivka látky A v disolučnom médiu s pH 6,8



Príloha 4: Kalibračná krivka látky B v disolučnom médiu s pH 1,2



Príloha 5: Kalibračná krivka látky B v disolučnom médiu s pH 4,5



Príloha 6: Kalibračná krivka látky B v disolučnom médiu s pH 6,8

POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] ZVĚŘOVÁ, Martina. Clinical aspects of Alzheimer's disease. *Clinical Biochemistry*. 2019. 72, 3-6.
- [2] GHAZAL, Taher M., ABBAS, Sagheer, MUNIR, Sundus, KHAN, M. A., AHMAD, Munir, ISSA, Ghassan F., ZAHRA, Syeda Binish, KHAN, Muhammad Adnan, HASAN, Mohammad Kamrul. Alzheimer Disease Detection Empowered with Transfer Learning. *Computers, Materials & Continua*. 2022. 70 (3), 5005-5019.
- [3] LOPEZ SORIA, Jose A., GONZÁLEZ, Hector M., LÉGER, Gabriel C. Chapter 13 - Alzheimer's disease. *Handbook of Clinical Neurology*. 2019. 169, 231-255.
- [4] KAVITHA, C., MANI, Vinodhini, SRIVIDHYA, S. R., KHALAF, Osamah Ibrahim, ROMERO, Carlos Andrés Tavera. Early-Stage Alzheimer's Disease Prediction Using Machine Learning Models. *Front. Public Health*. 2022. 10, 853294.
- [5] MARUCCI, Gabriella, BUCCIONI, Michela, DAL BEN, Diego, LAMBERTUCCI, Catia, VOLPINI, Rosaria, AMENTA, Francesco. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*. **2021**. 190, 108352.
- [6] KLINKENBERG, Inge, SAMBETH, Anke, BLOKLAND, Arjan. Acetylcholine and attention. *Behavioural Brain Research*. **2011**. 221 (2), 430-442.
- [7] SAGHIR, Shakil Ahmed , ANSARI, Rais A., MUNIR Syeda Tahira. Fate of chemicals following exposure III: Metabolism (biotransformation). *Reference Module in Biomedical Sciences*. **2022**.
- [8] GIACOBINI, Ezio. Cholinergic foundations of Alzheimer's disease therapyFondement cholinergique du traitement de la maladie d'Alzheimer. *Journal of Physiology-Paris*. **1998**. 92 (3-4), 283-287.
- [9] AMENTA, Francescoa, CAROTENUTO, Annaa, FASANARO, Angiola Mariab, REA, Raffaelea, TRAINI, Eneaa. The ASCOMALVA (Association between the Cholinesterase Inhibitor Donepezil and the Cholinergic Precursor Choline Alphoscerate in Alzheimer's Disease) Trial: Interim Results after Two Years of Treatment. *Journal of Alzheimer's Disease*. **2014**. 42 (3), 281-288.
- [10] TAHA, Muhammad, ALSHAMRANI, Foziah J., RAHIM, Fazal, ANOUAR, El Hassane, UDDIN, Nizam, CHIGURUPATI, Sridevi, ALMANDIL, Noor Barak, FAROOQ, Rai Khalid, IQBAL, Naveed, ALDUBAYAN, Maha, VENUGOPAL, Vijayan, KHAN, Khalid Mohammed. "Synthesis,

characterization, biological evaluation, and kinetic study of indole base sulfonamide derivatives as acetylcholinesterase inhibitors in search of potent anti-Alzheimer agent." ("Synthesis of indole derivatives as Alzheimer inhibitors and their ...") *Journal of King Saud University – Science*. **2021**. 33 (3), 101401.

- [11] MAKHAEVA, Galina F., LUSHCHEKINA, Sofya V., KOVALEVA, Nadezhda V., ASTAKHOVA, Tatiana Yu., BOLTNEVA, Natalia P., RUDAKOVA, Elena V., SEREBRYAKOVA, Olga G., PROSHIN, Alexey N., SERKOV, Igor V., TROFIMOVA, Tatiana P., TAFEENKO, Victor A., RADCHENKO, Eugene V., PALYULIN, Vladimir A., FISENKO, Vladimir P., KORÁBEČNÝ, Jan, SOUKUP, Ondrej, RICHARDSON, Rudy J. Amiridine-piperazine hybrids as cholinesterase inhibitors and potential multitarget agents for Alzheimer's disease treatment. *Bioorganic Chemistry*. **2021**. 112, 104974.
- [12] MAKHAEVA, Galina F., KOVALEVA, Nadezhda V., BOLTNEVA, Natalia P., RUDAKOVA, Elena V., LUSHCHEKINA, Sofya V., ASTAKHOVA, Tatiana Yu., SERKOV, Igor V., PROSHIN, Alexey N., RADCHENKO, Eugene V., PALYULIN, Vladimir A., KORABECNY, Jan, SOUKUP, Ondrej, BACHURIN, Sergey O., RICHARDSON, Rudy J. Bis-Amiridines as Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors: N-Functionalization Determines the Multitarget Anti-Alzheimer's Activity Profile. *Molecules*. **2022**. 27 (3), 1060.
- [13] AMANI, Mohammad, ZOLGHADRNASAB, Maryam, SALARI, Ali-Akbar. NMDA receptor in the hippocampus alters neurobehavioral phenotypes through inflammatory cytokines in rats with sporadic Alzheimer-like disease. *Physiology & Behavior*. **2019**. 202, 52-61.
- [14] WANG, Rui, REDDY, Hemachandra P. Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. **2017**. 57 (4), 1041-1048.
- [15] RÉUS, Gislaine Z., MENDES, Abelaira Helena, TUON, Talita, TITUS, Stephanie E., IGNÁCIO, Zuleide Maria, RODRIGUES, Ana Lúcia S., QUEVEDO, Joao. Glutamatergic NMDA Receptor as Therapeutic Target for Depression. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. **2015**. 103, 169-202.
- [16] COMPANYS-ALEMANY, Júlia, TURCU, Andreea L., BELLVER-SANCHIS, Aina, LOZA, HYPERLINK, Maria I., BREA, José M., CANUDAS, Anna M., LEIVA, Rosana, VÁZQUEZ, HYPERLINK, Santiago, PALLÀS, Mercè, GRIÑÁN-FERRÉ, Christian. A Novel NMDA Receptor Antagonist Protects against Cognitive Decline Presented by Senescent Mice. *Pharmaceutics*. **2020**. 12 (3), 284.

- [17] KABIR,T., SUFIAN, Mohammad A., SAHAB, Uddin, BEGUM, Marium, AKHTER, Shammi, ISLAM, Ariful, BIJO, Mathew, ISLAM, Siddiqui, AMRAN, Shah, GHULAM, Ashraf. NMDA Receptor Antagonists: Repositioning of Memantine as a Multitargeting Agent for Alzheimer's Therapy. *Current Pharmaceutical Design*. **2019**. 25 (33), 3506-3518.
- [18] KOOLA, Mathew Maju. Galantamine-Memantine combination in the treatment of Alzheimer's disease and beyond. *Psychiatry Research*. **2020**. 293, 113409.
- [19] PÉREZ-AREALES, Javier F., TURCU, Andreea L., BARNIOL-XICOTA, Marta, PONT, Caterina, PIVETTA, Deborah, ESPARGARÓ, Alba, BARTOLINI, Manuela, De SIMONE, Angela, ANDRISANO, Vincenza, PÉREZ, Belén, SABATE, Raimon, SUREDA, Francesc X., VÁZQUEZ, Santiago, MUÑOZ-TORRERO, Diego. A novel class of multitarget anti-Alzheimer benzohomoadamantane-chlorotacrine hybrids modulating cholinesterases and glutamate NMDA receptors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2019**. 180, 613-626.
- [20] CASELLI, Richard J., KNOPMAN, David S., BU, Guojun. An agnostic reevaluation of the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease pathogenesis: The role of APP homeostasis. *Alzheimer's & Dementia*. **2020**. 16 (11), 1582-1590.
- [21] JEREMIC, Danko, JIMÉNEZ-DÍAZ, Lydia, NAVARRO-LÓPEZ, Juan D. Past, present and future of therapeutic strategies against amyloid- β peptides in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*. **2021**. 72, 101496.
- [22] KASHYAP, Kushagra, PANIGRAHI, Lalita, AHMED, Shakil, SIDDIQI, Mohammad, Imran. Artificial neural network models driven novel virtual screening workflow for the identification and biological evaluation of BACE1 inhibitors. *Molecular Informatics*. **2023**. 2200113.
- [23] MOUSSA-PACHA, Nour M., ABDIN, Shifaa M., OMAR, Hany A., ALNISS, Hasan, AL-TEL, Taleb H. BACE1 inhibitors: Current status and future directions in treating Alzheimer's disease. *Medicinal Research Reviews*. **2019**. 40 (1), 339-384.
- [24] VAN DYCK, Christopher H., SWANSON, Chad J., AISEN, Paul, BATEMAN, Randall J., CHEN, Christopher, GEE, Michelle, KANEKIYO, Michio, LI, David, REYDERMAN, Larisa, COHEN, Sharon, FROELICH, Lutz, KATAYAMA, Sadao, SABBAGH, Marwan, VELLAS, Bruno, WATSON, David, DHADDA, Shobha, IRIZARRY, Michael, KRAMER, Lynn D., IWATSUBO, Takeshi. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *The New England Journal of Medicine*. **2023**. 338, 9-21.
- [25] HOY Sheridan M. Lecanemab: First Approval. *Drugs*. **2023**. 89, 359-365.

- [26] CUMMINGS, Jeffrey, RABINOVICI, G. D., ATRI, A., AISEN, P., APOSTOLOVA, L. G., HENDRIX, S., SABBAGH, M., SELKOE, D., WEINER, M., SALLOWAY, S. Aducanumab: Appropriate Use Recommendations Update. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*. **2022**. 9, 221-230.
- [27] VAZ, Miguel, SILVESTRE, Samuel. Alzheimer's disease: Recent treatment strategies. *European Journal of Pharmacology*. **2020**. 887, 173554.
- [28] MURALIDAR, Shibi, AMBI, Senthil Visaga, SEKARAN, Saravanan, THIRUMALAI, Diraviyam, PALANIAPPAN, Balamurugan. Role of tau protein in Alzheimer's disease: The prime pathological player. *International Journal of Biological Macromolecules*. **2020**. 163, 1599-1619.
- [29] WEGMANN, Susanne, BIERNAT, Jacek, MANDELKOW, Eckhard. A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology*. **2021**. 69, 131-138.
- [30] MEDEIROS, Rodrigo, BAGLIETTO-VARGAS, David, LAFERLA Frank M. The Role of Tau in Alzheimer's Disease and Related Disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. **2011**. 17 (5), 514-524.
- [31] INACIO, Patricia. Tau Protein Leads To Neuronal Death in Alzheimer's. *Alzheimer's News Today*. **2014**.
- [32] BARAGE, Sagar H., SONAWANE, Kailas D., Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. **2015**. 52, 1-18.
- [33] MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR. Český lékopis 2017: Doplněk 2021. ČR: GRADA, 2021. ISBN 978-80-271-3253-9.
- [34] OVESEN, L., F. BENDTSEN, U. TAGE-JENSEN, N.T. PEDERSEN a S.J. RUNE. Intraluminal pH in the stomach, duodenum, and proximal jejunum in normal subjects and patients with exocrine pancreatic insufficiency. *Gastroenterology*. Denmark: Elsevier Inc., 1986, 90(4), 958–962.
- [35] FRANC, Aleš. Příručka pro tvorbu a použití disoluční metody se zřetelem k perorálním léčivým přípravkům s okamžitým uvolňováním. 1. vydání. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2021. ISBN 978-80-7560-364-7.
- [36] PĚČEK, D., M. ŠTÝBNAROVÁ, E. MAŠKOVÁ, P. DOLEŽEL, M. KEJDUŠOVÁ, D. VETCHÝ a K. DVOŘÁČKOVÁ. Využití analýzy textury při vývoji a hodnocení matricových tablet s prodlouženým uvolňováním léčiva. *Chemické listy*. Brno: Ústav technologie léků,

Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014, 108(5), 483-487.
ISSN 1213-7103.

- [37] MUSELÍK, J., A. KOMERSOVÁ, V. LOCHAŘ a K. KUBOVÁ. Regresní analýza disolučního profilu léčiva a odhad mechanismu uvolňování léčiva. In: Chemické listy. 113 (5). Praha: Česká společnost chemická, 2019, s. 328-336. ISSN 1213-7103.
- [38] NEVYHOŠTĚNÁ, Marie. Syntéza biologicky aktivních sulfonamidových derivátů jako potenciálních léčiv Alzheimerovy nemoci. Pardubice, 2022. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Doc. Ing. Vladimír Pejchal, Ph.D.