GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ

Damian Szczesny

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

Praca doktorska wykonana

w Katedrze Biofarmacji i Farmakodynamiki

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:

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

Gdańsk 2016

STRESZCZENIE

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

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

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

Cytotoxicity of compounds with the most promising aggregation inhibiting properties was also assessed. In order to do this, *in vitro* test with human neuroblastoma SH-SY5Y cells was performed. It was proved, that only one of compound studied, 1,1'-(ethylenedisulfonyldiethylene)-bis-(pyridinium chloride) induce significant decrease in cells viability in tested concentration range. Trigonelline and other analogues were no cytotoxic *in vitro*.

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

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