

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **237739**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **425832**

(22) Data zgłoszenia: **06.06.2018**

(51) Int.Cl.
A61K 31/352 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54)

Genisteina do zastosowania do leczenia choroby Alzheimer

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

16.12.2019 BUP 26/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

17.05.2021 WUP 10/21

(73) Uprawniony z patentu:

UNIWERSYTET GDAŃSKI, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

GRZEGORZ WĘGRZYN, Gdańsk, PL
KAROLINA PIERZYNOWSKA, Gdańsk, PL
MAGDALENA PODLACHA, Gdańsk, PL
DOROTA MYŚLIŃSKA, Będzieszyn, PL
IRENA MAJKUTEWICZ, Tczew, PL
LIDIA GAFFKE, Wejherowo, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Justyna Pawłowska

PL 237739 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest genisteina do zastosowania w leczeniu choroby Alzheimera w ustalonej dawce.

Choroba Alzheimera (AD; ang. *Alzheimer disease*) jest chorobą wieku podeszłego, a jej częstość występowania wzrasta z uwagi na starzejące się społeczeństwo. Brak leku na tę chorobę jest więc istotnym problemem, który z upływem dekad będzie narastał. Obecnie liczba osób chorujących na AD przekracza 50 milionów na świecie, z czego w Polsce zdiagnozowanych jest ponad 300 000 pacjentów, a należy pamiętać, że choroba ta jest niezwykle trudna do zdiagnozowania, z uwagi na przypisywanie pierwszych jej objawów podeszłemu wiekowi.

Wyróżniamy dwie postacie AD: postać rodzinną (fAD), którą diagnozuje się, kiedy w rodzinie pacjenta występują przynajmniej dwa przypadki choroby (15–40% całej populacji chorych) oraz częściej występującą postać sporadyczną (sAD; 60–85% całej populacji chorych), która nie ma uwarunkowań genetycznych. O ile postać rodzinna dziedziczona jest autosomalnie dominująco, o tyle postać sporadyczna – wieloczynnikowo. W mózgowiu osób chorych na AD zaobserwowano odkładające się amyloidowe płytki starcze oraz splątki neurofibrylarne, które zaburzą prawidłowe funkcjonowanie neuronów oraz upośledzają przekazywanie sygnału pomiędzy komórkami nerwowymi prowadząc do neurodegeneracji niektórych obszarów mózgu (głównie kory mózgu, hipokampa i ciała migdałowatego). U podstaw choroby leży akumulacja toksycznych form β -amyloidu (β A) tworzącego płytki starcze oraz hiperfosforylowanego białka tau (P-tau) będącego głównym składnikiem splątków neurofibrylarnych w strukturach ośrodkowego układu nerwowego. Problemem jest jednak przyczyna akumulacji tych dwóch białek. W przypadku fAD znaleziono mutacje w genach kodujących białka biorące udział w tworzenia β -amyloidu z jego prekursora, natomiast w przypadku sAD – przyczyny pozostają całkowicie nieznane.

Do głównych objawów choroby zaliczamy zaburzenia myślenia abstrakcyjnego czy uszkodzenie pamięci semantycznej (wczesne stadia) oraz trudności językowe, zaburzenia pamięci długotrwałej i zmiany osobowości (późne stadia). Chorzy wyłącza się z życia społecznego i rodzinnego. Stopniowo tracą oni funkcje życiowe, co prowadzi do śmierci najczęściej w ciągu 7 lat od postawienia diagnozy.

Pomimo wielu badań nad poszukiwaniem leku, do tej pory nie udało się opracować skutecznej terapii na AD. Jedną z molekularnych strategii terapeutycznych było zahamowanie działania sekretaz biorących udział w przemianie prekursora beta-amyloidu lub kinaz fosforylujących białko tau, co miało nie dopuścić do powstawania toksycznej formy β A oraz P-tau. Używane inhibitory, z powodu niskiej specyficzności okazały się być przyczyną wielu objawów niepożądanych podczas badań *in vivo* w zwierzęcych modelach choroby. Inną strategią było użycie specyficznych przeciwciał, które miały wiązać i inaktywować β A jednak strategia ta nie przynosiła oczekiwanych rezultatów podobnie jak próba poprawy przeżywalności komórek nerwowych poprzez blokowanie szlaków prowadzących do programowanej śmierci komórki. Strategia zahamowania syntezy prekursora amyloidu oraz białka tau również nie przyniosła pozytywnych rezultatów z tego powodu, że białka te pełnią dość istotne funkcje w organizmie człowieka.

W leczeniu AD zarejestrowane są cztery substancje czynne: riwastygmina, donepezyl, galantamina i memantyna, a ich działanie w dużej mierze opiera się na utrzymaniu wysokiego poziomu acetylocholiny w organizmie (najczęściej wskutek inhibicji enzymu rozkładającego acetylocholiny), gdyż obniżony jej poziom wpływa negatywnie na procesy poznawcze i pamięć długotrwałą. Powodują one jednak szereg efektów niepożądanych od lekkich (bezsenna, zawroty głowy, niestrawność) do ciężkich (kurcze mięśniowe, halucynacje, psychozy, bradykardie, powikłania mózgowo-naczyniowe).

Dlatego obecnie jedną z najbardziej obiecujących podejść terapeutycznych jest przyspieszona degradacja toksycznej formy odkładającego się β A i P-tau. Testowanych było już wiele aktywatorów dróg degradacji białek w komórkach, jednak niestety do tej pory nie znaleziono leku, który degradowałby zakumulowane białka a ponadto był całkowicie bezpieczny w długoterminowym stosowaniu.

Do chwili obecnej, zostały ujawnione różne substancje chemiczne, które mają zastosowanie do leczenia AD.

Z opisu patentowego PL 188481 B znane jest zastosowanie 2-fenyl-1,2-benzoizoselenazol-3(2H)-onu do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia choroby Alzheimera.

Z i innego opisu wynalazku WO 95/04538 znane jest zastosowanie 4'-jodo-4'-dezoksydoksorubicyny do wytwarzania leku do leczenia choroby Alzheimera.

W innym opisie wynalazku EP 2 075 007 B1 proponuje się peptyd skoniugowany z białkiem, który działa jako immunogen do wytwarzania przeciwciał, powodujący redukcję akumulacji blaszek amyloidowych, do otrzymywania środka leczniczego ze zapobiegania m.in. chorobie Alzheimera.

Z opisu wynalazku EP 2 157 973 B1 znany lek w postaci chlorku donepezylu do leczenia choroby Alzheimera.

Z opisu wynalazku EP 3 171 174 B1 znane jest zastosowanie laktoferryiny lub kodującej ją cząsteczki kwasu nukleinowego, w diagnostyce lub prognozowaniu choroby Alzheimera w próbce biologicznej uzyskanej od pacjenta.

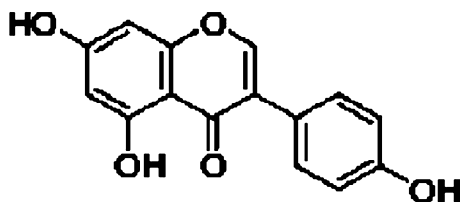
W pracy Bakheri et al. i wsp. Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid β (1-40) rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Learn. Mem.* 2011;95:270–276; przedstawiono wyniki badań behawioralnych myszy, u których wywoływano stany przypominające chorobę Alzheimera, poprzez podanie beta-amyloidu 1–40 do mózgu, oraz pomiar markerów stresu oksydacyjnego. Faktycznie podanie genisteiny częściowo chroniło zwierzęta przed rozwojem zaburzeń behawioralnych. Opisano zastosowanie dawki genisteiny, stosunkowo niskiej – 10 mg/kg. Nie opisano poziomów toksycznych białek (beta-amyloidu i hiperfosforylowanego białka tau), których gromadzenie się jest podstawową przyczyną choroby Alzheimera. Zastosowany model jest w rzeczywistości niepełny tj. brak akumulacji hiperfosforylowanego białka tau) i może dotyczyć formy rodzinnej. Zaobserwowano protekcyjny efekt genisteiny, do pewnego stopnia, gdy podana została przed wywołaniem objawów, na pojawienie się niektórych objawów neurologicznych. Autorzy wiążą te efekty z działaniem genisteiny na receptor estrogenny oraz aktywnością przeciwutleniającą tego związku.

Twórcy niniejszego wynalazku intensywnie badali genisteinę do leczenia choroby Alzheimera i wykazali, że substancja genisteina wykazuje doskonałe działanie w leczeniu choroby Alzheimera, dokonując w ten sposób niniejszego wynalazku.

Niniejszy wynalazek dostarcza użyteczny leku do leczenia choroby Alzheimera z punktu widzenia bezpieczeństwa.

Celem niniejszego wynalazku jest dostarczenie nowego zastosowania dla substancji genisteina, która może być zastosowana do leczenia choroby Alzheimera.

Istotą wynalazku jest genisteina, jeden z izoflawonów, który użyty w dawce 150 mg/kg/dzień całkowicie redukuje poziom toksycznych białek będących przyczyną AD – β -amyloidu oraz P-tau. Prowadzi to do absolutnej redukcji oznak choroby w behawiorze (zwierzęta z chorobą Alzheimera zachowują się dokładnie tak jak zwierzęta zdrowe).



Rys. wzór genisteiny ($C_{15}H_{10}O_5$)

Zespół twórców wykazał, że u podłoża tego działania leży indukcja jednego z procesów degradacji białek (procesu autofagii), w przeciwieństwie do wcześniejszych sugestii opartych na podstawie użycia niższych dawek gdzie zakładano zahamowanie procesu apoptozy lub funkcje anty oksydacyjne. Indukcja stwierdzonego przez twórców mechanizmu działania prowadzi do usunięcia przyczyny choroby, a nie tylko usuwa wtórne zmiany związane z chorobą.

Przedmiotem wynalazku jest zatem medyczne zastosowanie genisteiny w leczeniu choroby Alzheimera w dawce 150 mg/kg/dzień.

Korzystnie, genisteinę stosuje się doustnie w postaci proszku lub zawiesiny w wodzie.

Określenie stosowane powyżej oraz w opisie i zastrzeżeniach patentowych, ma następujące znaczenie:

Genisteina – oznacza genisteinę w skutecznej dawce 150 mg/kg/dzień.

Leczenie – oznacza leczenie choroby Alzheimera w pewnym stopniu jej rozwoju, który jest mierzalny u pacjentów, czy to diagnozowanie choroby Alzheimera w pełnym stopniu rozwoju czy to diagnozowanie pierwszych symptomów łagodnych zaburzeń oraz w każdym następnym stadium rozwoju AD.

Opis figur:

Fig. 1 – Figura przedstawia wyniki pomiaru aktywności motorycznej zwierząt, a konkretnie liczbę ich ruchów horyzontalnych (wykonywanych w poziomie; horizontal movements), wertykalnych (wykonywanych w pionie; vertical movements) oraz krótkich ruchów zapoczątkowujących charakterystycznych dla gryzoni (ambulatoryjnych; ambulatory movements). Przedstawione na tej figurze wyniki wykazały, że zwierzęta z indukowaną chorobą Alzheimera (grupa STZ + CTR) charakteryzują się znaczną nadaktywnością ruchową co wyrażone jest w zwiększonej liczbie ich ruchów horyzontalnych, wertykalnych lub ambulatoryjnych (wartości te przekraczają 2-3 krotnie liczbę ruchów u zwierząt z grupy kontrolnej (VEH+CTR). Natomiast liczba każdego z rodzaju ruchów u zwierząt z chorobą Alzheimera ale leczonych genisteiną wraca do poziomu liczby ruchów u grupy kontrolnej. Gwiazdka oznacza istotność statystyczną danej grupy w stosunku do grupy kontrolnej (VEH+CTR) przy dobranym poziomie istotności 0,05, natomiast dwie gwiazdki – 0,01.

Fig. 2 – Figura przedstawia wyniki pomiaru pamięci podczas testu uniesionego labiryntu krzyżowego, a konkretnie czas przejścia z ramienia otwartego (punkt początkowy testu) do ramienia zamkniętego labiryntu. Zdrowe szczury z każdym kolejnym pomiarem (test + re-test) powinny przechodzić do zamkniętego ramienia w coraz krótszym czasie. Wykres przedstawia wyniki wyjściowe (baseline), które są porównywalne u wszystkich grup zwierząt, natomiast już podczas pierwszego pomiaru właściwego (test) czas przejścia do ramienia zamkniętego jest krótszy u grupy zwierząt zdrowych oraz grupy zwierząt z indukowaną AD, ale leczonych genisteiną. Natomiast czas ten u grupy zwierząt chorych (STZ+CTR) pozostaje niezmienny w porównaniu do wartości wyników wyjściowych. Podczas kolejnego pomiaru (re-test) czas przejścia zwierząt z grup kontrolnych oraz zwierząt z AD leczonych genisteiną ponownie spada, natomiast w przypadku grupy szczurów cierpiących na AD pozostaje istotnie wydłużony. Trzy gwiazdki oznaczają istotność statystyczną ($p < 0,001$) podczas pierwszego pomiaru pamięci (test) w stosunku do grupy kontrolnej (VEH+CTR) natomiast trzy symbole gamma oznaczają istotność statystyczną ($p < 0,001$) w stosunku do grupy kontrolnej (VEH+CTR) podczas drugiego pomiaru pamięci (re-test). Trzy alfa oznaczają istotność statystyczną ($p < 0,001$) w stosunku do pomiaru wyjściowego (baseline).

Fig. 3 – Figura przedstawia wyniki pomiaru pamięci podczas testu uniesionego labiryntu krzyżowego, a konkretnie czas spędzony w ramionach otwartych labiryntu. Zdrowy szczur bojąc się wysokości oraz otwartej przestrzeni powinien spędzić w nich jak najmniej czasu, co powinno objawiać się skróconym czasem przebywania w nich z każdym kolejnym pomiarem (test i re-test). Wykres przedstawia wyniki wyjściowe (baseline), które są porównywalne u wszystkich grup zwierząt, natomiast już podczas pierwszego pomiaru właściwego (test) czas spędzony w ramionach otwartych jest krótszy u grupy zwierząt zdrowych oraz grupy zwierząt z indukowaną AD, ale leczonych genisteiną. Natomiast czas ten u grupy zwierząt chorych (STZ+CTR) pozostaje niezmienny w porównaniu do wartości wyników wyjściowych. Podczas kolejnego pomiaru (re-test) czas ten u zwierząt z grup kontrolnych oraz zwierząt z AD leczonych genisteiną ponownie spada, natomiast w przypadku grupy szczurów cierpiących na AD pozostaje niezmienny w stosunku do pomiaru wyjściowego. Symbol gamma (w teście re-test) oznacza istotność statystyczną danej grupy w stosunku do grupy VEH CTR podczas pomiaru „test” (dwa symbole – $p < 0,01$; trzy symbole – $p < 0,001$); natomiast trzy alfa oznaczają istotność statystyczną w stosunku do pomiarów wyjściowych (baseline).

Fig. 4 – Figura przedstawia wyniki pomiaru pamięci podczas testu uniesionego labiryntu krzyżowego, a konkretnie czas spędzony w ramionach zamkniętych labiryntu (alternatywnie dla Fig. 3). Zdrowy szczur bojąc się wysokości oraz otwartej przestrzeni na którą jest narażony w ramionach otwartych, powinien spędzić jak najwięcej czasu w ramionach zamkniętych, co powinno objawiać się coraz dłuższym czasem przebywania w nich z każdym kolejnym pomiarem (test i re-test). Wykres przedstawia wyniki wyjściowe (baseline), które są porównywalne u wszystkich grup zwierząt, natomiast już podczas pierwszego pomiaru właściwego (test) czas spędzony w ramionach zamkniętych jest dłuższy u grupy zwierząt zdrowych oraz grupy zwierząt z indukowaną AD, ale leczonych genisteiną. Natomiast czas ten u grupy zwierząt chorych (STZ+CTR) pozostaje krótki, nawet krótszy od wartości wyników wyjściowych. Podczas kolejnego pomiaru (re-test) czas ten u zwierząt z grup kontrolnych oraz zwierząt z AD leczonych genisteiną ponownie ulega wydłużeniu, natomiast w przypadku grupy szczurów cierpiących na AD pozostaje niezmienny (krótki). Opis symboli jest taki sam jak w przypadku Fig. 3.

Fig. 5 – Figura przedstawia wyniki pomiaru zachowania zwierzęcia w otwartym polu, a konkretnie czas spędzony w kwadratach centralnych oraz peryferyjnych oraz dystans (w cm) jaki zwierzęta prze-

były w tych dwóch rodzajach kwadratów. Test ten pozwala na zbadanie preferencji zwierząt co do zajmowanego w otwartym polu miejsca podczas 20-minutowej sesji co jest miarą połączenia aktywności lokomotorycznej oraz zachowań lękowych. Wyniki tego testu wykazały, że zwierzęta z indukowaną AD (STZ CTR) spędzają dużo mniej czasu w kwadratach centralnych, za to dużo więcej w kwadratach peryferyjnych niż grupa zwierząt kontrolnych (VEH CTR). Natomiast zwierzęta z AD ale leczone genisteiną charakteryzują się wynikami identycznymi jak zwierzęta kontrolne (zdrowe). Podobnie prezentują się wyniki dystansu przebytego przez szczury (miara ich ruchliwości). Dystans przebyty przez zwierzęta chore na AD w kwadratach centralnych jest skrócony w stosunku do grupy zwierząt kontrolnych, natomiast w kwadratach peryferyjnych jest istotnie wydłużony. Również w tym parametrze genisteina znosi zmiany spowodowane wystąpieniem choroby. Dwie gwiazdki oznaczają istotność statystyczną w stosunku do grupy kontrolnej (VEH CTR) przy poziomie istotności 0,01.

Fig. 6 – Figura przedstawia wyniki pomiaru pamięci podczas testu labiryntu wodnego Morrisa, a konkretnie czas znalezienia platformy przez zwierzęta. Platforma jest niewidoczna dla zwierząt, doświadczenie prowadzi się przez 4 kolejne dni, w których szczur próbując uciec od szkodliwych dla siebie warunków powinien coraz szybciej znajdować platformę (co jest miarą jego pamięci referencyjnej). Wykres przedstawia czas znalezienia platformy w każdej grupie zwierząt od momentu rozpoczęcia eksperymentu. Wyniki wykazały, że w przypadku grup zwierząt kontrolnych (zdrowych) jak i grupy szczurów chorych na AD ale leczonych genisteiną, czas ten spada z każdym dniem czyli szczury coraz szybciej znajdują platformę. Natomiast czas ten u zwierząt z grupy STZ CTR (chorych na AD) jest z każdym dniem przypadkowy. Trzy gwiazdki oznaczają istotność statystyczną w stosunku do grupy STZ genistein ($p < 0,001$).

Fig. 7 – Figura przedstawia wyniki pomiaru pamięci podczas testu labiryntu wodnego Morrisa, a konkretnie dystans przebyty przez zwierzęta do momentu znalezienia platformy. Pomiar ten pokazuje czy szczury płynęły prosto do platformy czy może szukały jej podczas eksperymentu. Dystans spada we wszystkich grupach badanych zwierząt jednak warto zauważyć, że spadek ten w przypadku grup kontrolnych jak i zwierząt chorych na AD leczonych genisteiną spada o ok. 70% wartości wyjściowej, podczas gdy w przypadku zwierząt chorych na AD – spadek ten wynosi ok. 30%. Gwizdka oznacza istotność statystyczną w stosunku do grupy STZ genistein.

Fig. 8 – Figura przedstawia wyniki pomiaru pamięci podczas testu labiryntu wodnego Morrisa, a konkretnie czas spędzony w kwadrancie labiryntu (umownym) w którym znajduje się platforma. Pomiar ten pokazuje czy zwierzęta kojarząc miejsce położenia platformy poruszają się w jego pobliżu. Wyniki testu pokazały, że w przypadku grup kontrolnych oraz grupy szczurów z AD ale traktowanych genisteiną czas spędzony w tym kwadrancie jest istotnie wydłużony w porównaniu do grupy zwierząt chorych na AD (STZ CTR). Trzy gwiazdki oznaczają istotność w porównaniu do grupy STZ genistein ($p < 0,001$).

Fig. 9 – Figura przedstawia wyniki przeprowadzonych analiz biochemicznych, a konkretnie analiz poziomów białek będących przyczyną choroby Alzheimera (beta-amyloidu oraz P-tau) w mózgowiu szczurów. Poziomy tych białek w grupach kontrolnych (zwierząt zdrowych traktowanych i nie-traktowanych genisteiną) nie różnią się istotnie. Natomiast poziomy tych białek wzrastają znacząco w grupie zwierząt z chorobą Alzheimera, a ich wartości osiągają nawet 3-krotnych wartości kontroli. Natomiast w grupie zwierząt chorych na AD, której podawano genisteinę, poziom tych białek ulega normalizacji do ich poziomu u szczurów zdrowych. Gwizdka oznacza istotność statystyczną w porównaniu do grupy kontrolnej (VEH water) ($p < 0,05$), natomiast krzyżyk oznacza istotność w stosunku do grupy STZ water ($p < 0,05$).

Fig. 10 – Figura przedstawiająca wizualizację agregatów beta-amyloidu w komórkach nerwowych w obrębie zakrętu zębatego hipokampa (struktury odpowiedzialnej za pamięć). Wykonane zdjęcia przedstawiają, że w przypadku zwierząt z grupy kontrolnej nie występują złogi beta-amyloidu, natomiast w przypadku grupy zwierząt chorych na AD, złogi te są bardzo widoczne w dużych ilościach. Natomiast genisteina redukuje ilość agregatów beta-amyloidu sprawiając, że w niektórych komórkach nerwowych agregaty te w ogóle znikają pozwalając na prawidłowe funkcjonowanie neuronów.

Fig. 11 – Figura ta przedstawia ilościową analizę Figury 10. Agregaty beta-amyloidu są niewykrywalne u zwierząt kontrolnych (zdrowych) natomiast u zwierząt po indukcji AD widoczne są średnio w liczbie 32 agregatów na komórkę. Genisteina redukuje tę ilość do średnio 12 agregatów na komórkę. Trzy gwiazdki oraz trzy alfy oznaczają istotność statystyczną w stosunku do kontroli (VEH water) ($p < 0,001$), natomiast trzy krzyżyki oznaczają istotność statystyczną w stosunku do grupy STZ water ($p < 0,05$).

Wynalazek ilustruje następujący przykład wykonania, nie stanowiący jego ograniczenia.

Celem planowanych badań było określenie efektywności działania genisteiny jako potencjalnego leku na chorobę Alzheimera (AD), w tym:

- określenie efektywności degradacji dwóch białek stanowiących przyczynę choroby Alzheimera - β A (beta-amyloidu) oraz P-tau (hiperfosforylowanej formy białka tau) przez genisteinę
- określenie wpływu genisteiny na deficyty pamięci i zaburzenia poznawcze.

Zastosowanym modelem był szczurzy streptozotocynowy model tej choroby. Streptozotocyna (STZ) jest pochodną glukozy i nitrozomocznika produkowaną naturalnie przez bakterie *Streptomyces achromogenes*. Podana szczurom dokomorowo wnika do komórek przy pomocy receptora GLUT-2 przyczyniając się do powstawania reaktywnych form tlenu, stanu zapalnego (występowanie tych zjawisk stwierdzono również w ludzkiej postaci choroby) oraz ostatecznie – tworzenia się blaszek β A i spletków złożonych z P-tau. W konsekwencji zaburzona zostaje transmisja cholinergiczna, co prowadzi do neurodegeneracji głównie obszaru hipokampa skutkując znacznym deficytem procesów pamięciowych.

Przykład 1

Szczury po zabiegu iniekcji STZ zostały losowo podzielone na 4 główne grupy:

- 1) gr. VEH WODA: z dokomorową iniekcją rozpuszczalnika dla STZ, którym podawana była woda (grupa zwierząt zdrowych);
- 2) gr. VEH GENISTEINA: z dokomorową iniekcją rozpuszczalnika dla STZ, którym podawana była genisteina w dawce 150 mg/kg/dzień (grupa zwierząt zdrowych + genisteina);
- 3) gr. STZ WODA: z dokomorową iniekcją STZ, którym podawana była woda (grupa zwierząt chorych nie-leczonych);
- 4) gr. STZ GENISTEINA: z dokomorową iniekcją STZ, którym podawana była genisteina w dawce 150 mg/kg/dzień (grupa zwierząt chorych leczonych genisteiną).

U szczurów po miesiącu od rozpoczęcia podawania genisteiny/wody przeprowadzono szereg testów behawioralnych na które składały się:

- a) pomiar aktywności lokomotorycznej, mierzonej w aktometrach;
- b) testu uniesionego labiryntu krzyżowego;
- c) pomiar naturalnego zachowania zwierzęcia w otwartym polu – test otwartego pola;
- d) pomiaru pamięci za pomocą labiryntu wodnego Morrisa.

Następnie po 3 miesiącach od rozpoczęcia podawania genisteiny/wody szczury zostały uśmiercone, a tkanki mózgowe pobrane zostały do analiz biochemicznych w celu określenia poziomów toksycznych białek będących przyczyną choroby Alzheimera.

Genisteina używana była w formie wolnej, jako produkt syntezy chemicznej, w postaci białego proszku. Do podania zwierzętom została przygotowana w postaci zawiesiny w wodzie w dawce 150 mg/kg/dzień.

Ad. a) Pomiar aktywności lokomotorycznej

Test ten służy do oceny aktywności lokomotorycznej szczurów w nowym otoczeniu. Otoczeniem tym jest pleksiglasowa klatka (wymary 43 x 43 x 20 cm) będąca częścią aktometru – urządzenia zliczającego liczbę ruchów horyzontalnych, wertykalnych oraz ambulatoryjnych. Aktywność ruchowa wszystkich grup zwierząt mierzona była zawsze o tej samej porze przez okres dwóch godzin (Fig. 1).

Interpretacja: Zwierzęta z chorobą Alzheimera charakteryzują się dużą nadaktywnością ruchową co oznacza, że są hiperaktywne. Objaw ten jest często obserwowanym objawem w przypadku zwierzęcych modeli chorób neurodegeneracyjnych. Natomiast użycie genisteiny całkowicie znosi hiperaktywność chorych zwierząt sprawiając, że zwierzęta te pod względem liczby ich ruchów są identyczne jak zwierzęta kontrolne (zdrowe).

b) Pomiar pamięci oraz stresu w teście uniesionego labiryntu krzyżowego

Test ten jest uniesionym na wysokość 50 cm labiryntem o kształcie krzyża, z dwoma ramionami odsłoniętymi i dwoma zasłoniętymi. Zdrowy szczur postawiony na odkrytym ramieniu, gdzie wysokość jest czynnikiem stresowym, powinien przejść do ramion zamkniętych i pozostać tam do zakończenia danej sesji. Szczury ze stwierdzoną neurodegeneracją eksplorują teren labiryntu spędzając mniej więcej tyle samo czasu w ramionach odkrytych co zakrytych. Prowadzone były pomiary czasu, w jakim szczur przeszedł z ramienia odkrytego do zakrytego, całkowitego czasu jaki spędził w ramionach odkrytych/zakrytych w obrębie badanych grup zwierząt przez okres 5 min. Pomiary te były powtarzane po 10 min (pamięć robocza) w celu sprawdzenia czy czas przejścia z ramienia odkrytego do zakrytego ulegnie skróceniu (Fig. 2–4).

Interpretacja Figur 2–4: latencja (czas) przejścia z ramienia otwartego do ramienia zamkniętego podczas testu oraz re-testu, a także długi czas spędzony w ramionach zamkniętych oraz krótki czas spędzony w ramionach otwartych labiryntu jest miarą pamięci zwierząt (o możliwości ukrycia się przed czynnikami stresogennymi). W przypadku grupy szczurów kontrolnych (zdrowych) oraz grupy szczurów z AD ale leczonych genisteiną czas przejścia do ramienia zamkniętego skraca się z każdym kolejnym pomiarem (test + re-test) co świadczy o bardzo dobrej pamięci oraz zdolności uczenia się u tych grup zwierząt. Wskazują na to również pomiary czasu spędzonego w ramionach zamkniętych oraz otwartych. Natomiast u grupy zwierząt cierpiących na AD nie obserwuje się szybkiego przechodzenia do ramienia zamkniętego, podobnie jak krótszego czasu pozostawania w ramionach otwartych i wydłużonego czasu spędzonego w ramionach zamkniętych co świadczy o tym, że zwierzęta te nie zapamiętują możliwości schronienia się z każdym kolejnym pomiarem. Zwierzęta z AD ale leczone genisteiną wykazują taką samą pamięć jak zwierzęta zupełnie zdrowe.

e) Test otwartego pola

Test ten służy do pomiaru nasilenia zachowań lękowych u szczura. Duże pole podzielone zostaje na 25 kwadratów. Czas spędzony w kwadratach centralnych i peryferyjnych zależy od indywidualnych preferencji szczura i jego zachowań lękowych. Pomiar czasu spędzonego na kwadratach centralnych i peryferyjnych w każdej grupie zwierząt był prowadzony przez 20 min (Fig. 5).

Interpretacja: Szczury, którym indukowano AD charakteryzują się zwiększonym lękiem i niepewnością co objawia się zmniejszonym czasem przebywania w kwadratach centralnych, a zwiększonym w kwadratach peryferyjnych. Podobne rezultaty wystąpiły podczas pomiarów przebytego dystansu co świadczy o ich dezorientacji w terenie. Natomiast podawanie genisteiny zwierzętom chorym na AD spowodowało, że zwierzęta te dużo chętniej wychodzą na kwadraty centralne eksplorując teren charakteryzując się zmniejszonym poziomem lęku oraz dezorientacji, tak samo jak szczury z grup kontrolnych.

d) Test labiryntu wodnego Morrisa

Test ten jest jednym z najczęściej przeprowadzanych testów służących do pomiaru pamięci u zwierząt. Basen o średnicy 150 cm wypełniony wodą o temp. pokojowej umownie podzielony został na cztery kwadranty, a w centrum jednego z nich umieszczona została platforma zanurzona pod powierzchnią wody na głębokość ok. 1 cm. Test poprzedzony został jednym dniem tzw. pre-testu, w którym platforma wystawała ponad powierzchnię wody. Doświadczenie prowadzone było przez cztery dni z rzędu po cztery próby dziennie z odstępami co 10 min. Czas jednej sesji mierzy się od wsadzenia szczura do basenu do czasu odnalezienia przez niego platformy lub w przypadku nie odnalezienia platformy – do ukończenia czasu 120s. Szczury, które nie odnajdą platformy zostały na niej położone na 10 s., a następnie wyjęte z wody. Pomiarowi ulegały: 1) czas znalezienia platformy od momentu włożenia szczura do wody, 2) czas spędzony w kwadrancie, w którym znajduje się platforma, 3) liczba pływnięć do kwadrantu, w którym znajduje się platforma, 4) przebyta droga [cm] od momentu włożenia szczura do wody do momentu znalezienia platformy. Skracanie czasu odnalezienia platformy w kolejnych dniach prowadzonego doświadczenia jest miarą pamięci przestrzennej długotrwałej. Szczury zdrowe powinny znajdować platformę szybciej z każdym dniem, a także spędzać w danym kwadrancie więcej czasu i charakteryzować się skracaniem przebytego dystansu. Za to u szczurów ze stwierdzoną neurodegeneracją, czas znalezienia platformy jest losowy każdego dnia (Fig. 6–8).

Interpretacja Figur 6, 7 i 8: Wyniki tych testów wykazują przede wszystkim poważne zaburzenia pamięci u szczurów z indukowaną AD. Zwierzęta te nie znajdują platformy z każdym kolejnym dniem doświadczenia, dystans przebyty do momentu odnalezienia platformy nie spada istotnie (tylko 30%), a czas spędzony w kwadrancie w którym znajduje się platforma jest niski co świadczy o tym, że zwierzęta te w ogóle platformy nie szukały w rejonie jej położenia. Natomiast zarówno szczury zdrowe jak i chore na AD leczone genisteiną charakteryzują się znacznym spadkiem czasu znalezienia platformy z każdym kolejnym dniem co świadczy o ich umiejętności uczenia się oraz pamięci. Ponadto dystans przebyty do momentu znalezienia platformy u tych grup zwierząt spada o ok. 70% co oznacza, że szczury te płynęły prosto do platformy doskonale znając jej położenie, a czas spędzony w kwadrancie, w którym znajduje się platforma jest u tych grup bardzo długi co świadczy o tym, że nawet gdy zwierzęta nie odnalazły platformy za pierwszym podejściem, to jednak znały jej orientacyjne położenia i w tym danym miejscu jej szukały. Wyniki te wykazują, że pod względem pomiarów pamięci, szczury chore leczone genisteiną są nieodróżnialne od zwierząt zdrowych.

Wnioski:

Wszystkie otrzymane wyniki testów behawioralnych wykazały całkowite zniesienie efektów choroby u szczurów sprawiając, że zwierzęta te są kompletnie nieodróżnialne od zwierząt z grup kontrolnych (zdrowych).

P r z y k ł a d 2

Testy biochemiczne: pomiar ilości beta amyloidu (βA) oraz jego prekursora (APP) oraz P-tau oraz tau w mózgach szczurów (beta-amyloid oraz P-tau są białkami uważanymi za przyczynę choroby).

Mózgowia (hipokamp, kora mózgu oraz reszta mózgowia) zostały zhomogenizowane i inkubowane w buforze do lizy, a następnie żwirowane do uzyskania klarownych lizatów białkowych. Immunodetekcję białek przeprowadzono za pomocą techniki Western blotting z użyciem specyficznych przeciwciał (Fig. 9–11).

Interpretacja Fig. 9: Poziom białek powodujących AD jest znacząco podwyższony u szczurów po indukcji choroby, natomiast ulega on obniżeniu u szczurów chorych traktowanych genisteiną. Oznacza to, że genisteina niweluje nie tylko objawy choroby w postaci zaburzeń behawioralnych ale przede wszystkim redukuje główną przyczynę choroby, a poprawa behawioru zwierząt jest tego konsekwencją. Tak więc genisteina jest związkiem działającym przyczynowo, nie objawowo.

Interpretacja Fig. 11: Znaczny wzrost liczby agregatów beta-amyloidu zauważalny jest u grupy zwierząt STZ water czyli chorych na AD. Natomiast genisteina w ogromnym stopniu redukuje ilość tych agregatów o czym świadczą wyniki zarówno z Fig. 10 jak i Fig. 9. Wniosek więc jest podobny jak i przy wniosku Fig. 9 – genisteina działa nie tylko objawowo ale redukuje główną przyczynę choroby.

Testy biochemiczne: wizualizacja ilości beta amyloidu (βA) w obszarze hipokampa w mózgach szczurów (hipokamp jest główną strukturą odpowiadającą za pamięć).

Wnioski:

Testy biochemiczne wykazały spadki poziomów białek będących przyczyną choroby sugerując, że genisteina działa nie tylko łagodząc objawy ale redukuje główną przyczynę choroby.

Zastrzeżenia patentowe

1. Genisteina do zastosowania do leczenia choroby Alzheimera w dawce 150 mg/kg/dzień w grupie pacjentów z akumulacją takich związków jak: toksycznych form β -amyloidu (βA) tworzącego płytki starcze oraz hiperfosforylowanego białka tau (P-tau), przy czym genisteina ma zastosowanie jako induktor autofagii dla tych związków.
2. Genisteina do zastosowania według zastrz. 1, **znamienna tym**, że genisteinę stosuje się doustnie.
3. Genisteina do zastosowania według zastrz. 1, **znamienna tym**, że genisteinę stosuje się w postaci proszku lub zawiesiny w wodzie.

Rysunki

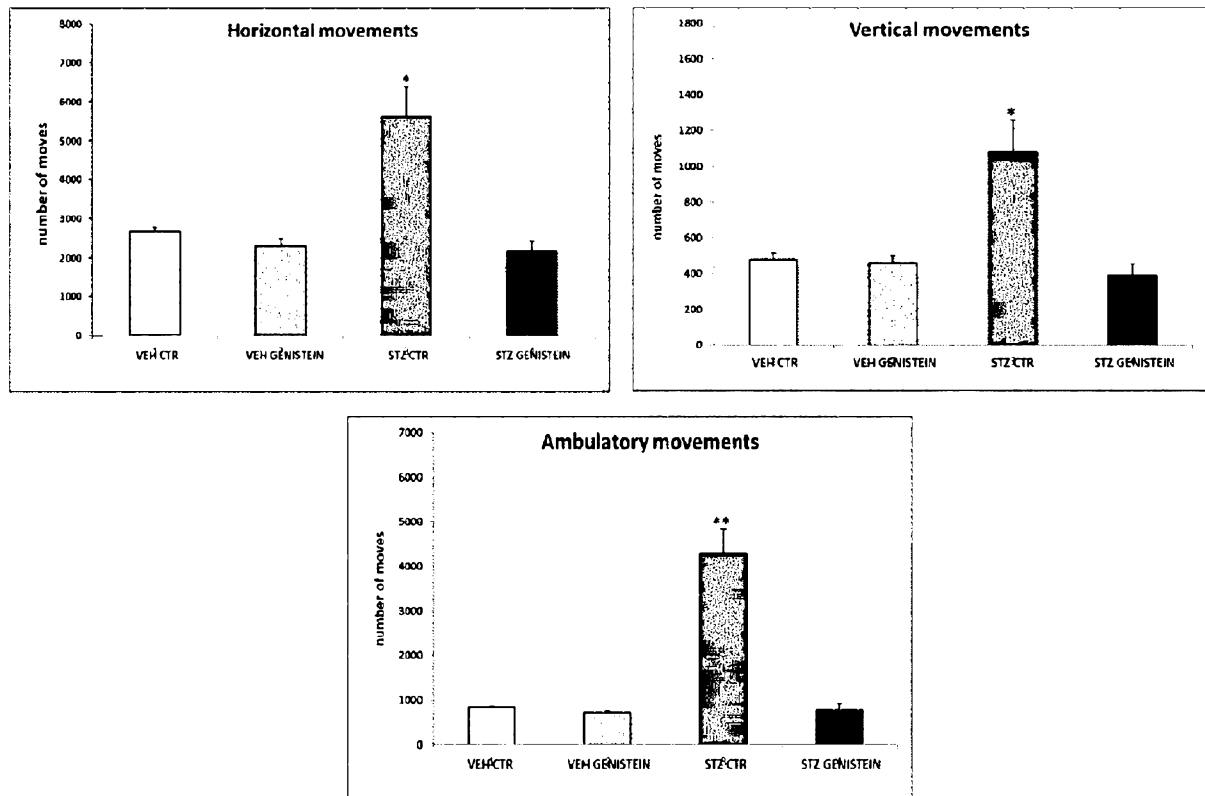


Fig.1

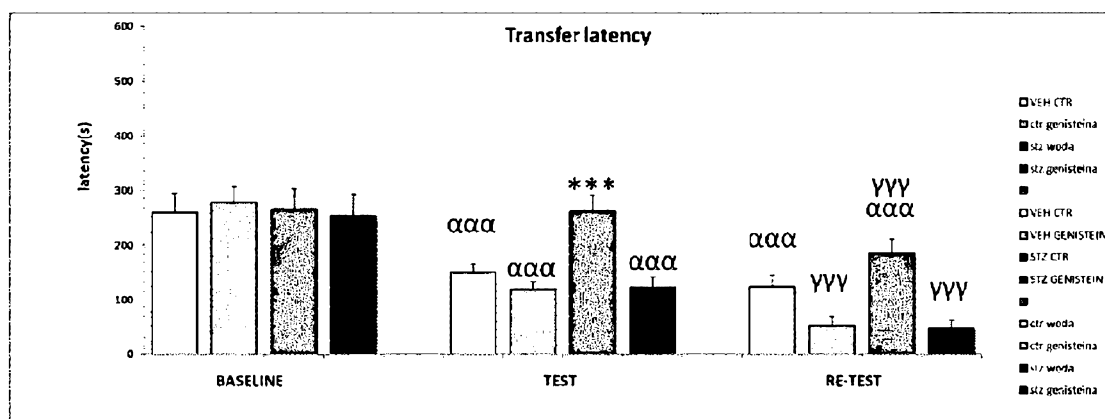


Fig.2

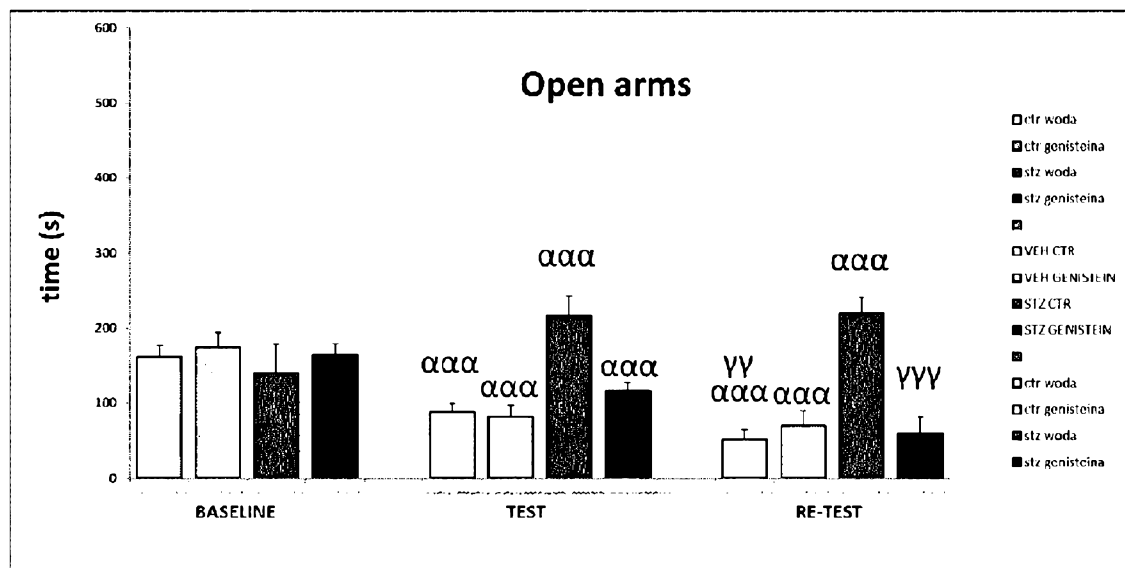


Fig.3

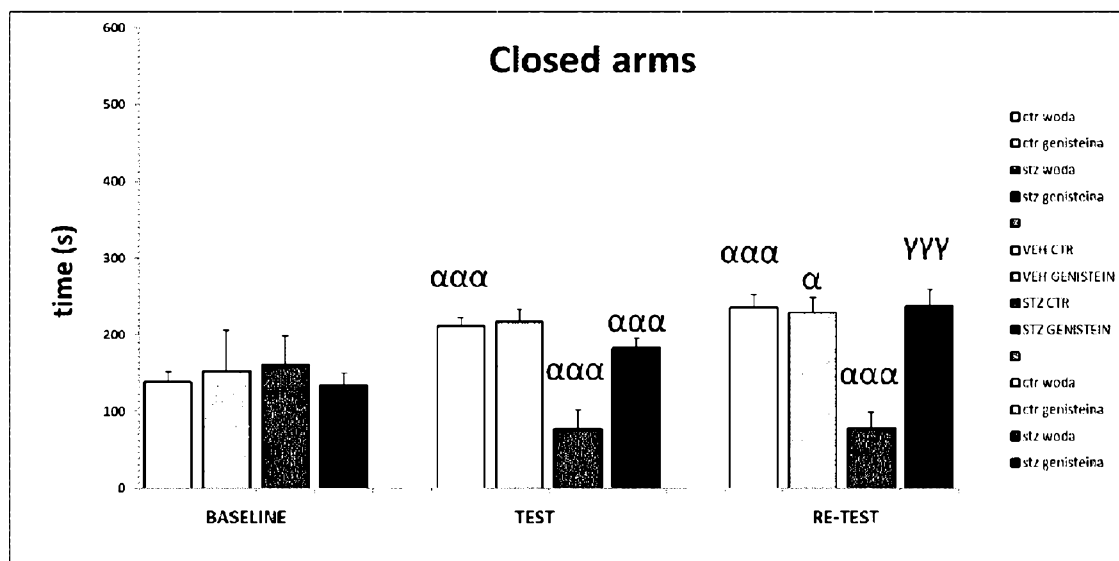


Fig.4

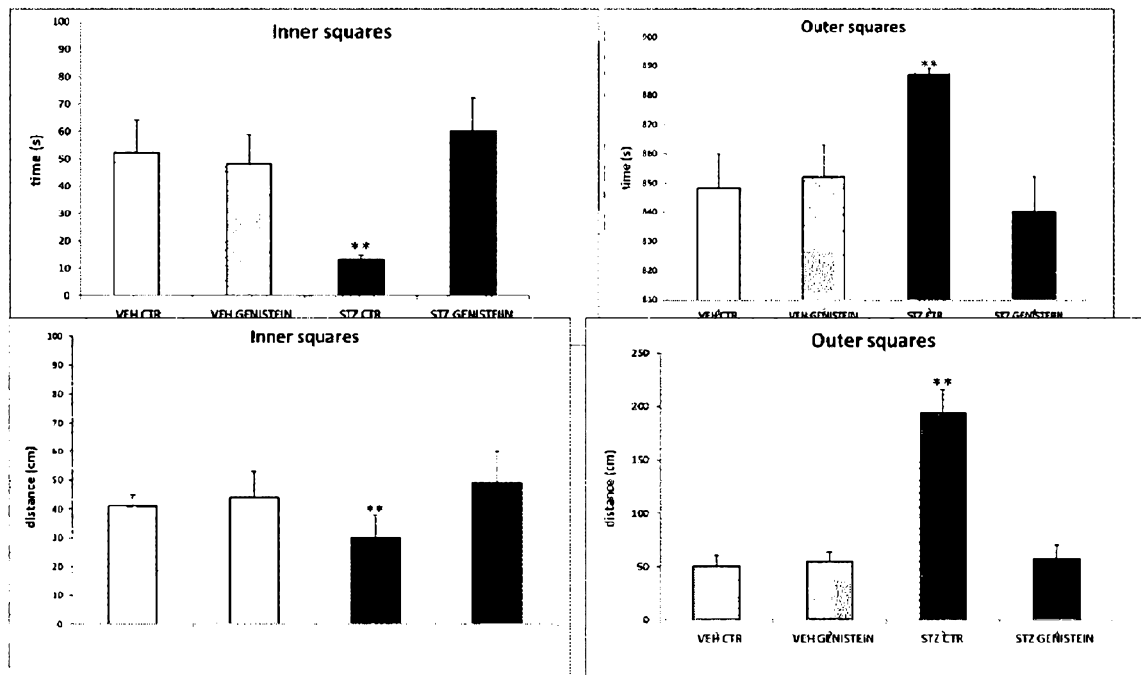


Fig.5

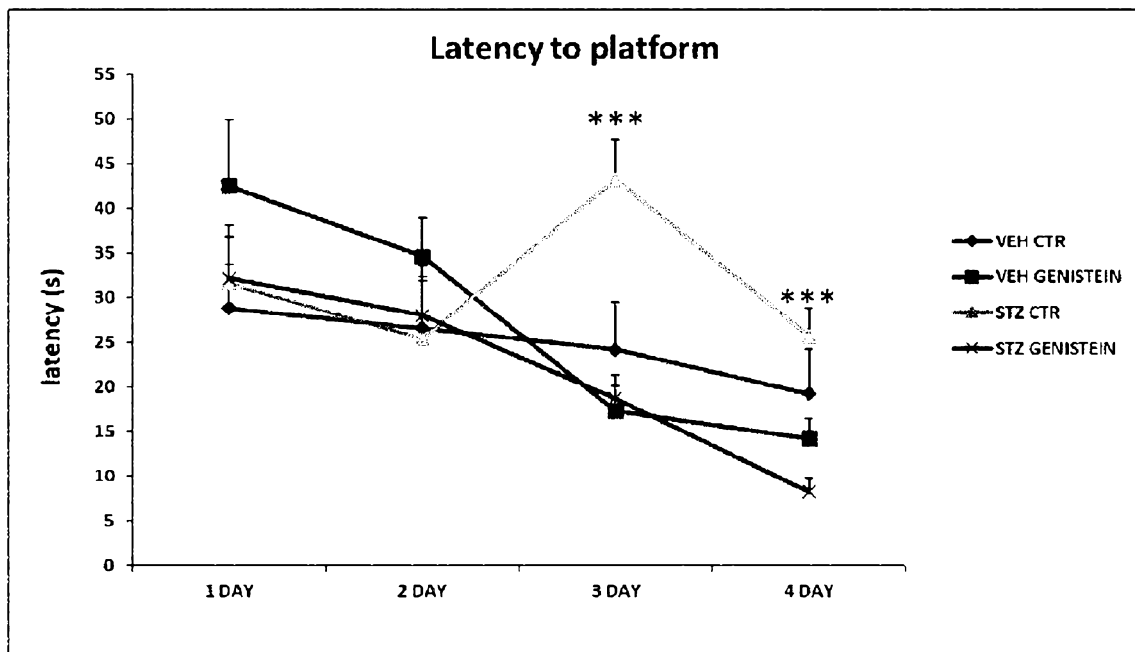


Fig.6

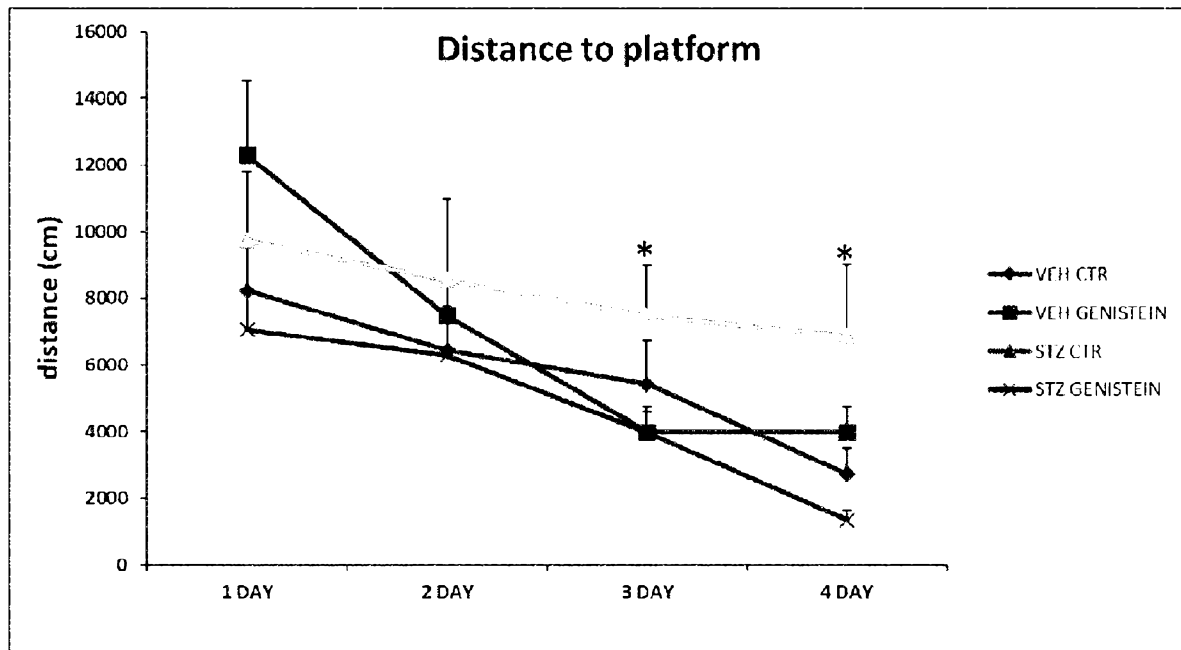


Fig.7

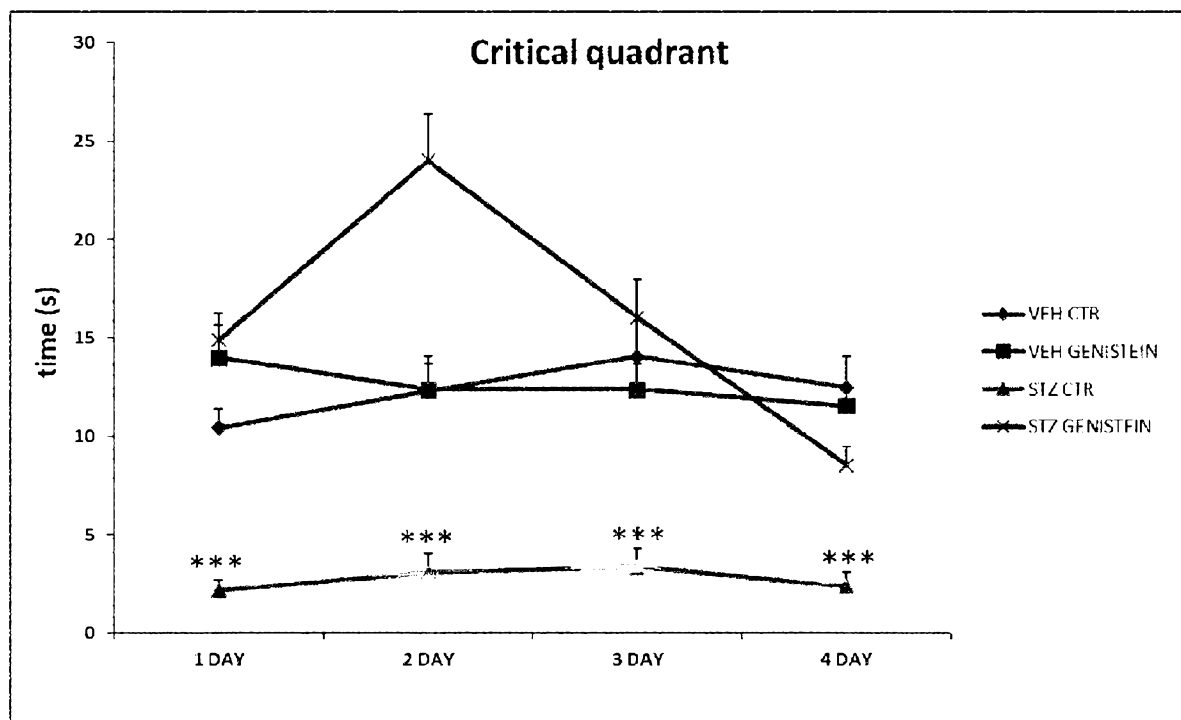


Fig.8

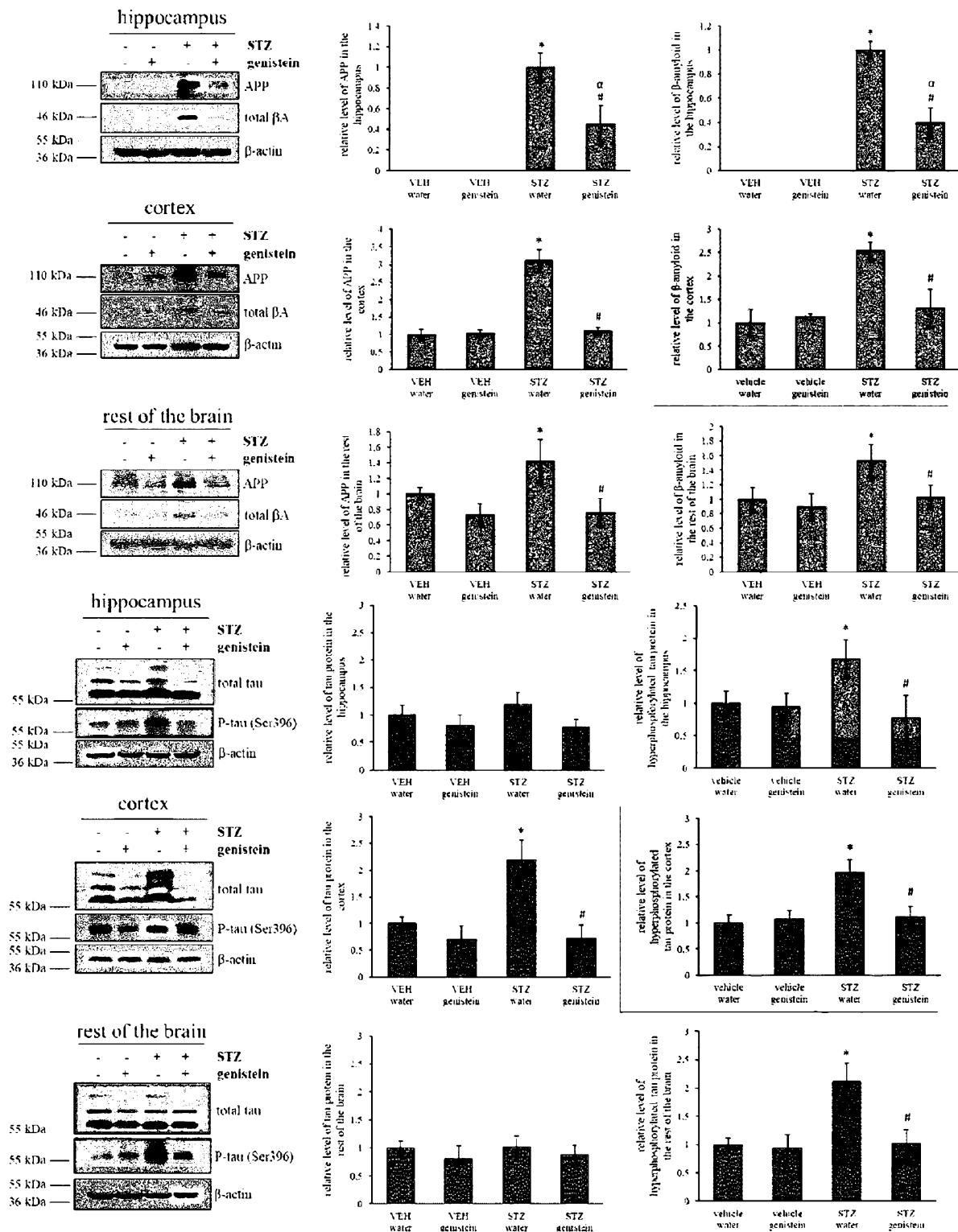


Fig.9

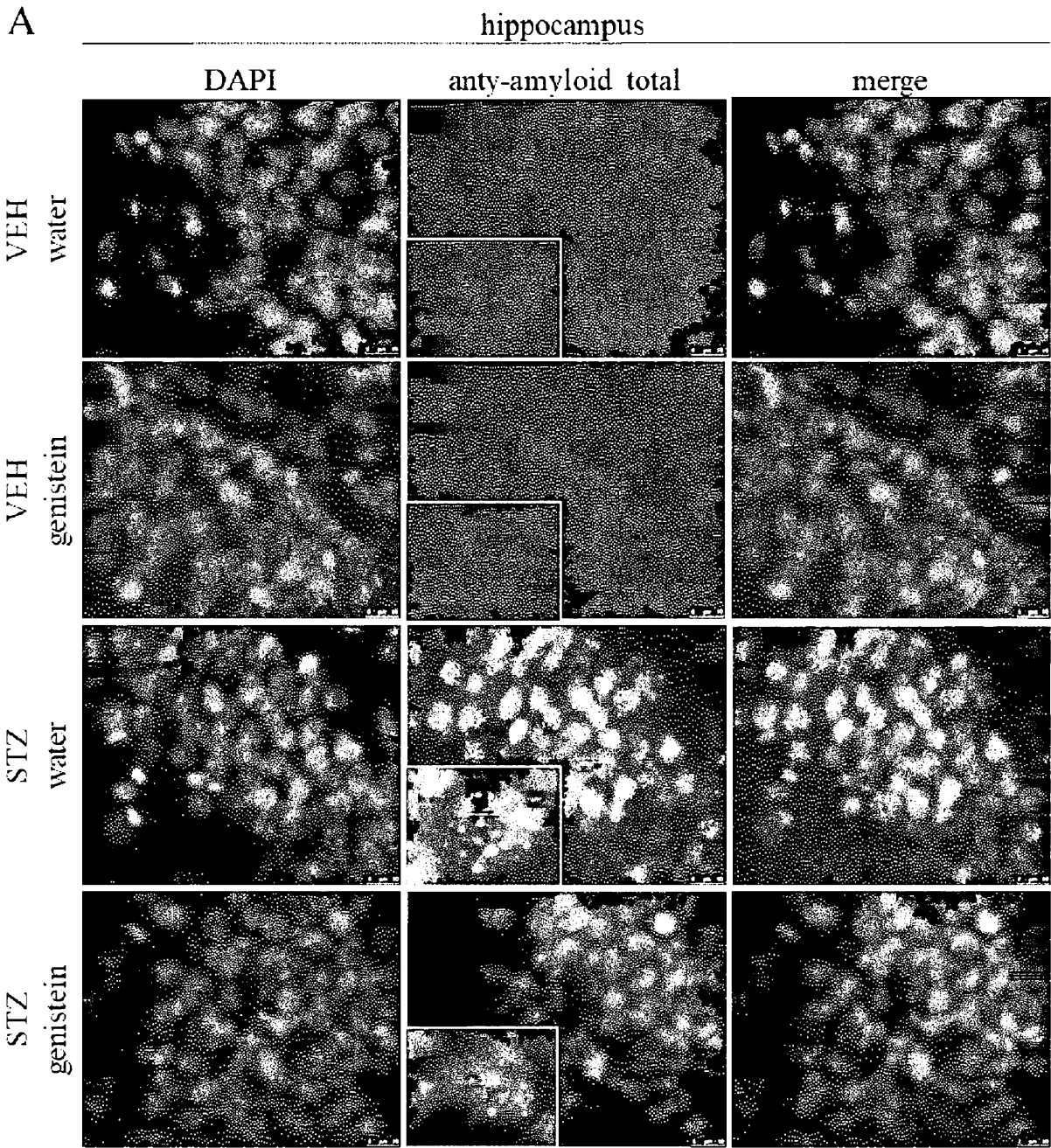
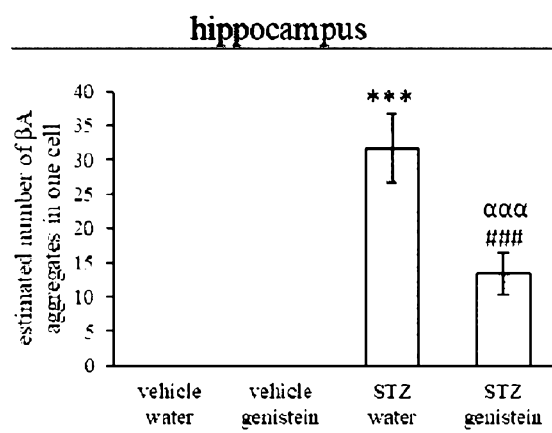


Fig.10

**Fig.11**