



Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby

Jana Hroudová

Psychiatrická klinika, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a VFN v Praze

Farmakologický ústav, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a VFN v Praze

Oddělení klinické farmakologie, VFN v Praze

Alzheimerova nemoc (AD) je nejčastější příčinou demence, přesto jsou současné možnosti léčby AD limitovány a jsou založeny na podávání inhibitorů cholinesteráz a/nebo memantinu ovlivňujícího glutamatergní systém. Předkládaný přehledový článek shrnuje současné směry vývoje nových látek pro léčbu AD, zaměřuje se na molekuly, které se dostaly do klinických studií. Nejvíce rozvíjený směr farmakoterapie je zaměřen na patologický β -amyloid ($A\beta$). Probíhá několik klinických studií zkoušejících monoklonální protilátky proti $A\beta$ a inhibitory β -sekretáz. Dále se vyvíjejí nové inhibitory cholinesteráz, inhibitory monoaminooxidáz, imunoterapie proti tau proteinu, látky ovlivňující serotoninové a nikotinové receptory, antioxidanty a jiné.

Klíčová slova: Alzheimerova nemoc, inhibitory cholinesteráz, imunoterapie proti beta amyloidu, inhibitory beta sekretáz, inhibitory monoaminooxidázy.

Research of new drugs for Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia, however, the treatment AD options are limited and based on administration of cholinesterase inhibitors and/or memantine, affecting glutamatergic system. Presented review article summarizes current approaches in the research of novel agents for AD treatment; it is focused on the molecules reaching the clinical trials. The most developed direction of pharmacotherapy is focused on pathologic β -amyloid ($A\beta$). Several perspective studies testing monoclonal $A\beta$ antibodies and β -secretase inhibitors

KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA: PharmDr. Jana Hroudová, Ph.D., jana.hroudova@vfn.cz
Psychiatrická klinika, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a VFN v Praze, Oddělení klinické farmakologie,
VFN v Praze, Na Bojišti 1, 128 08 Praha 2

Převzato z: Psychiatr. praxi 2017; 18(1): 7–10
Článek přijat redakcí: 30. 12. 2016
Článek přijat k publikaci: 10. 2. 2017



are ongoing. Further, new cholinesterase inhibitors, monoamine oxidase inhibitors, anti-tau immunotherapy, agents affecting serotonin and nicotine receptors, antioxidants, and others are developed.

Key words: Alzheimer's disease, cholinesterase inhibitors, anti-amyloid beta immunotherapy, beta secretase inhibitors, monoamine oxidase inhibitors.

Seznam použitých zkratk:

ABAD – amyloid beta vázající alkoholdehydrogenáza

AD – Alzheimerova nemoc

AGEs – konečné produkty pokročilé glykace (advanced glycation end products)

AChE – acetylcholinesteráza

APP – amyloidový prekurzorový protein

A β – β -amyloid

BACE1 – inhibitory β -sekretáz

BuChE – butyrylcholinesteráza

GSK-3 – glykogen syntáza kináza-3

IVIgY – intravenózní imunoglobuliny

MAO – monoaminoxidáza

NGF – nervový růstový faktor (nerve growth factor)

Jakými směry se ubírá vývoj léčiv pro Alzheimerovu chorobu?

Přes veškerou snahu farmaceutického výzkumu je současná léčba AD omezena na symptomatické podávání inhibitorů cholinesteráz a/nebo non-cholinergní alternativy memantinu. Strategie nově vyvíjených léčiv se různí, vychází ze stávajících hypotéz AD. Potenciálně účinné látky ovlivňují cholinergní deficit, tvorbu a eliminaci patologických proteinů β -amyloidu (A β) a tau proteinu, zánětlivé procesy, nedostatek neurotrofních faktorů,

mitochondriální dysfunkce, inzulinovou rezistenci a další patofyziologické procesy AD (Obr. 1).

Současná farmakoterapie Alzheimerovy choroby

Inhibitory cholinesteráz

Kromě přítomnosti patologických proteinů A β a tau proteinu dominuje v patofyziologii AD ztráta cholinergních neuronů. Poškození cholinergního systému v časných stádiích onemocnění přispívá ke kognitivnímu oslabení, ztrátám pozornosti a poruchám chování. Metabolismus acetylcholinu je ovlivňován dvěma cholinesterázami, které jej štěpí. Acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza (BuChE) se liší svou specifitou, expresí a aktivitou v různých oblastech CNS. Ke změnám aktivit cholinesteráz dochází ve stáří a také za patologických stavů; v případě AD se snižuje aktivita AChE a zvyšuje se činnost BuChE.

Inhibitory cholinesteráz zmírňují cholinergní deficit a pozitivně ovlivňují kognitivní, funkční a behaviorální symptomy nemoci. V současnosti jsou schválenými inhibitory cholinesteráz donepezil, rivastigmin a galantamin; jednotlivé látky se liší svou afinitou k cholinesterázám, farmakodynamickými a farmakokinetickými vlastnostmi. Donepezil působí jako nekompetitivní a re-verzibilní inhibitor AChE, z používaných látek má nejdelší biologický poločas. Rivastigmin inhibuje kromě AChE také BuChE; tato duální inhibice může být



účinnější než selektivní inhibice AChE. Galantamin působí jako AChE inhibitor a *in vitro* vykazoval rovněž alosterickou modulaci nikotinových receptorů.

Memantin

V patofyziologii AD je také zahrnuta snížená aktivita GABAergního systému a vyšší vulnerabilita k excitotoxicitě vyvolané glutamátem (1). Nadměrnou aktivací ionotropních glutamátových receptorů dochází k nadměrnému influxu kalcia do buněk, aktivaci řady enzymů a kaskádám reakcí, kterou mohou končit programovanou buněčnou smrtí – apoptózou. Memantin účinkuje jako antagonist N-methyl-D-aspartátových (NMDA) glutamátových receptorů; blokuje přemíru aktivity těchto receptorů, ale umožňuje jejich fyziologickou funkci, nezbytnou pro tvorbu paměťových stop (2).

Standardizovaný extrakt z Ginkgo biloba EGb 761 je pokládán za méně účinný než inhibitory cholinesteráz a memantin. V současné době je uváděn v doporučeních neuropsychiatrických společností pro léčbu AD jako alternativa inhibitorů cholinesteráz při jejich nesnášenlivosti nebo k adjuvantní léčbě.

Nové látky testované v klinických studiích

Inhibitory cholinesteráz

Prvním používaným inhibitorem cholinesteráz byl takrin; jeho použití v klinické praxi bylo komplikováno toxicitou (hepatotoxita, GIT dyskomfort) a byl z trhu stažen. V současné době jsou vyvíjeny nové deriváty takrinu a 7-methoxytakrinu, které mají zachovanou terapeutickou účinnost

takrinu, ale jsou méně toxické (3, 4). K takrinu byly navrženy další hybridní molekuly: takrin-flavonoidy, takrin-kumariny, takrin-troloxové hybridy a deriváty takrin-propargylaminů. Nové sloučeniny jsou intenzivně zkoumány ve snaze najít méně toxické látky a postihující více patologických mechanismů AD.

Zajímavým inhibitorem cholinesteráz je huperzin A, účinný alkaloid izolovaný z plavuně *Huperzia serrata*. Tato látka je již dlouhou dobu používána v tradiční čínské medicíně a dostala se do III. fáze klinického zkoušení. U huperzinu A byla popsána řada účinků, kromě neuroprotektivních a chorobu modifikujících účinků také snižuje excitotoxicitu vyvolanou glutamátem (5).

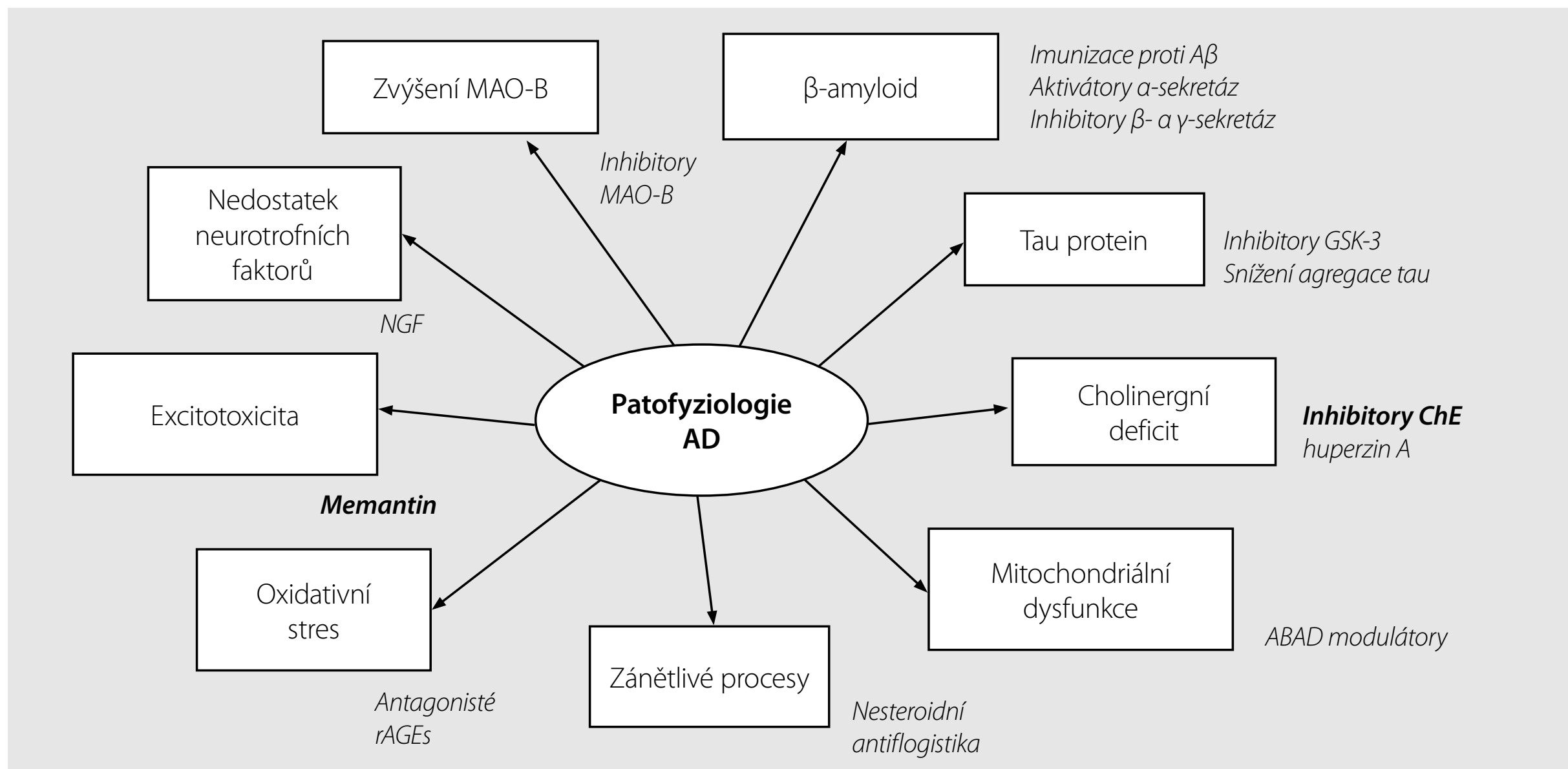
Inhibitory monoaminoxidázy B a odvozené hybridní látky

Monoaminoxidázy (MAO) jsou enzymy zodpovědné za deaminaci monoaminů; existují ve 2 izoformách (MAO-A, MAO-B) odlišujících se distribucí ve tkáních a buňkách, specifitou pro substráty a inhibitory. Vysoká aktivita MAO-B může vést ke zvýšené tvorbě kyslíkových radikálů a hrát roli v etiologii AD (6).

Selegilin a rasagilin jsou ireverzibilní inhibitory selektivní k MAO-B používané k léčbě Parkinsonovy nemoci. Jejich nové deriváty byly charakterizovány jako duální inhibitory AChE a MAO, zamýšlené k léčbě AD. Takrin-selegilinové hybridy byly syntetizovány a hodnoceny jako multifunkční inhibitory cholinesteráz a MAO-A/B (7).

Látky snižující tvorbu β -amyloidu

Největší skupina nově vyvíjených látek cílí na patologický A β . Tento peptid vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu (APP), transmem-

Obr. 1. Znáznornění neuropatologických nálezů a přístupy potenciální farmakoterapie AD


bránového proteinu, který hraje důležitou roli v neuronálním vývoji (8). APP je štěpen činností sekretáz. α-sekretáza štěpí APP za fyziologických podmínek, vzniklý peptid o délce 26 aminokyselin je solubilní a prochází přes buněčné membrány. β-sekretáza a γ-sekretáza jsou odpovědné za vznik patologického Aβ, který se s obsahem 40–42 aminokyselin stává

insolubilní, agreguje a tvoří amyloidové plaky. Nové látky redukující tvorbu patologického Aβ jsou inhibitory β-sekretáz (BACE1), inhibitory a modulátory γ-sekretáz a také aktivátory (enhancery) α-sekretáz.

Vývoj inhibitorů β- a γ-sekretáz je komplikován nutností přestupu přes hematoencefalickou bariéru a faktem, že sekretázy štěpí kromě Aβ



celou řadu substrátů. Důležitým substrátem γ -sekretázy je Notch protein, který reguluje buněčnou proliferaci, diferenciaci a růst buněk. Kvůli narušené funkci Notch proteinu byly zastaveny klinické studie zkoušející neselektivní inhibitory γ -sekretáz, vykazovaly mnoho nežádoucích účinků včetně hematotoxicity, GIT potíží, kožních reakcí a změn barvy vlasů. Druhá generace selektivních inhibitorů γ -sekretáz (tzv. „Notch šetřící“ inhibitory, např. begacestat) byla vyvinuta s lepším bezpečnostním profilem, přesto výsledky klinických studií testujících inhibitory/modulátory γ -sekretáz nejsou příliš nadějně.

Zajímavějšími látkami se zdají inhibitory β -sekretáz. Prvními zkoušenými inhibitory β -sekretáz byly látky používané jako perorální antidiabetika pioglitazon a rosiglitazon. Tyto látky stimulují PPAR γ , jaderný receptor, který se podílí na protizánětlivých účincích, snižuje toxicitu A β a zvyšuje tvorbu antiapoptického faktoru Bcl-2 (9). V současné době jsou ve III. fázi zkoušení tři BACE1 inhibitory (verubecestat, AZD3293, E2609), další nové molekuly jsou intenzivně syntetizovány a preklinicky zkoušeny (10).

Je zkoušeno několik látek (např. bryostatin-1, exebryl-1) stimulujících aktivitu α -sekretázy, zvýšení aktivity tohoto enzymu může snížit produkci A β a zvýšit tvorbu solubilního A β (11). Tento terapeutický směr se nezdá být perspektivní.

Látky zvyšující clearance β -amyloidu

Aktivní imunizace znamená vakcinaci příslušným antigenem s cílem vytvoření vlastní imunitní odpovědi organismu. Místo tvorby aktivních protilátek ale může imunitní systém ve stáří reagovat neadekvátně a autoimunitně. Klinická studie, která zkoušela první aktivní vakcínu proti A β , byla zastavena kvůli nedostatečné imunologické odpovědi a řadě nežádoucích účinků

(u 6 % pacientů se projevíly závažné nežádoucí účinky, včetně aseptických meningoencefalitid) (12). Aktivní imunoterapie proti A β je dále zkoušena u pacientů s prodromálními symptomy AD.

Pasivní imunizace zatím dosahuje největších úspěchů, ve III. fázi klinických studií jsou čtyři monoklonální protilátky (solanezumab, crenezumab, gantenerumab, aducanumab), které cílí na agregovaný A β (13). Výhodou pasivní imunoterapie je nižší procento nežádoucích účinků. Na druhou stranu tato terapie vyžaduje opakované podávání protilátek v infuzích, přesný výběr cílů pro antigeny, vyvolání imunitní reakce po aplikaci protilátky a přestup přes hematoencefalickou bariéru (14).

Intravenózní imunoglobuliny (IVIg) jsou úzce spojeny s pasivní imunizací. Směs IVIg obsahuje polyklonální protilátky získané od dárců krve a malou frakci protilátek namířenou přímo proti A β . IVIg byly dlouhou dobu používány u malého počtu pacientů k off-label léčbě AD. Předpokládalo se, že IVIg zvyšují clearance A β a snižují synaptickou toxicitu způsobenou A β . Po úvodních 2 pilotních studiích III. fáze bylo další zkoušení zastaveno, neprokázala se účinnost IVIgů v porovnání s placebem.

Plazmaferéza je další technikou, která může snížit koncentrace A β v krvi a tím nepřímo ovlivňovat i koncentrace v likvoru (15). Jedna ze současně probíhajících studií kombinuje aplikaci IVIg s výměnou plazmy (16).

Terapie zaměřená na tau protein

Fyziologicky se tau protein váže na tubulin a stabilizuje mikrotubuly. U pacientů s AD dochází k jeho hyperfosforylaci, fosforylovaný tau protein agreguje a vytváří uvnitř buněk neurofibrilární klubka. Inovativní terapie se snaží modulovat fosforylaci tau proteinu, bránit agregaci a zlepšovat degradaci tau proteinu. První z přístupů je založen na nevyvážené akti-



vitě proteinkináz (glykogen syntáza kináza-3, GSK-3) a fosforyláz. Známé inhibitory GSK-3 v psychiatrii používané jako stabilizátory nálady, lithium a valproát, snižují fosforylaci tau proteinu a působí neuroprotektivně. Lithium bylo zkoušeno v malé studii a bylo podáváno pacientům s mírnou progresí AD, nebyl však prokázán jeho účinek na kognici. Valproát snižoval incidenci agitovanosti a psychóz, ale také neovlivnil kognitivní funkce. Zkoušení nového inhibitoru GSK-3 tideglusidu (syn. NP-12) bylo ve II. fázi přerušeno, nebyl prokázán jeho terapeutický účinek.

Nadějnou sloučeninou je LMTM, která se dostala do III. fáze klinických studií. LMTM je derivátem methylenové modři a účinkuje jako inhibitor hyperfosforylace tau proteinu. Tato látka prokázala dobrou biologickou dostupnost a snášenlivost; v současné době probíhají paralelně studie a je testována u pacientů s AD a také u pacientů s frontotemporální demencí.

Aktivní imunizace je založena na vyvolání imunitní odpovědi proti patologickým formám tau proteinu. První testované vakcíny vykazovaly značnou neurotoxicitu, ta byla omezena u AAdvac-1 vakcíny, která je ve II. fázi klinického zkoušení.

Serotonergní látky

Serotonin je nepřímo zahrnut v patofyziologii neurodegenerativních onemocnění, serotoninové 5-HT₆ receptory jsou odpovědné za kognitivní procesy a paměť. Blokáda 5-HT₆ receptorů zvyšuje uvolňování acetylcholinu do synaptické štěrby a zlepšuje cholinergní transmisi (17). Antagonisté 5-HT₆ receptorů se zkouší jako perspektivní látky k symptomatické léčbě AD. Idalopirdin je testován v kombinaci s donepezilem, dostal se do III. fáze klinických studií. Je ovšem otázkou, zda za úspěchem nové molekuly nestojí současné podávání inhibitoru AChE.

Agonisté nikotinových receptorů

Byl zkoušen vareniklin, který účinkuje agonisticky na nikotinové a serotoninové 5-HT₃ receptory. Tato látka, již registrovaná a používaná k odvykání kouření, neprokázala pozitivní efekt na kognitivní funkce. Derivát enceniklin byl zkoušen, ale studie byla ukončena na konci roku 2016. Enceniklin nenaplnil předpokládané výstupy a nebyl dostatečně účinný.

Antagonisté receptorů pro konečné produkty pokročilé glykace (rAGEs)

AGEs (advanced glycation end products) jsou konečnými produkty reakce mezi volnými aminoskupinami proteinů, lipidů a sacharidů. Tyto látky hrají roli v patogenezi chronických onemocnění včetně neurodegenerativních. Po vazbě na buněčné receptory AGEs vyvolávají sled reakcí, které mohou vést ke vzniku zánětu, v neuronech také zprostředkovávají toxicitu Aβ oligomerů. Azeliragon působí jako antagonist rAGEs a byl původně vyvíjen k léčbě diabetické neuropatie. Od roku 2013 je azeliragon testován pro léčbu AD, v roce 2015 začala stále probíhající III. fáze klinických studií.

Léčiva interagující s mitochondriálními enzymy

V buňkách oligomery Aβ interagují s organelami, mitochondriálními proteiny a enzymy, konkrétně s enzymem amyloid beta vázající alkohol dehydrogenázou (ABAD, syn. HSD10). Z těchto důvodů je ovlivnění mitochondriálních funkcí dalším z přístupů léčby AD.

Frentizol, používaný jako imunosupresivum, byl identifikován jako inhibitor Aβ-ABAD interakce; jeho další deriváty a analoga jsou vyvíjeny a dále testovány. První syntetizované ABAD modulátory (ABAD-4a, ABAD-4b) vykazovaly protektivní účinky na mitochondriální funkce (18).



Neutrofiny

Snížené koncentrace neurotrofinu BDNF (brain derived neurotrophic factor) byly zjištěny v mozcích pacientů s AD (11). Přežití cholinergních neuronů závisí na NGF (nerve growth factor). Je popsána souvislost mezi dysbalancí NGF, aktivací amyloidogenní cesty a neurodegenerace u AD. Byla zkoušena genová terapie NGF, která byla i přes dobrou snášenlivost v roce 2015 zastavena pro neúčinnost testované látky.

Látky ovlivňující zánětlivé procesy

Jedna z hypotéz AD je založena na zánětlivých reakcích. Díky této hypotéze byla testována nesteroidní antiflogistika jako potenciální léčiva pro léčbu AD. Byl testován např. naproxen, lornoxikam a rofekoxib, u všech zmiňovaných látek byly klinické studie ukončeny bez pozitivních výsledků. Ibuprofen je zkoušen v kombinaci s kromolynem, momentálně ve III. fázi klinického testování.

Látky s různým mechanismem účinku

Nilvadipin je antagonistou kalciových kanálů a je registrován pro léčbu hypertenze. Kromě toho byly zjištěny jeho pozitivní účinky na kognici a probíhá III. fáze multicentrické studie u pacientů s lehkou a středně těžkou formou AD.

Statiny kromě snížení hladin cholesterolu vykazují pleiotropní účinky. Názory na účinky statinů u AD se různí, probíhající studie s atorvastatinem a simvastatinem jsou v současné době neaktivní.

Latrepirdin (Dimebon™) jako neselektivní antihistaminikum byl také testován, vykazoval řadu účinků, včetně neuroprotektivního efektu, vlivu na influx vápníku do buněk a mitochondriální funkce (11). Metaanalýza

hodnotící účinnost latrepirdinu však neprokázala pozitivní vliv na kognici.

Pozornost je rovněž věnována látkám s neuroprotektivními vlastnostmi; kandidátní molekuly pozitivně ovlivňují energetický metabolismus neuronů, mitochondriální funkce a mají antioxidační vlastnosti. Jsou používána nootropika, nicergolin, piracetam, omega-3 nenasycené mastné kyseliny, antioxidanty, koenzym Q10 a další doplňky stravy; jejich účinky na kognici jsou spekulativní a toto téma přesahuje rámec sdělení.

Závěr

Přehled shrnuje současný stav a perspektivy farmakoterapie AD. Ve výzkumu je asi 20 látek, které se dostaly do III. fáze klinických studií a jsou kandidátními molekulami pro léčbu AD. I přes značné snahy farmaceutického výzkumu nebyl od roku 2002 (registrace memantinu v Evropě) registrován nový přípravek určený k léčbě AD, více než 200 potencionálních léčiv skončilo v II. fázi klinických studií. Hlavním problémem nových látek je nutnost jejich přestupu přes hematoencefalickou bariéru, nedostatečná specifita vůči terapeutickým cílům a/nebo nedostatečná účinnost. Za neúspěchy stojí také špatný design některých studií, nedostatečný výzkum farmakodynamických vlastností testovaných látek a neznalost regulačních mechanismů terapeutických cílů. Toto jsou mj. důvody častých nežádoucích účinků, které komplikují snášenlivost nových látek.

Pro další výzkum je nutná lepší znalost patofyziologie AD, stále neznáme přesné mechanismy neurodegenerace AD. Výhledem do budoucnosti je komplexní přístup ve vývoji látek, cílem terapie přestává být pouze jeden protein. Nové látky mají ovlivňovat více patofyziologických procesů,



orgány a jiné buněčné cíle. Hrubou budoucností (nyní spíše sci-fi) je kombinace léčiv s různým mechanismem účinku, zatím je možné kombinovat pouze inhibitor cholinesteráz a memantin.

LITERATURA

1. Kapogiannis D, Mattson MP. Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, 2011; 10(2): 187–198.
2. Lipton SA. Paradigm shift in NMDA receptor antagonist drug development: molecular mechanism of uncompetitive inhibition by memantine in the treatment of Alzheimer's disease and other neurologic disorders. *J Alzheimers Dis*, 2004; 6(6 Suppl): S61–74.
3. Soukup O, et al. A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. *Curr Alzheimer Res*, 2013; 10(8): 893–906.
4. Korábečný J, et al. Synthesis and in vitro evaluation of N-(Bromobut-3-en-2-yl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine as a cholinesterase inhibitor with regard to Alzheimer's disease treatment. *Molecules*, 2010; 15(12): 8804–8812.
5. Zhang HY. New insights into huperzine A for the treatment of Alzheimer's disease. *Acta Pharmacol Sin*, 2012; 33(9): 1170–1175.
6. Hroudová J, et al. Progress in drug development for Alzheimer's disease: An overview in relation to mitochondrial energy metabolism. *Eur J Med Chem*, 2016; 121: 774–784.
7. Lu C, et al. A novel series of tacrine-selegiline hybrids with cholinesterase and monoamine oxidase inhibition activities for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*, 2013; 62: 745–753.
8. Zhou ZD, et al. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell Adh Migr*, 2011; 5(4): 280–292.
9. Jiráček R, Nové postupy v biologické terapii demencí. *Psychiatrie pro praxi*, 2010; 11(4): 143–144.
10. Tarazi H, et al. Design, synthesis and SAR analysis of potent BACE1 inhibitors: Possible lead drug candidates for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem*, 2017; 125: 1213–1224.
11. Mangialasche F, et al. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol*, 2010; 9(7): 702–716.
12. Panza F, et al. Is there still any hope for amyloid-based immunotherapy for Alzheimer's disease? *Curr Opin Psychiatry*, 2014; 27(2): 128–137.
13. Sevigny J, et al. The antibody aducanumab reduces Abeta plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, 2016; 537(7618): 50–56.
14. Godyn J, et al. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacol Rep*, 2016; 68(1): 127–138.
15. Vališ M, Farmakoterapie demencí – pokroky v léčbě a aktuální doporučení. *Remedia*, 2013; 23(6): 396–399.
16. Boada M, et al. Treatment of Alzheimer disease using combination therapy with plasma exchange and haemapheresis with albumin and intravenous immunoglobulin: Rationale and treatment approach of the AMBAR (Alzheimer Management By Albumin Replacement) study. *Neurologia*, 2016; 31(7): 473–481.
17. Marcos B, et al. Signalling pathways associated with 5-HT₆ receptors: relevance for cognitive effects. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2010; 13(6): 775–784.
18. Valasani KR, et al. Identification of human ABAD inhibitors for rescuing Abeta-mediated mitochondrial dysfunction. *Curr Alzheimer Res*, 2014; 11(2): 128–136.