



СПХФУ
САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ХИМИКО-
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ



**Кафедра фармакологии и клинической фармакологии
Фармацевтический факультет**

Изучение фармакологической активности нового производного аллилморфолина

Дипломник: Кан Александра Вениаминовна, 5 курс, ФФ

Руководитель: Доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии кафедры
к.б.н. Сысоев Ю.И.

**Санкт-Петербург
2021г**

Актуальность темы

- На данный момент времени на фармацевтическом рынке *не существует нейропротекторного препарата*, обладающего высокой эффективностью для лечения *черепно-мозговой травмы* (ЧМТ).
- ПАМ *in vitro* показана блокирующая активность в отношении *ацетилхолинэстеразы, бутирилхолинэстеразы и NMDA-рецепторов*, что позволяет предположить нейропротекторную активность ПАМ. *

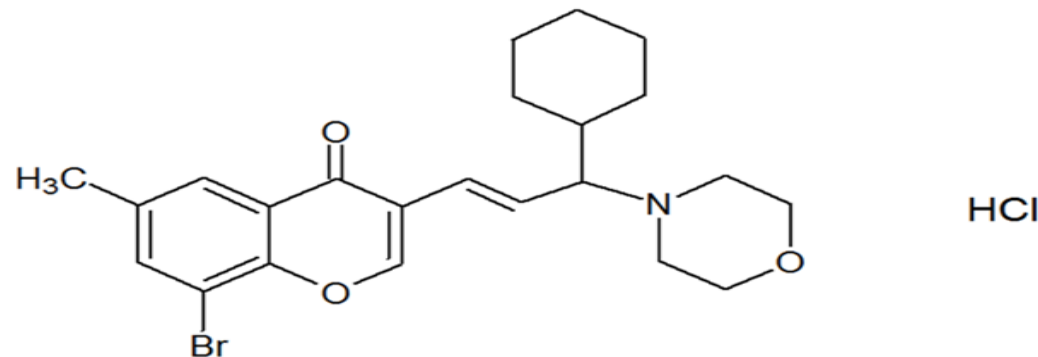
Цель и задачи исследования

Цель:

-Изучение фармакологической активности нового производного аллилморфолина -(*E*)-4-[3-(8-бromo-6-метил-4-оксо-4*H*- хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил]морфолин-4-ия хлорида (33b).

Задачи:

- 1) Изучение влияния ПАМ на поведение рыб *Danio rerio*;
- 2) Оценка вклада NMDA-рецепторов и холинергических рецепторов в реализацию поведенческих эффектов ПАМ у рыб *Danio rerio*;
- 3) Изучение нейропротекторной активности ПАМ;
- 4) Изучение влияния ПАМ на вегетативную нервную систему.



Структурная формула исследуемого соединения ПАМ 33b

Материалы и методы

- 1. Скрининг эффектов ПАМ на модели поведения рыб *Danio rerio* в тесте «Новый аквариум»

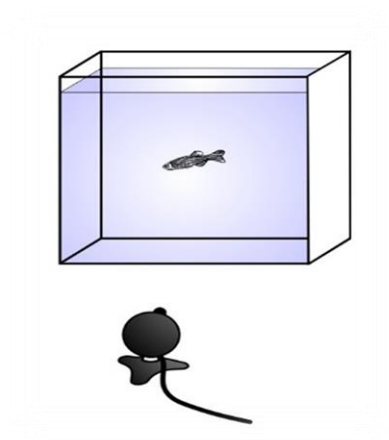


N=320 (64x5)



Pre-treatment beaker

0,5л x 20 мин

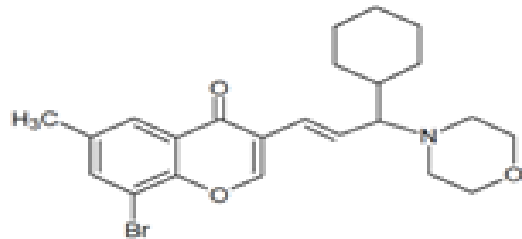


5 мин

	33b	9a	9L	9a+ NMDA	9a+ бипериден
Исследуемые концентрации	1 мкг/л	1 мг/л	1 мг/л	9a 10 мг/л	9a 10 мг/л
	10 мкг/л	10 мг/л	10 мг/л	NMDA 4,0 мг/л	Бипериден 9,0 мг/л
	100 мкг/л	20 мг/л	100 мг/л	9a+ NMDA (1:1) эквимольное количество	9a+ бипериден (1:1) эквимольное количество
				10 мг/л+3,83 мг/л	10 мг/л+ 8,11 мг/л

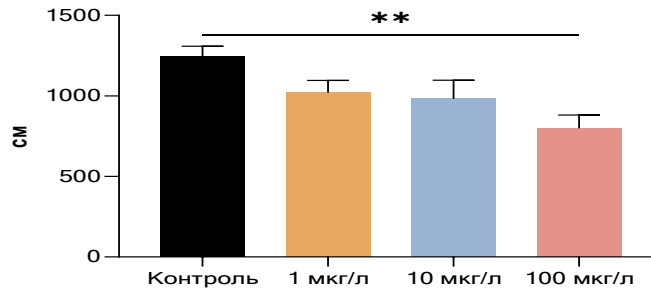
Результаты ПАМ 33 б

33 б

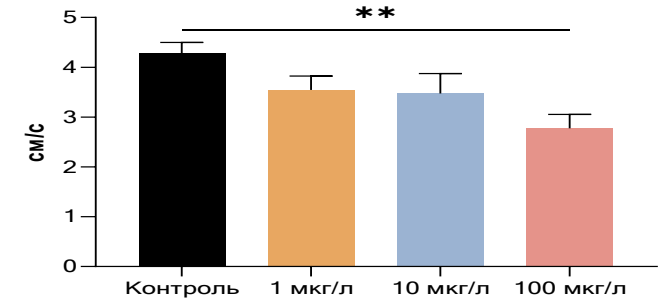


HCl

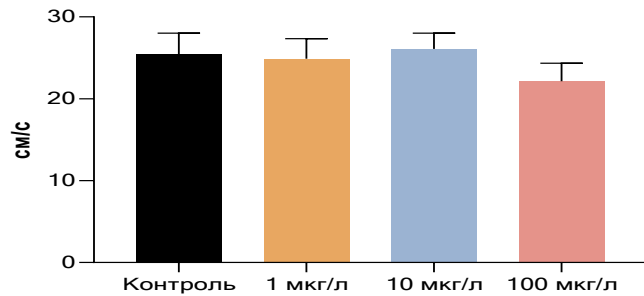
Проплытая дистанция



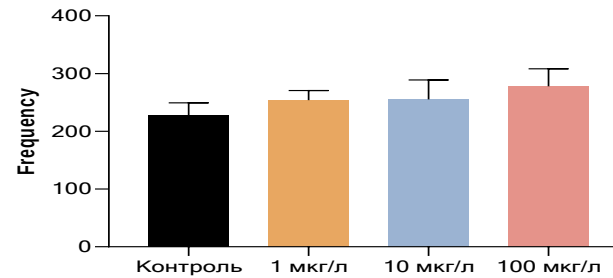
Средняя скорость



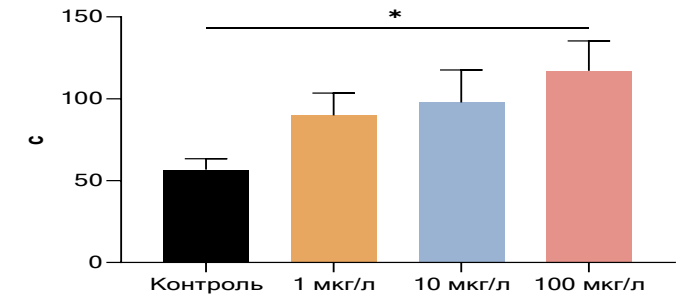
Максимальная скорость



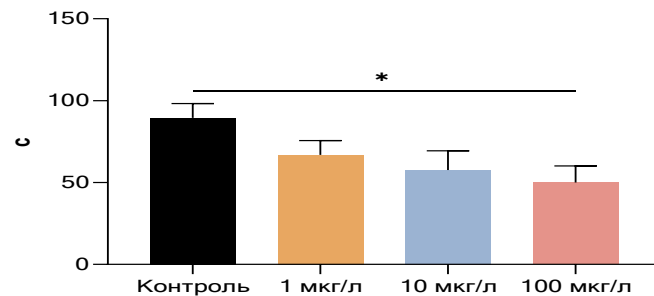
Частота замираний



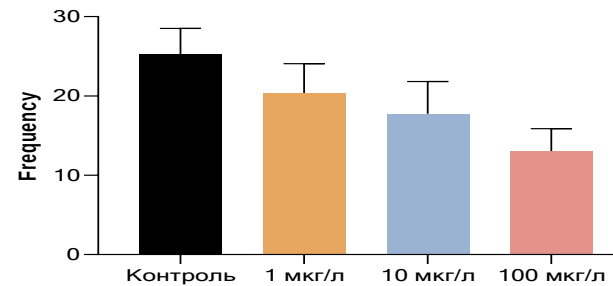
Время в неподвижном состоянии



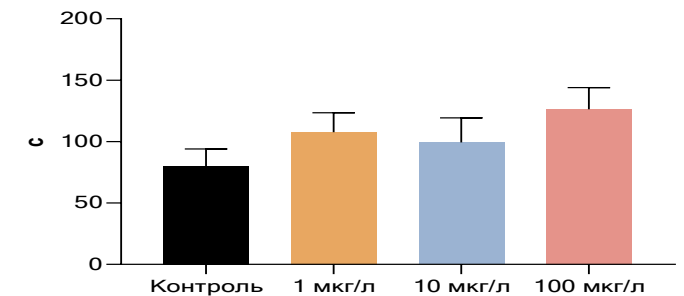
Время в верхней части



Число переходов

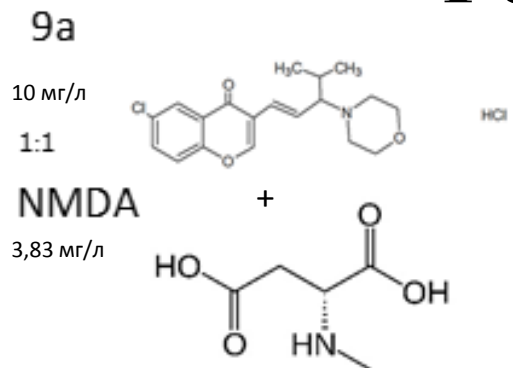


Латентность первого перехода

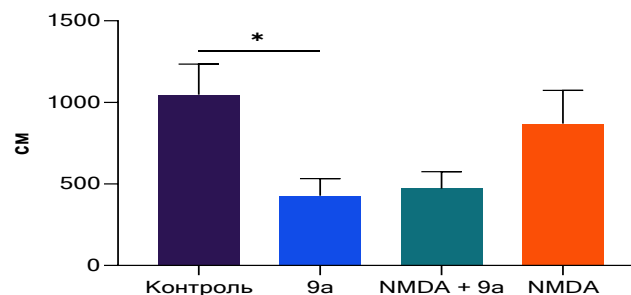


** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

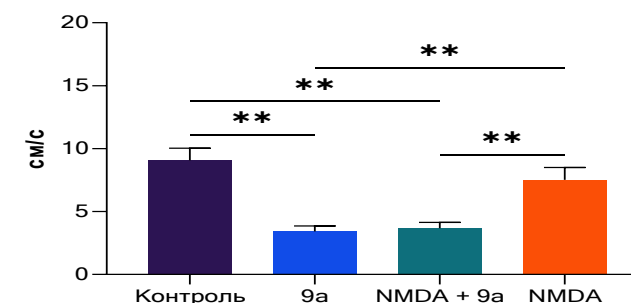
Результаты ПАМ 9a+NMDA



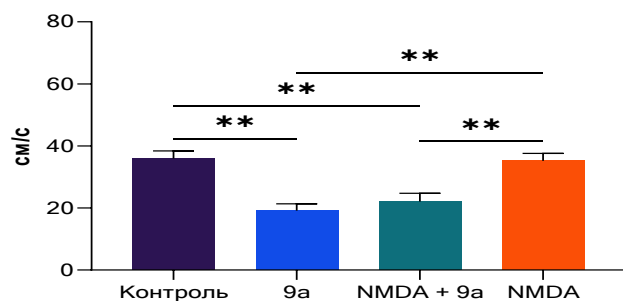
Проплытая дистанция



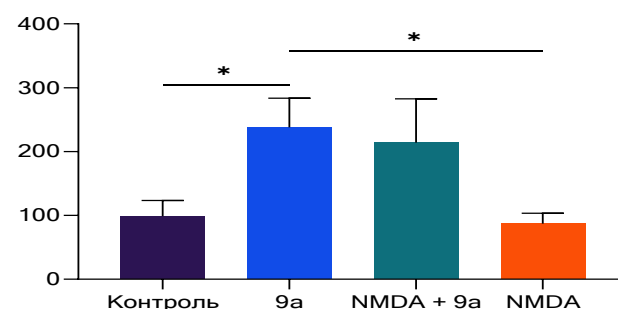
Средняя скорость



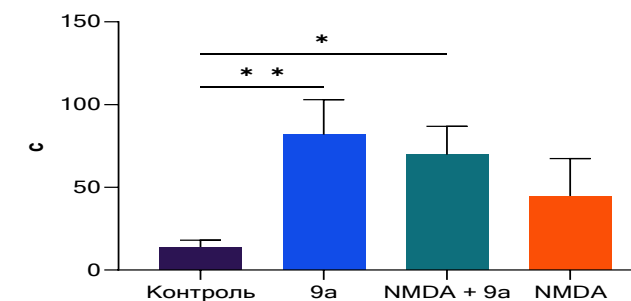
Максимальная скорость



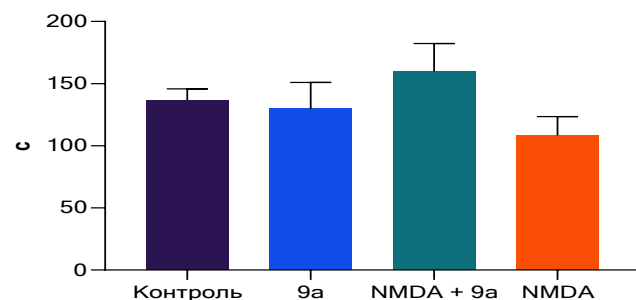
Число замираний



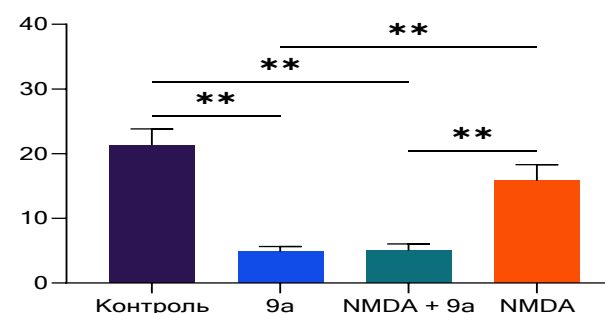
Время в неподвижном состоянии



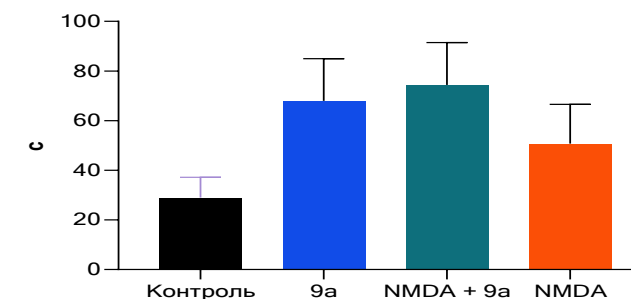
Время в верхней части



Число переходов



Латентность первого перехода



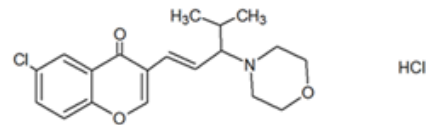
** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Результаты ПАМ 9a+бипериден

9a

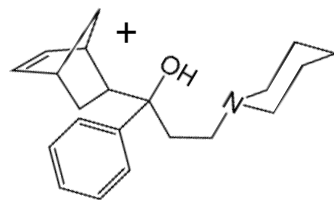
10 мг/л

1:1

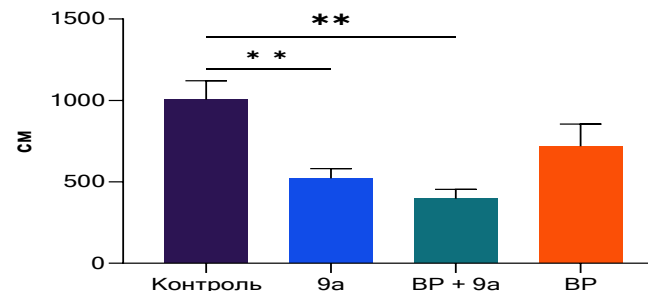


Бипериден

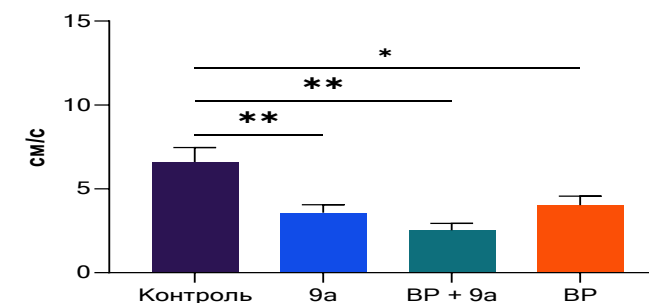
8,11 мг/л



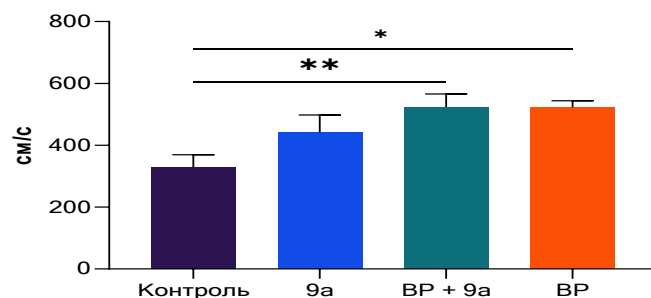
Проплытая дистанция



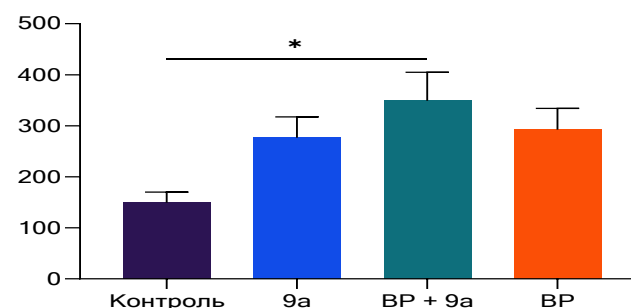
Средняя скорость



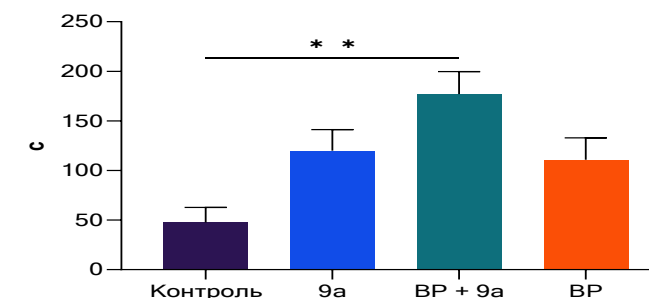
Максимальная скорость



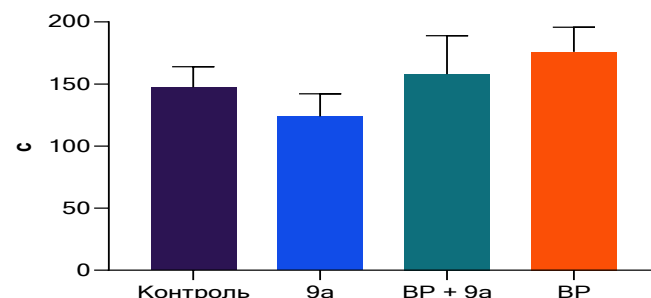
Число замираний



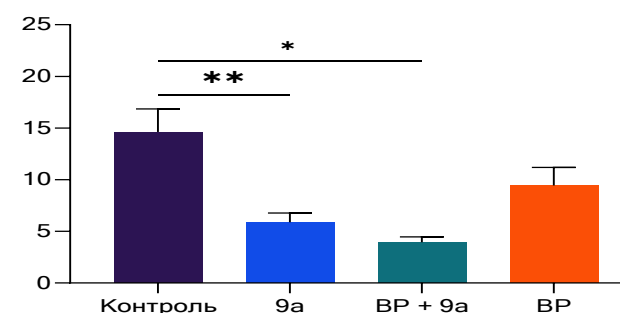
Время в неподвижном состоянии



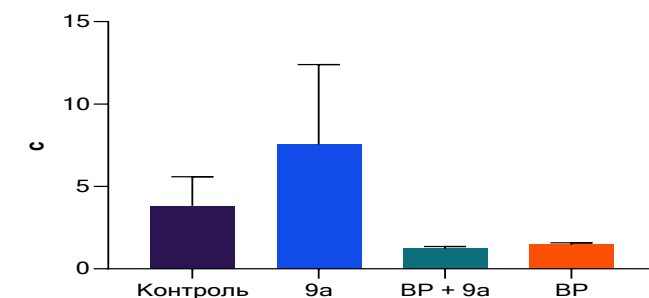
Время в верхней части



Число переходов



Латентность первого перехода

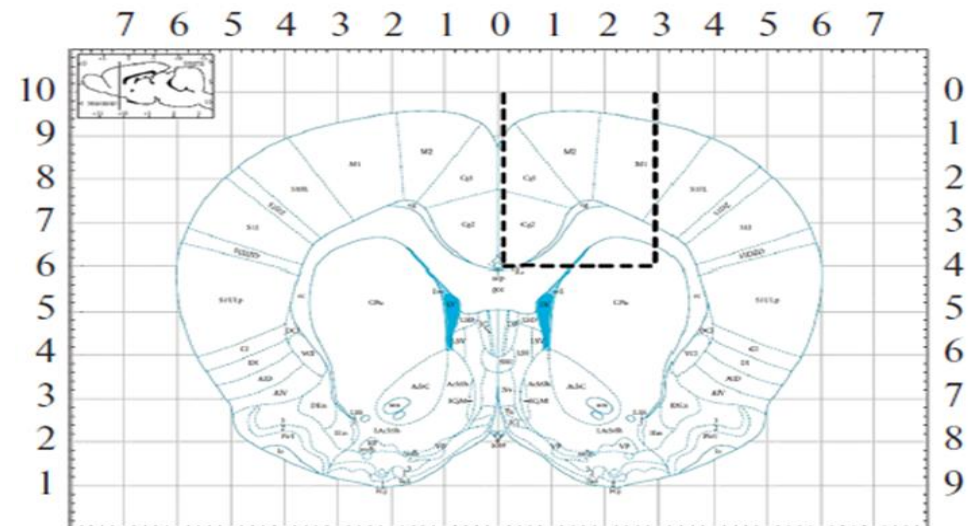


** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Материалы и методы

2. Изучение нейропротекторной активности ПАМ

- Черепно-мозговую травму моделировали методом **«контролируемого кортикального удара»** у белых крыс-самцов массой 300-350 грамм;
- Используемый анестетик – **хлоралгидрат 400 мг/кг**;
- Область поражения – **двигательная кора** и нижележащие структуры.



Материалы и методы

2. Изучение нейропротекторной активности ПАМ

Экспериментальные группы:

- интакт;
- контроль (ЧМТ);
- ПАМ 1 мг/кг;
- ПАМ 10 мг/кг;
- ПАМ 50 мг/кг.

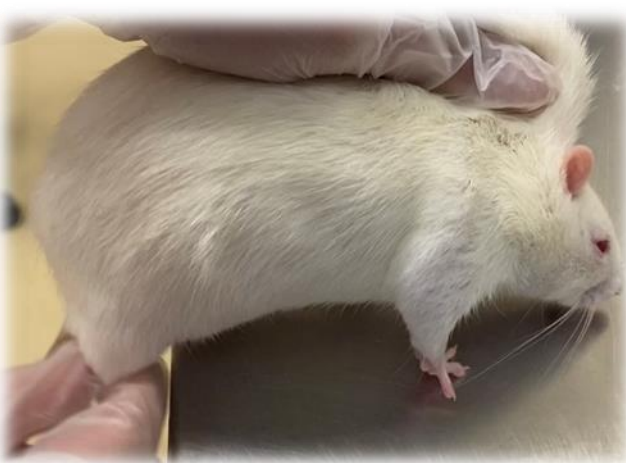
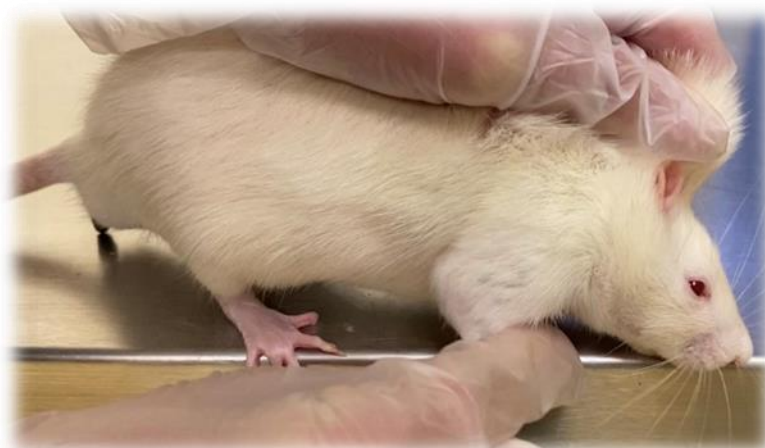
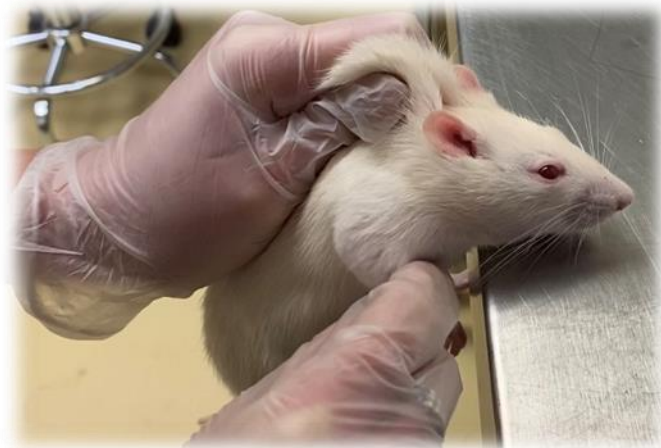


ПАМ вводили спустя 1 ч после травмы и далее в течение 6 последующих дней.

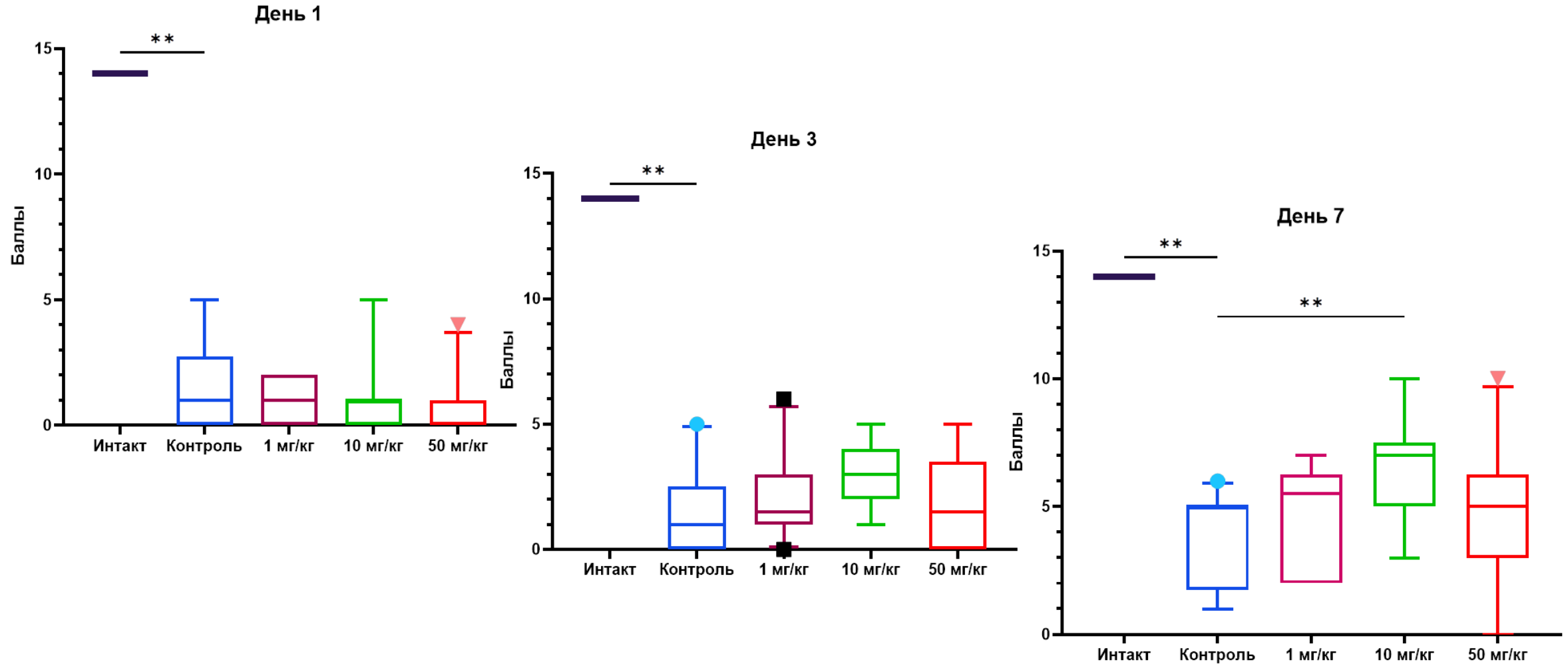
День травмы	1-й день	2-й день	3-й день	4-й день	5-й день	6-й день	7-й день
Утро: ЧМТ ↓ 1 час спустя травмы: введение ЛС	12-00 «Стимулирование конечностей» ↓ Введение ЛС	12-00 Введение ЛС	12-00 «ОП» ↓ «Стимулирование конечностей» ↓ Введение ЛС	12-00 Введение ЛС	12-00 Введение ЛС	12-00 Введение ЛС	12-00 «ПКЛ» ↓ «Стимулирование конечностей» ↓ «Цилиндр» ↓ «Сужающаяся дорожка»

Тест «Стимулирование конечностей»

- Максимально возможное суммарное количество баллов - 14
- Тестирование выполняли на 1-е, 3-и и 7-е сутки после ЧМТ



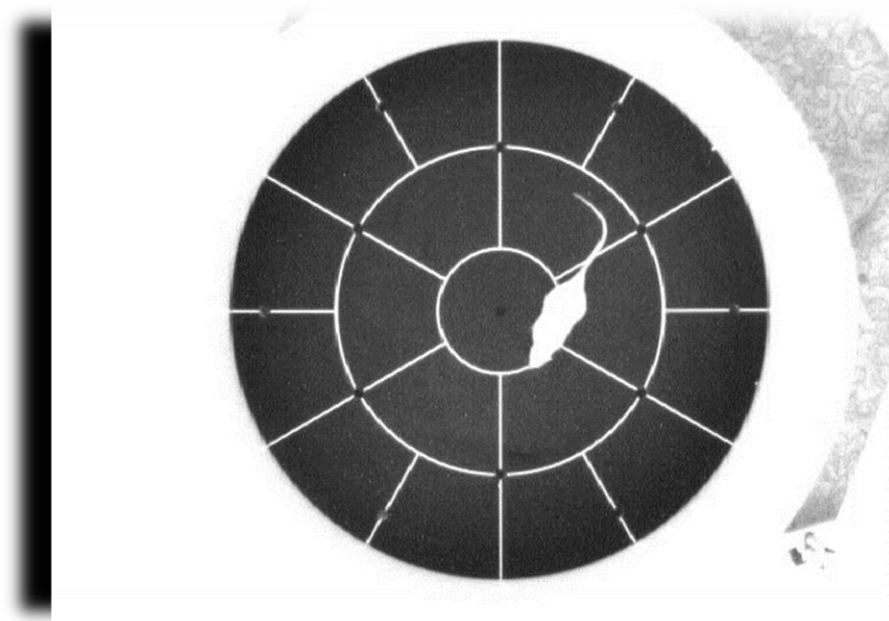
Результаты теста «Стимулирование конечностей»



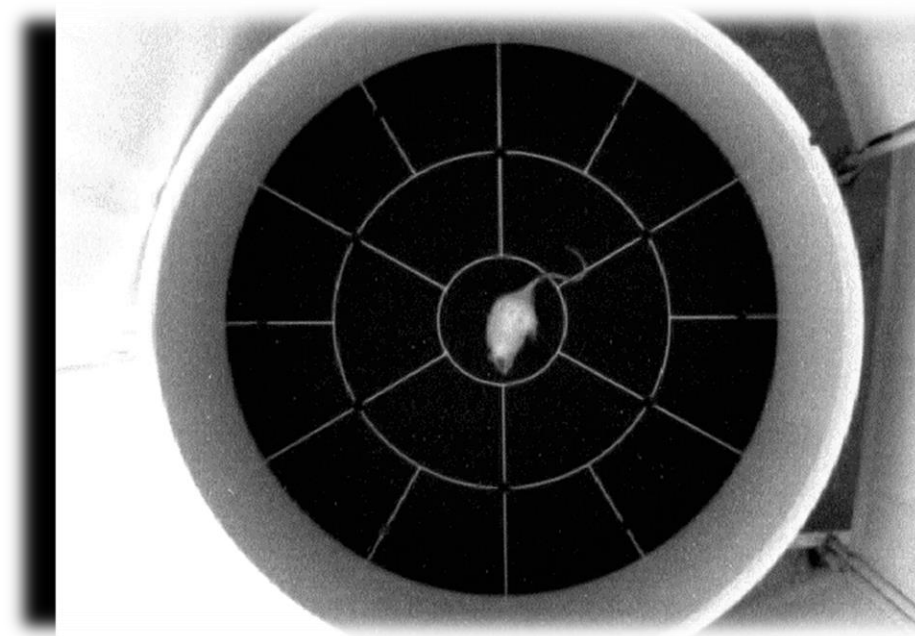
** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой

Тест «Открытое поле»

- Видеокомпьютерная регистрация проводилась в течение 3 минут.
- С помощью программы VideoMot определяли пройденную дистанцию, среднюю скорость перемещения, число посещений, число замираний, суммарное время замирания, время в центре поля, количество грумингов, стоек, заглядываний.

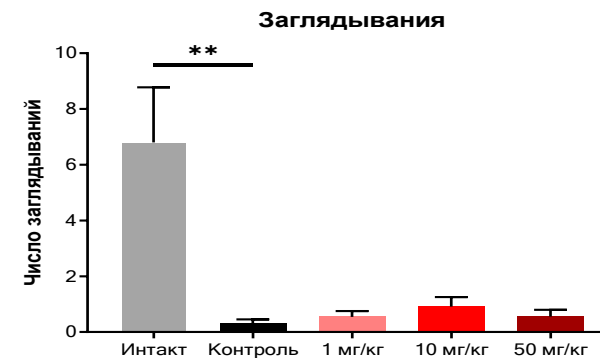
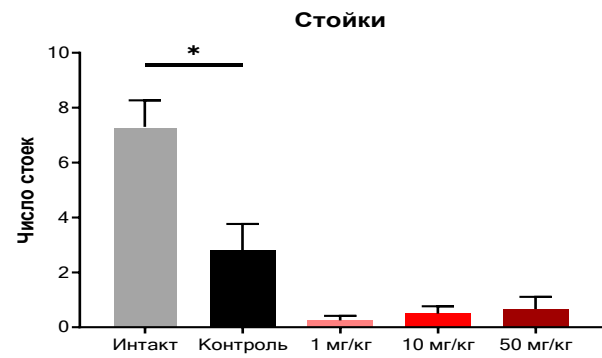
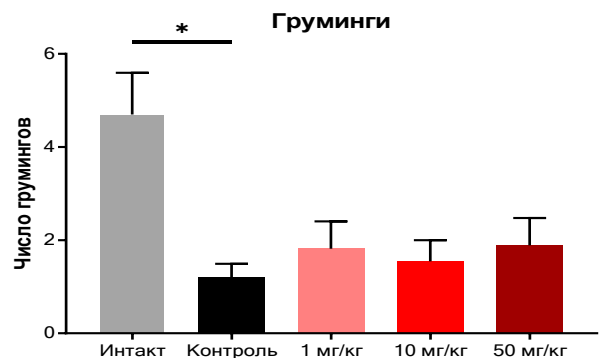
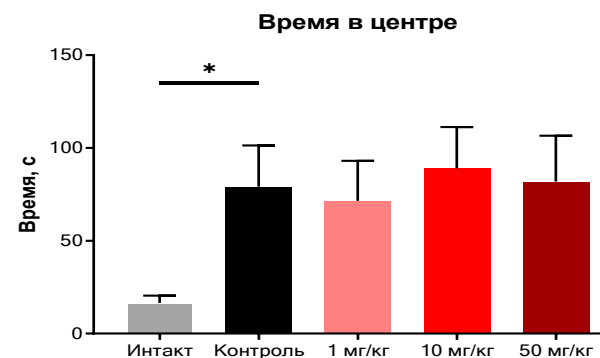
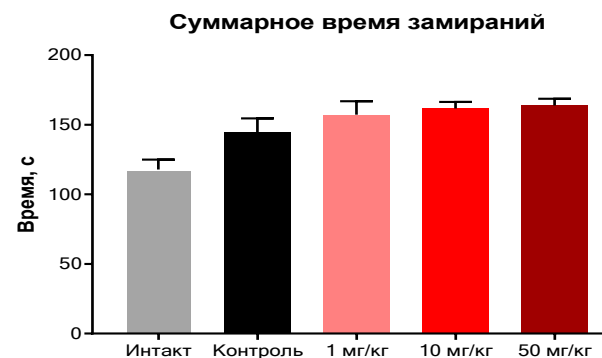
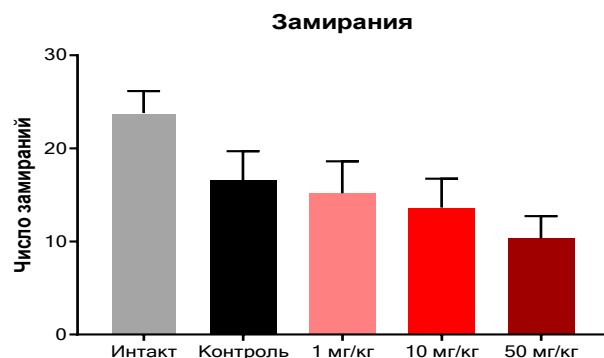
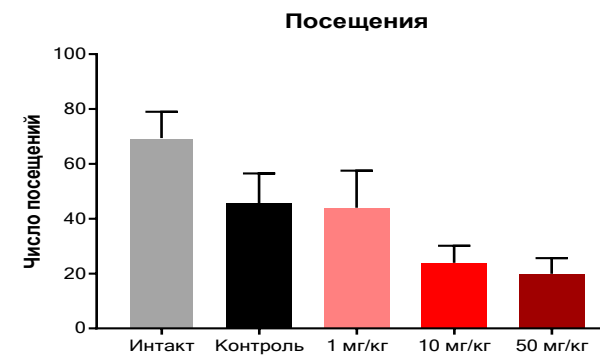
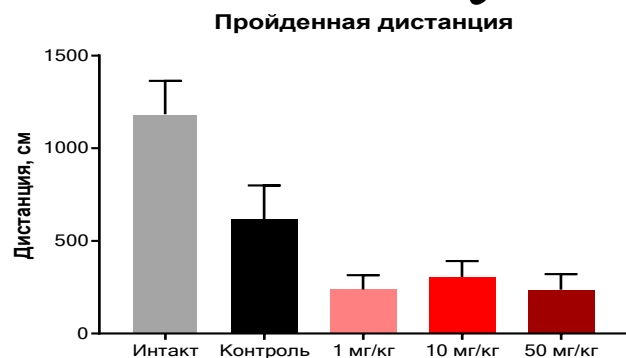


Интактное животное



Травмированное животное

Результаты теста «Открытое поле»



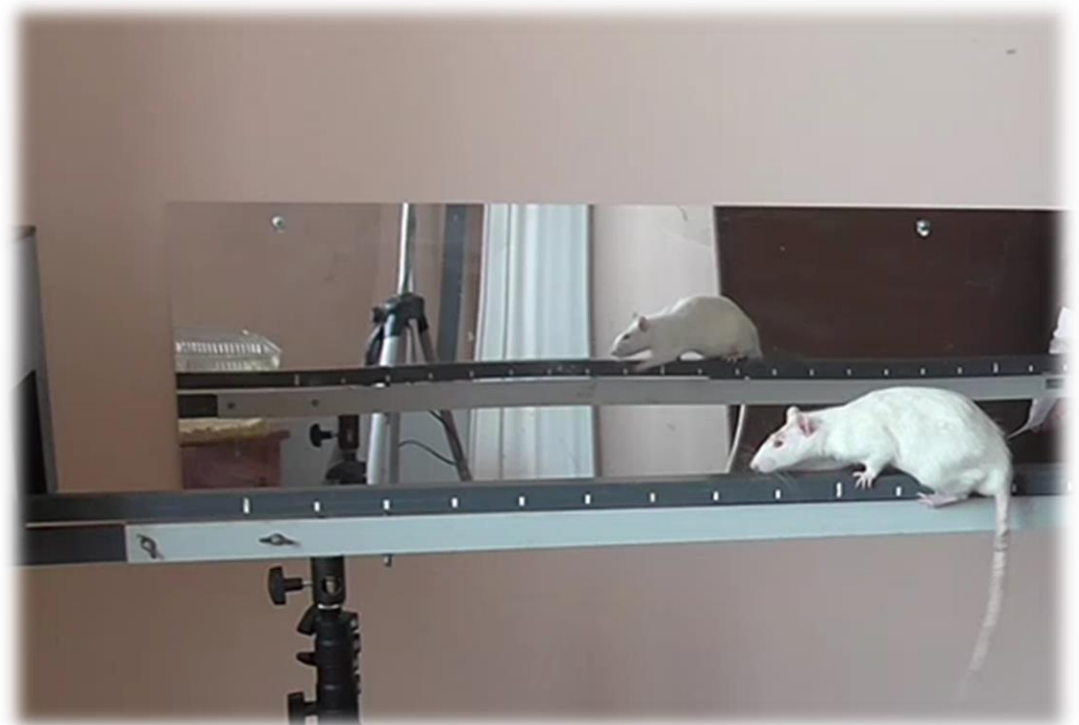
* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Тест «Сужающаяся дорожка»

- $$СД = \frac{\text{Ошибки} + 0,5 * \text{число соскальзываний}}{\text{Общее количество шагов}} * 100\%$$



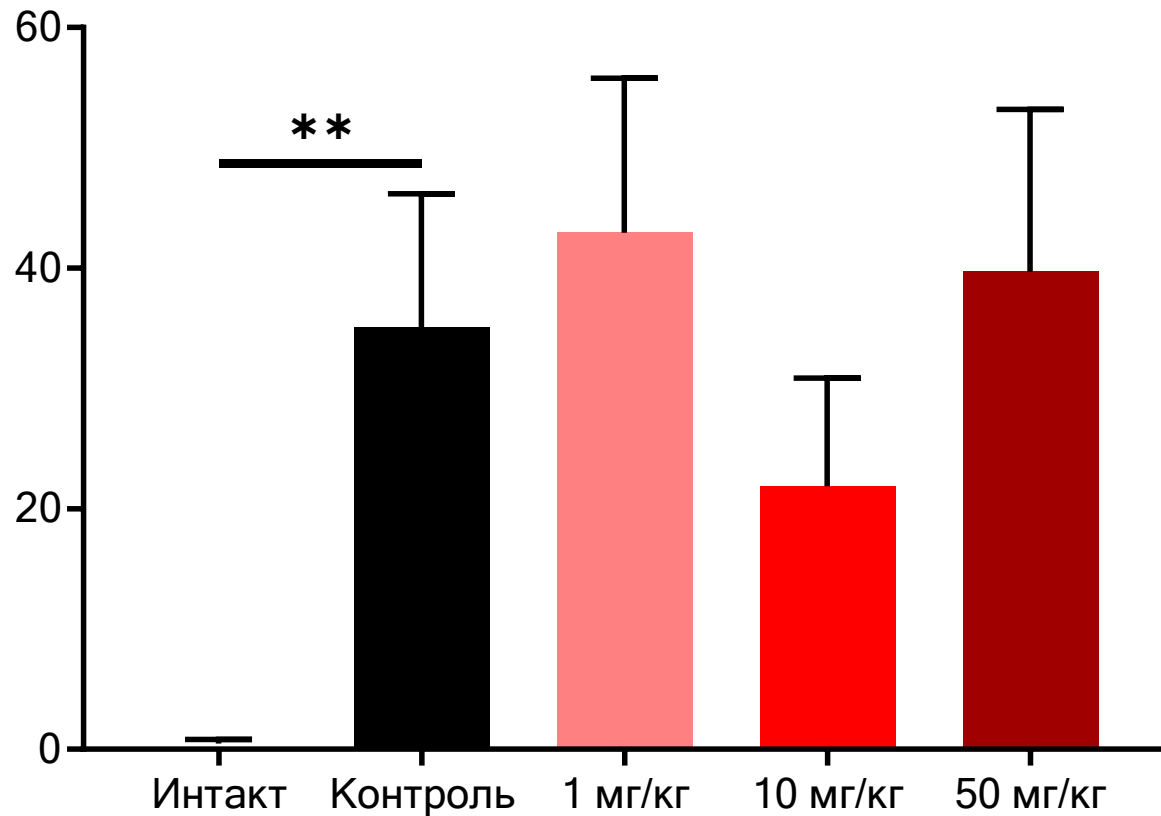
Интактное животное



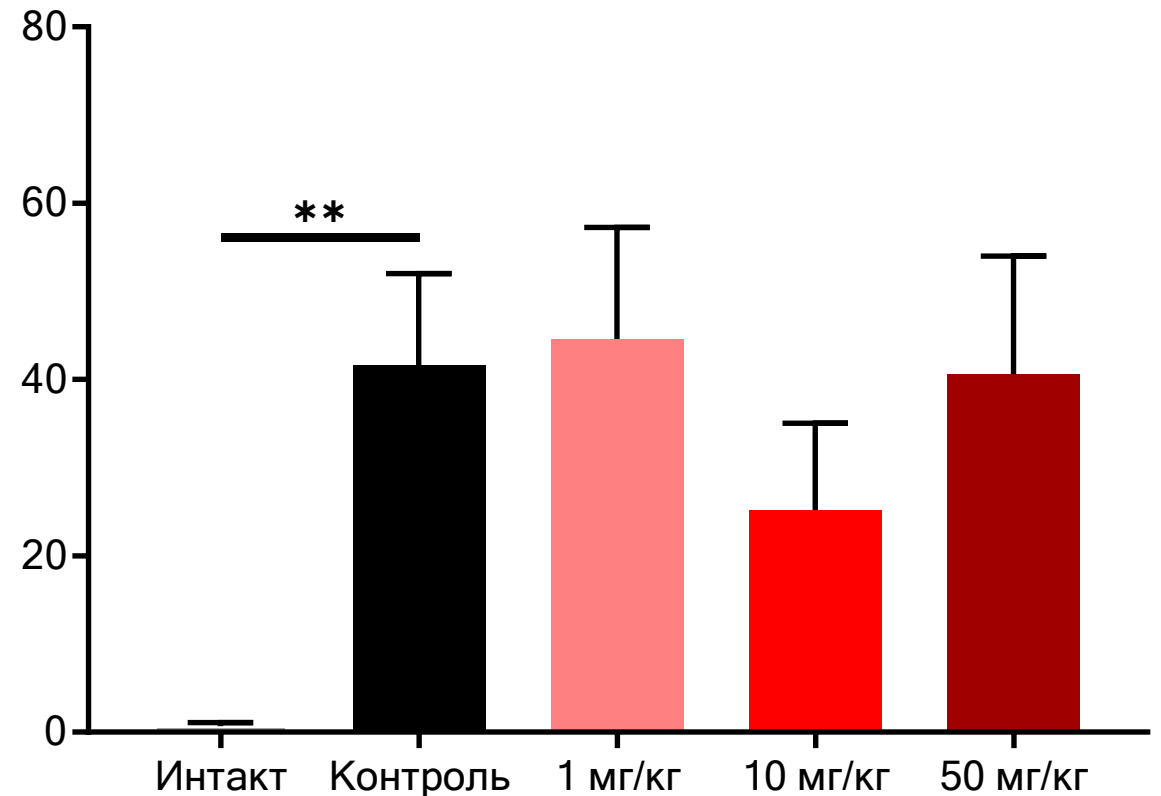
Травмированное животное

Выраженность сенсомоторного дефицита

СД-П, %



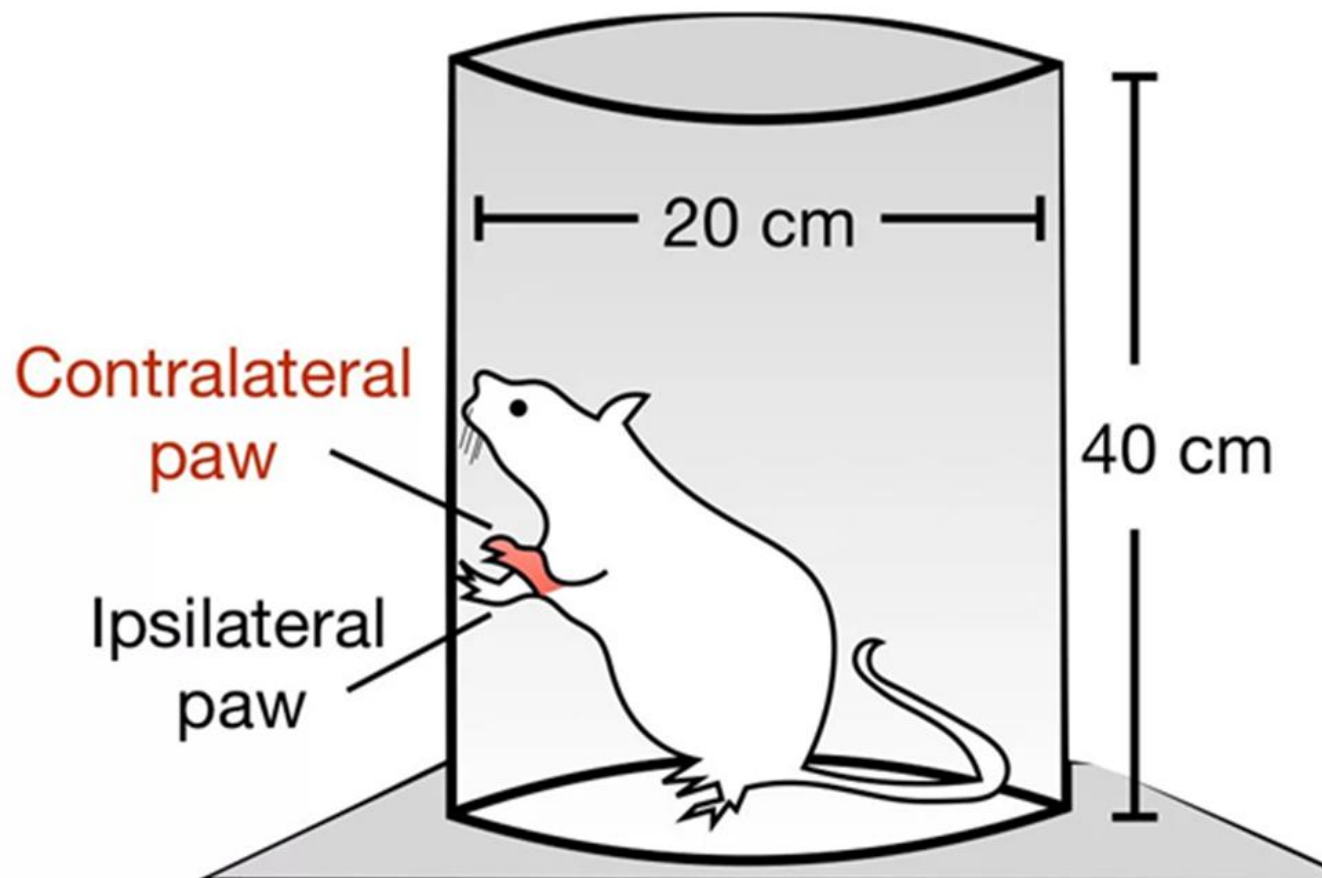
СД-З, %



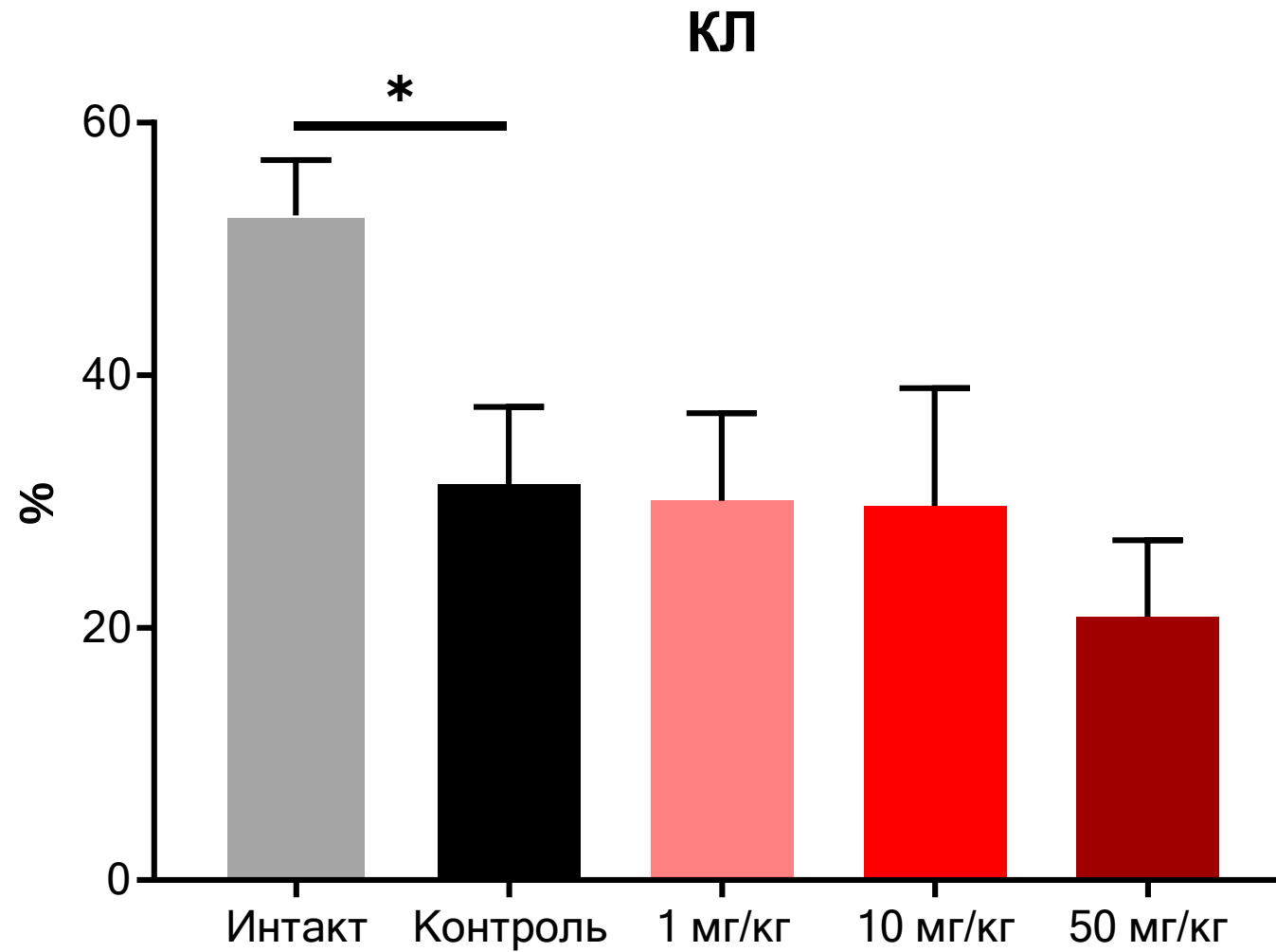
** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой

Тест «Цилиндр»

$$\text{КЛ\%} = \frac{(\text{Контр} + 0,5 * \text{одновр})}{(\text{Ипси} + \text{контр} + \text{одновр})} * 100\%$$



Результаты теста «Цилиндр»



* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

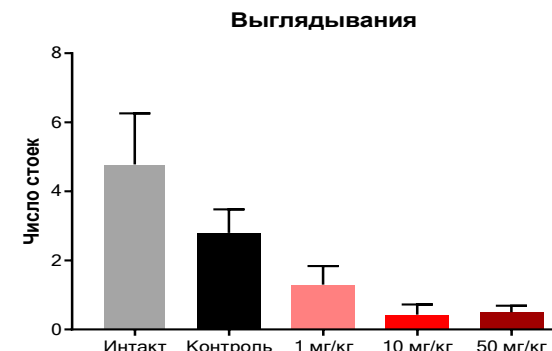
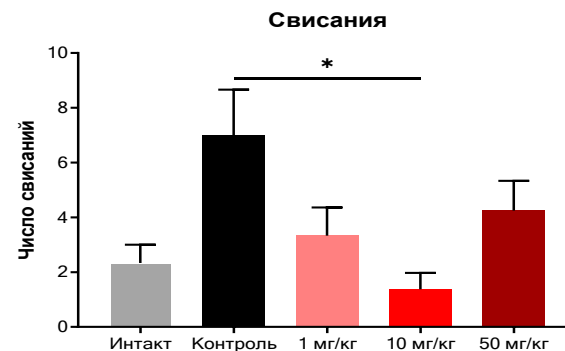
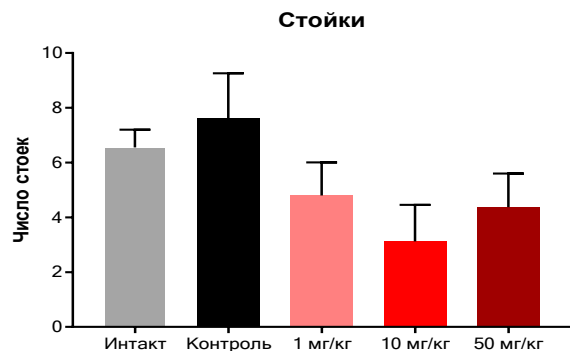
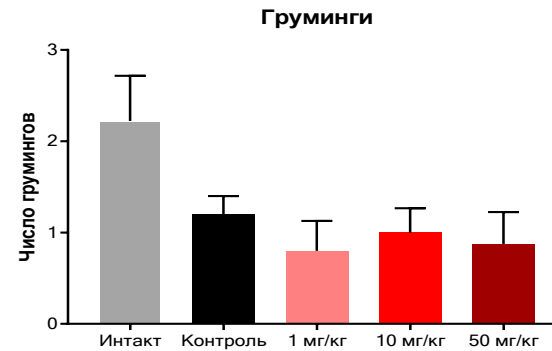
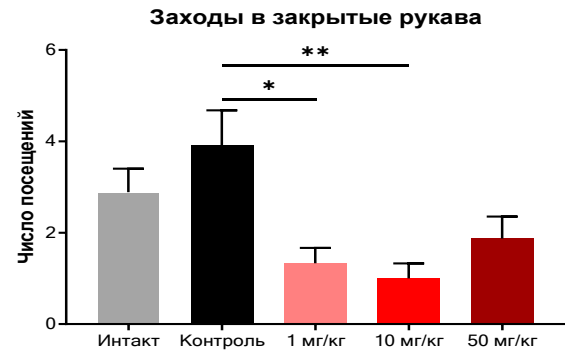
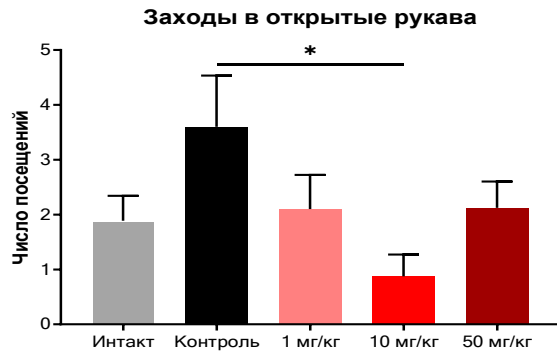
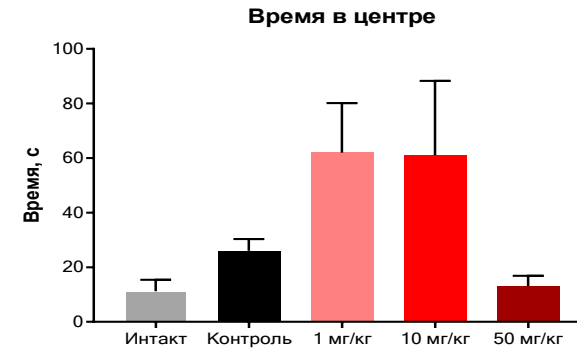
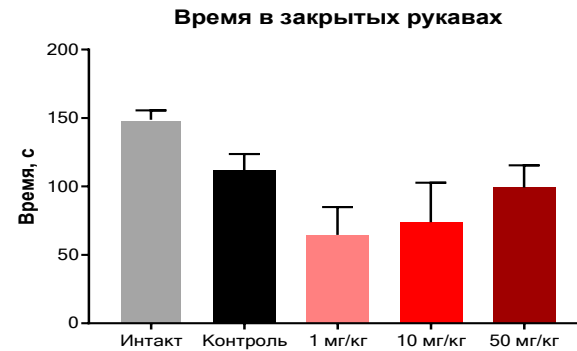
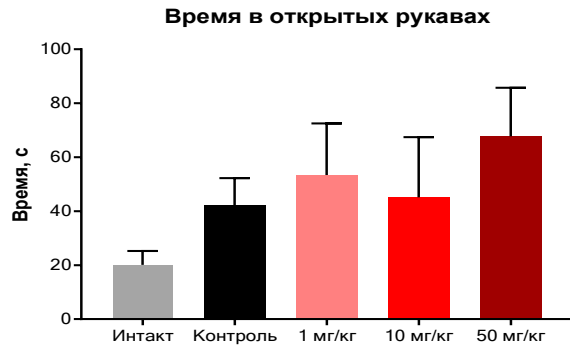
Тест «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ)

Оценивали:

- время нахождения в открытых рукавах (ОР)
- в закрытых рукавах (ЗР)
- время в центре
- количество заходов в темные/светлые рукава
- стойки
- выглядывания из темных рукавов
- свисания
- груминги



Результаты теста «ПКЛ»



** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Материалы и методы

Изучение влияния ПАМ на вегетативную нервную систему

- *Влияние ПАМ на перистальтику кишечника у мышей*

Эксперимент выполнен на **40 взрослых белых беспородных мышах-самках** массой **20-25 г**

Экспериментальные группы:

- Контроль
- 0,1 мг/кг
- 1 мг/кг
- 10 мг/кг

После введения ПАМ через **15 мин** всем животным вводили **внутрижелудочно маркер – 4% суспензию деактивированного угля**.

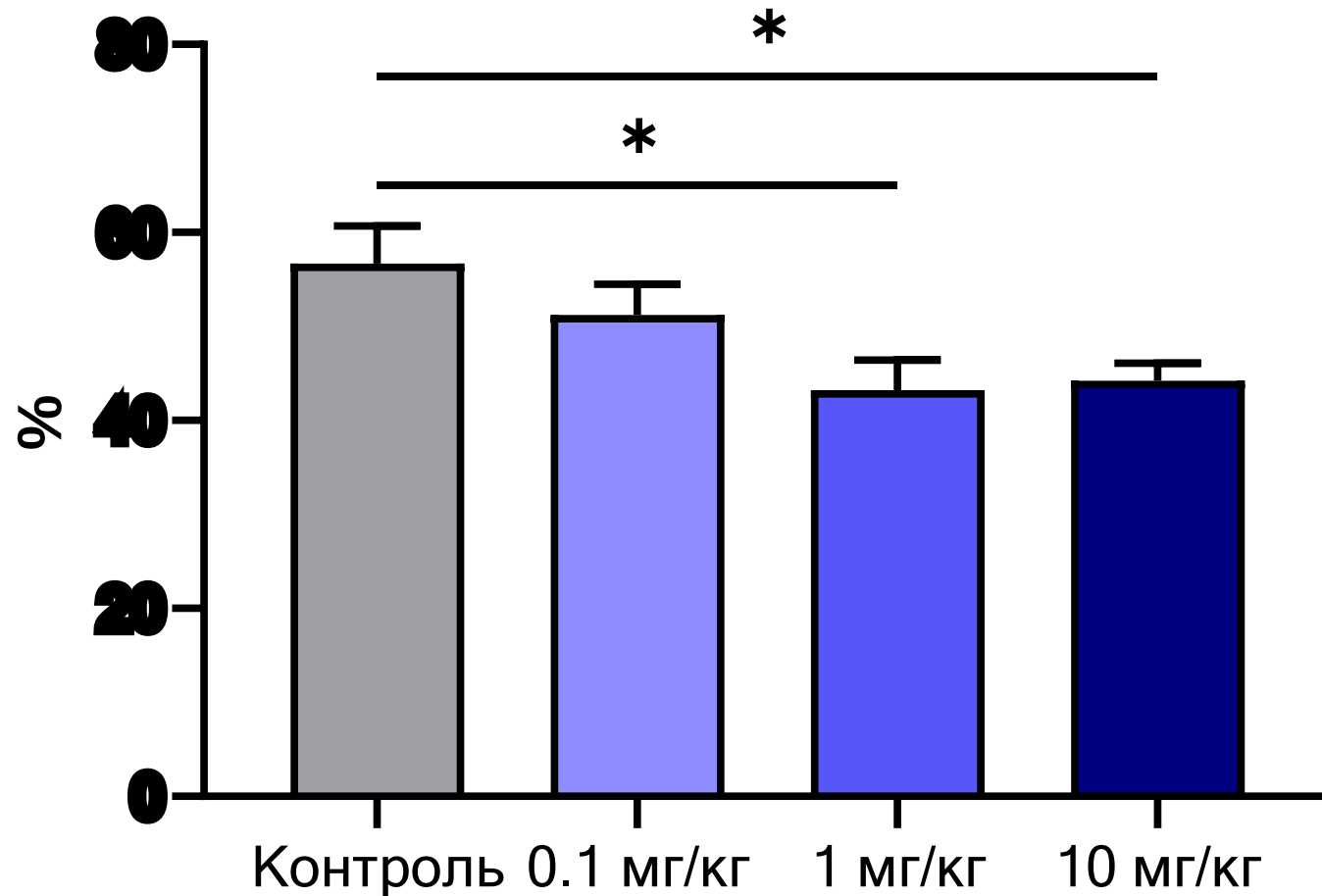
Через **40 мин** мышей выводили из эксперимента путем **цервикальной дислокации** и извлекали тонкую кишку от пилорического до илеоцекального сфинктера.

Измеряли расстояние, пройденное маркером, и всю длину тонкой кишки.

$$\text{Индекс перистальтики} = \frac{\text{Расстояние, пройденное маркером}}{\text{Длина тонкой кишки}} * 100\%$$

Результаты влияния ПАМ на перистальтику кишечника у мышей

Индекс перистальтики



* $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

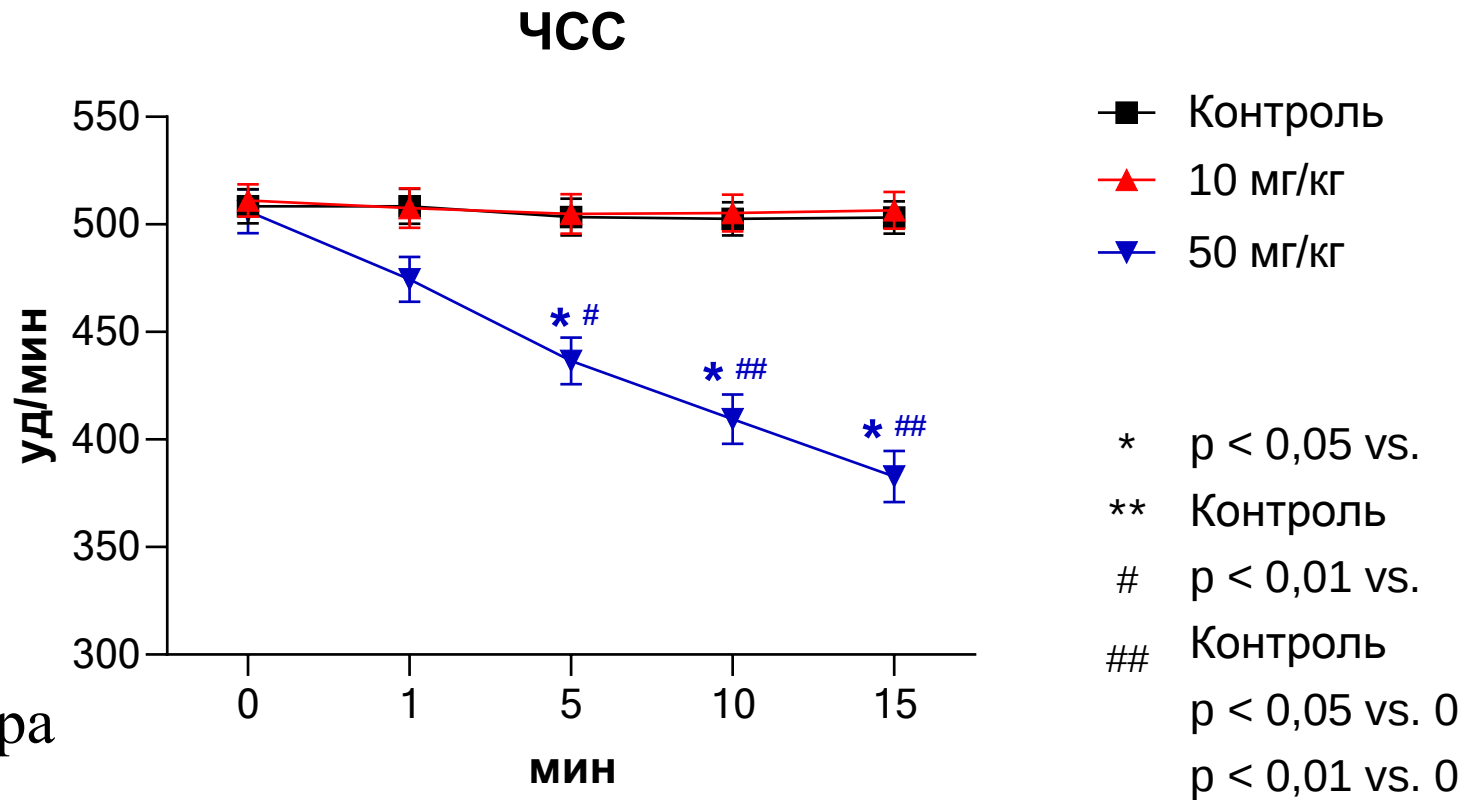
Изучение влияния ПАМ на вегетативную нервную систему

- *Влияние ПАМ на ЧСС у мышей*

Экспериментальные группы:

- Контроль
- ПАМ 10 мг/кг
- ПАМ 50 мг/кг

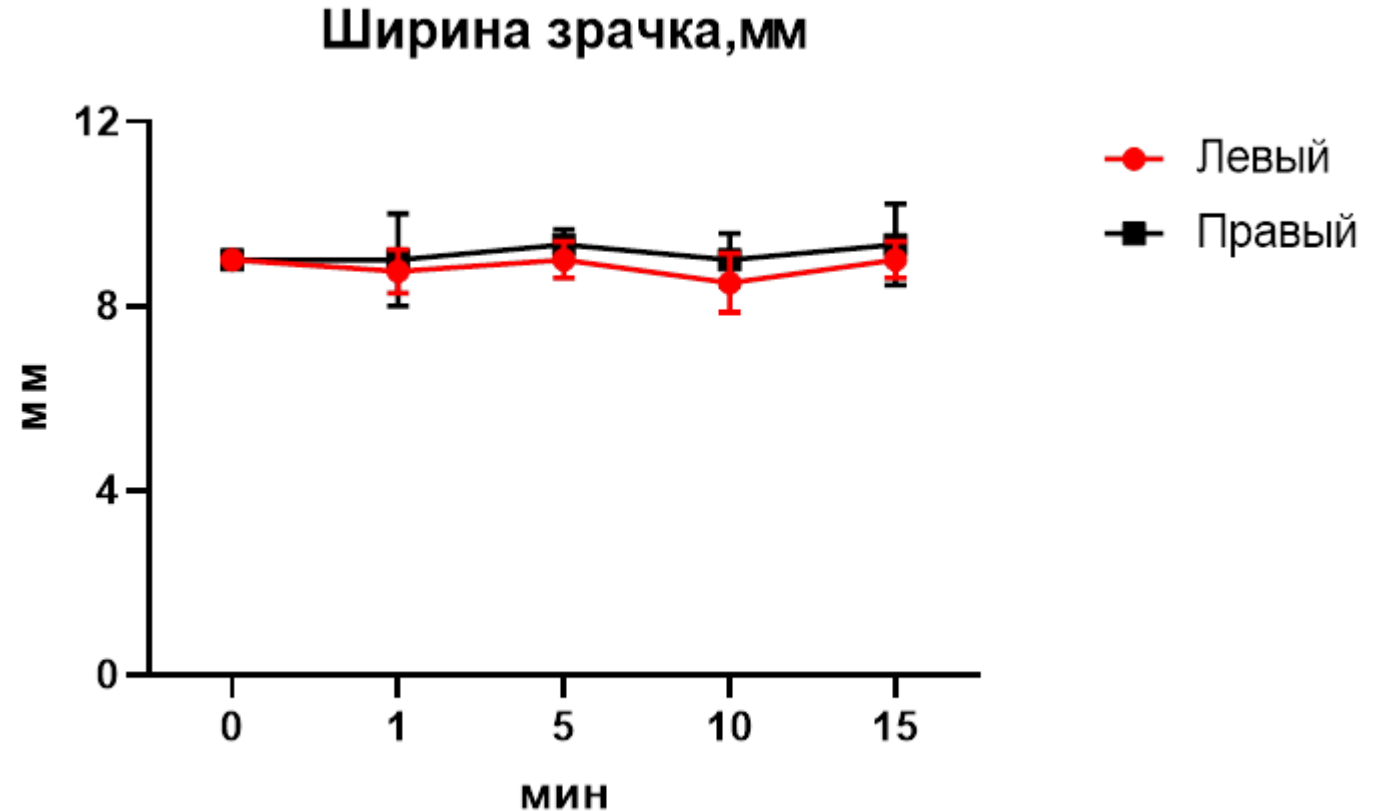
У наркотизированных хлоралгидратом животных измеряли ЧСС до введения и через 1, 5, 10, 15 минут после введения ПАМ или физ. раствора (контроль).



Изучение влияния ПАМ на вегетативную нервную систему

- *Влияние ПАМ на ширину зрачка у кроликов*

- ПАМ в концентрации 0,1% закапывали животным в оба глаза. Измеряли диаметр зрачка до введения и через 1, 5, 10, 15 минут после введения.



Выводы

- 1) ПАМ оказывают седативный эффект, который не опосредован их действием на NMDA-рецепторы.
- 2) Глутаматергическая система не влияет на реализацию поведенческих эффектов ПАМ у рыб *Danio rerio*. Наблюдалась тенденция к холиноблокирующему влиянию ПАМ.
- 3) ПАМ 33b в диапазоне доз 1-50 мг/кг не оказывает нейропротекторного действия на модели ЧМТ у крыс при введении спустя 1 ч. после травмы и в последующие 6 дней.
- 4) ПАМ 33b не оказывает холинолитического влияния на работу вегетативной нервной системы у мышей и кроликов.

Мультидисциплинарные аспекты работы

Лекарственные формы промышленного производства:

- Раствор для приема внутрь
- Раствор для в/в и в/м введения
- Лиофилизат для приготовления р-ра для в/м введения
- Капсулы
- Таблетки, покрытые пленочной оболочкой

Лекарственные растения:



Контроль качества ПАМ:

Описание: Светло-желтый аморфный порошок

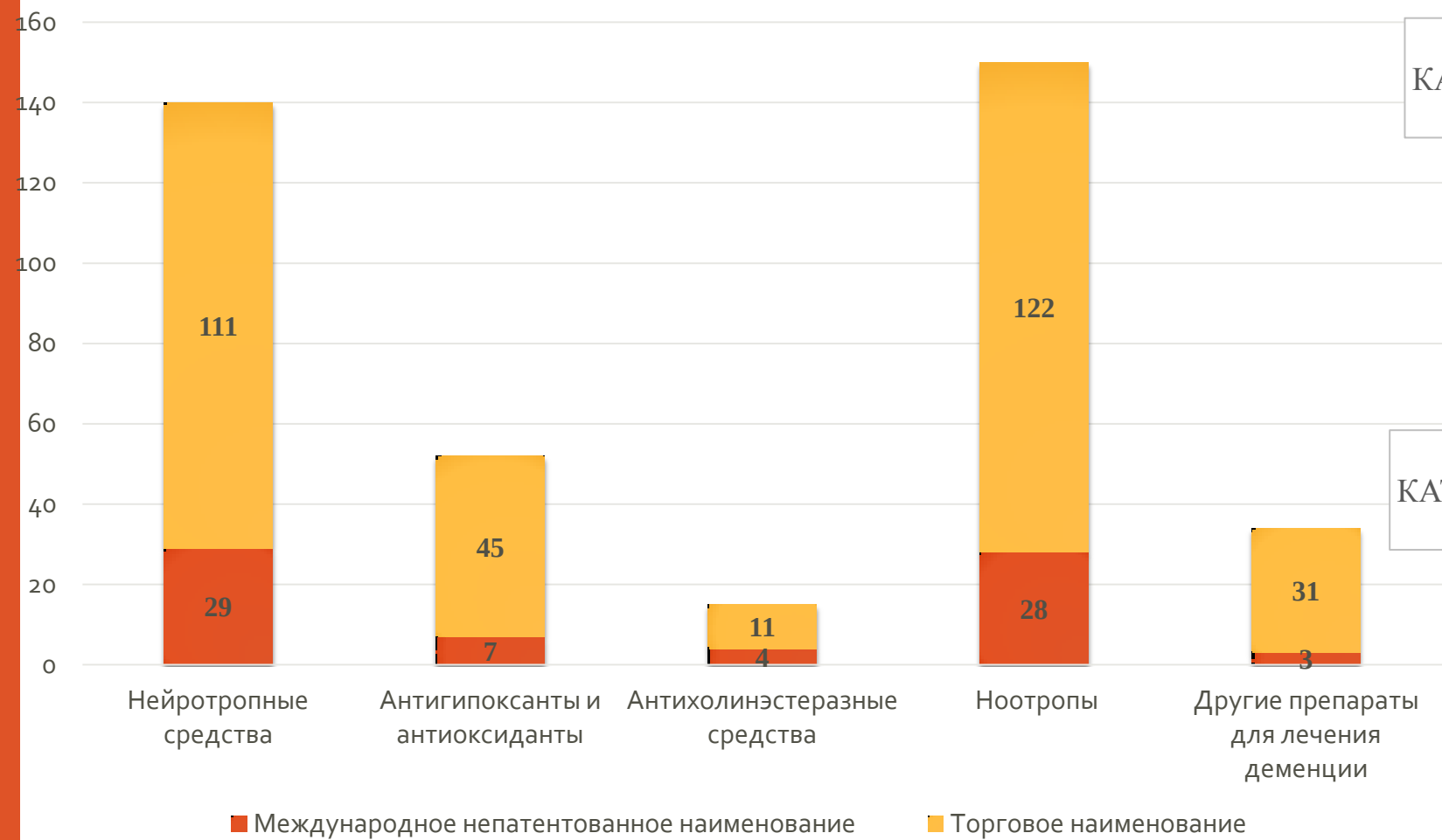
Растворимость: УР или МР в воде

Подлинность: ЯМР-спектроскопия

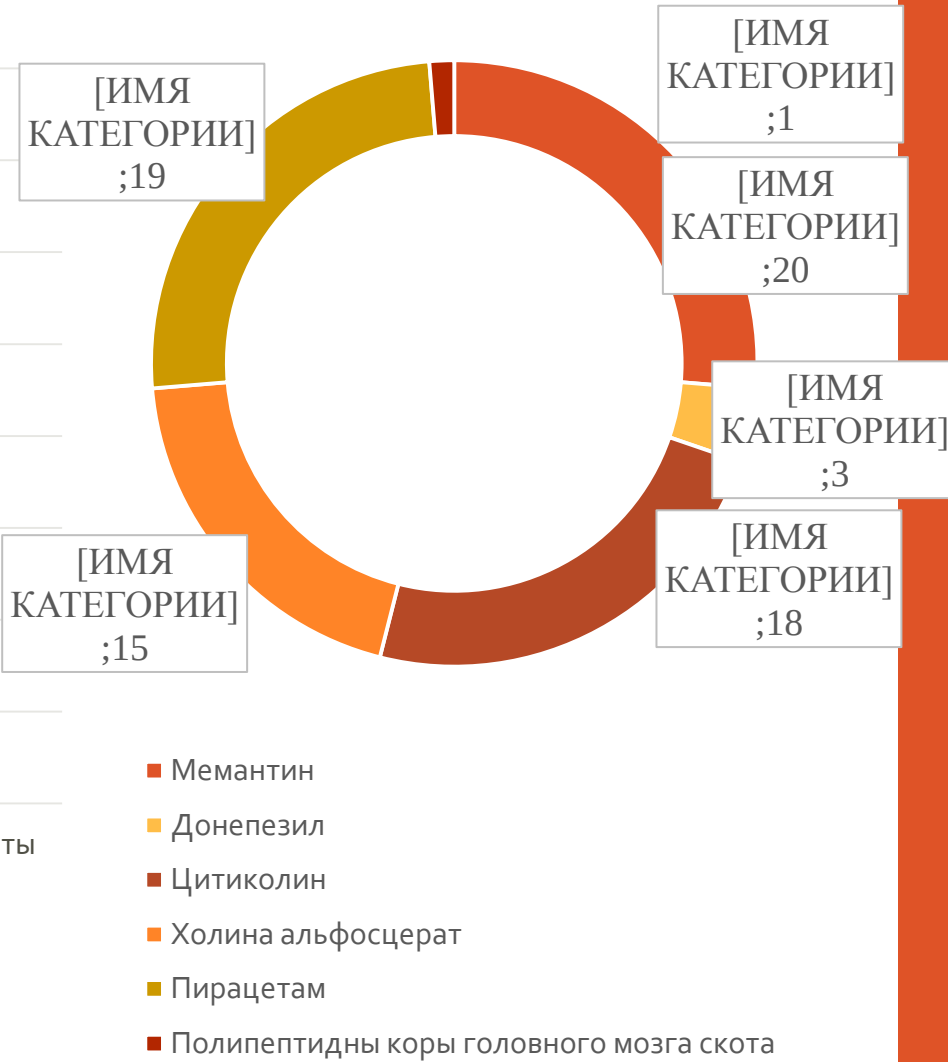
Compd.	R ¹⁻³	R ⁴	R ⁵	IC ₅₀ , μ M or % inhibition at 24 μ M		NMDA
				eqBChE	EeAChE	
9a	6-Cl	Me	Me	14.5 $\pm$ 0.4	15 %	28 $\pm$ 6
9b	–	Me	Me	14.7 $\pm$ 0.5	18 %	nd
9c	6-Me	Me	Me	12 $\pm$ 2	31 %	nd
9d	6-MeO	Me	Me	22 $\pm$ 1	15 %	nd
9e	6-Br	Me	Me	9 $\pm$ 1	36 %	nd
9f	6-F	Me	Me	15 $\pm$ 1	30 %	nd
9g	6-NO ₂	Me	Me	8 $\pm$ 1	4.0 $\pm$ 0.1	nd
9h	7-Me	Me	Me	7.6 $\pm$ 0.1	34 %	nd
9i	6,7-diMe	Me	Me	4.8 $\pm$ 0.3	23 $\pm$ 3	nd
9j	6-Me-8-Br	Me	Me	1.2 $\pm$ 0.1	7 $\pm$ 1	51 $\pm$ 12
9k	6-Cl-8-Br	Me	Me	4.0 $\pm$ 0.6	11 $\pm$ 1	Nd ^(a)
9l	6,7-diF	Me	Me	17 %	6.4 $\pm$ 0.2	nd
9m	6-Br-7-MeO	Me	Me	24 $\pm$ 2	40 %	nd
24a	6-Cl	H	H	28 %	15 $\pm$ 1	nd
25a	6-Cl	Me	H	23.6 $\pm$ 0.4	47 %	nd
26a	6-Cl	Et	H	19.5 $\pm$ 0.1	43 %	nd
27a	6-Cl	–CH ₂ CH ₂ –		16 $\pm$ 2	19 $\pm$ 3	nd
28a	6-Cl	Pr	H	5.0 $\pm$ 0.8	38 %	nd
29a	6-Cl	iPr	H	46 %	13 %	nd
30a	6-Cl	Bu	H	12.8 $\pm$ 0.5	46 %	nd
31a	6-Cl	Et	Et	4.9 $\pm$ 0.3	21 %	25 $\pm$ 5
32a	6-Cl	Pen	H	25.9 $\pm$ 0.5	42 %	nd
33a	6-Cl	–(CH ₂) ₅ –		1.6 $\pm$ 0.1	14 %	15 $\pm$ 4
33b	6-Me-8-Br	–(CH ₂) ₅ –		0.42 $\pm$ 0.03	7 $\pm$ 1	8 $\pm$ 3

Анализ рынка ЛП

Анализ рынка нейропротекторных средств



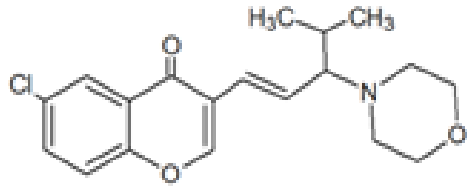
Торговые наименования



Благодарю за внимание!

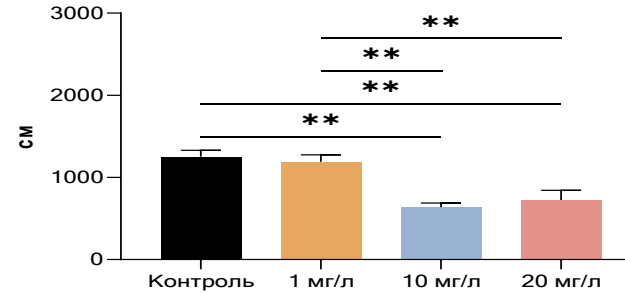
Результаты ПАМ 9a

9a

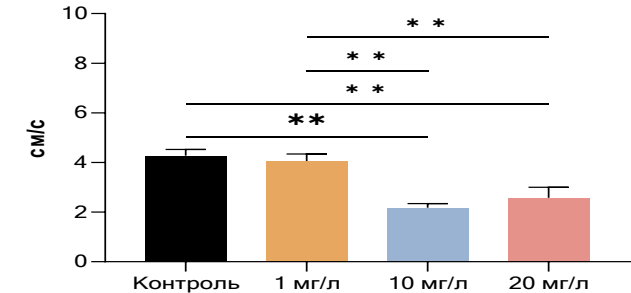


HCl

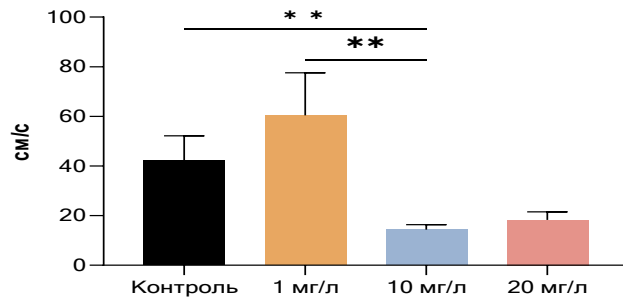
Проплытая дистанция



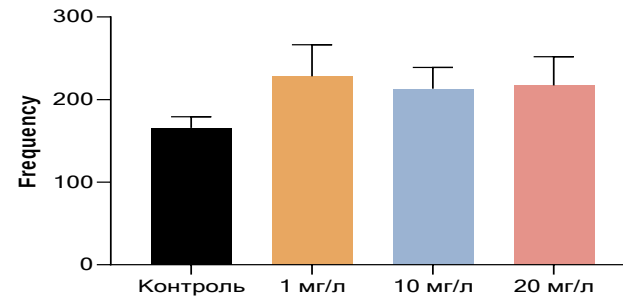
Средняя скорость



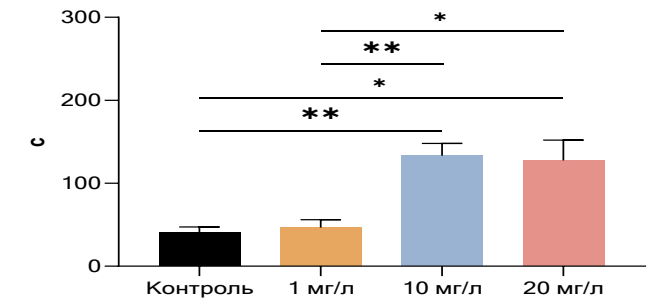
Максимальная скорость



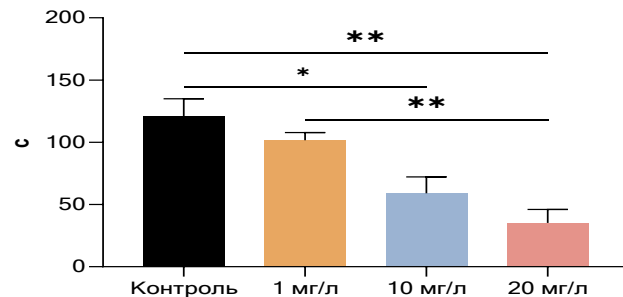
Частота замираний



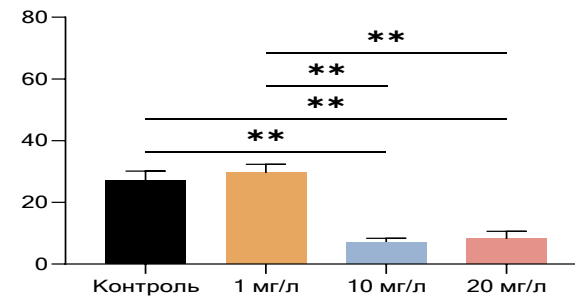
Время в неподвижном состоянии



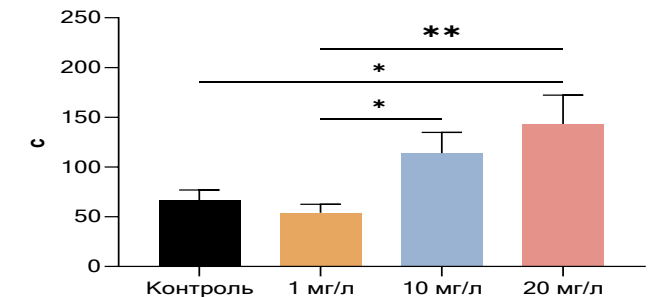
Время в верхней части



Частота переходов



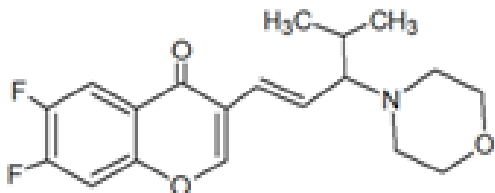
Латентность первого перехода



** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

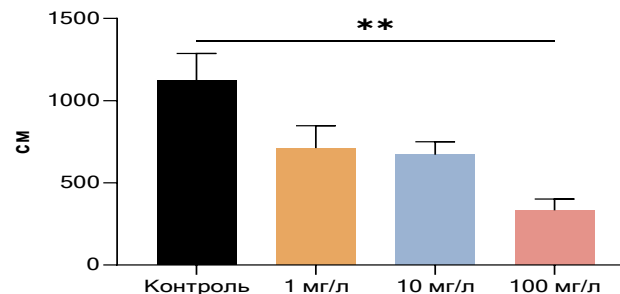
Результаты ПАМ 9L

9L

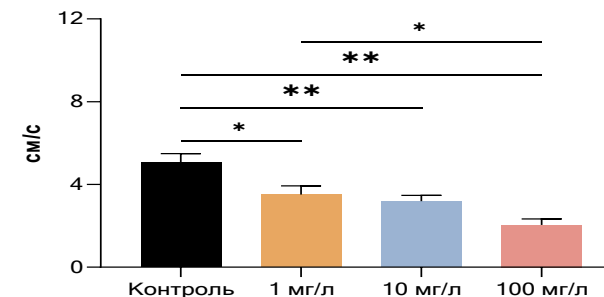


HCl

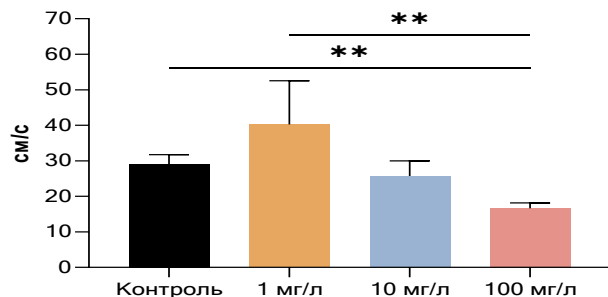
Проплытая дистанция



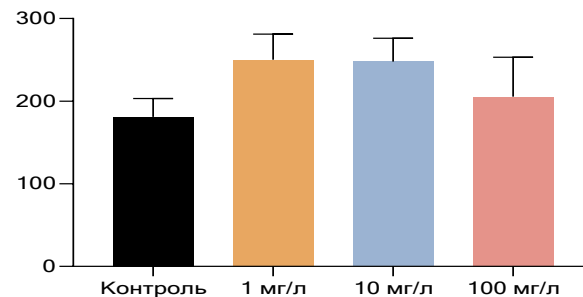
Средняя скорость



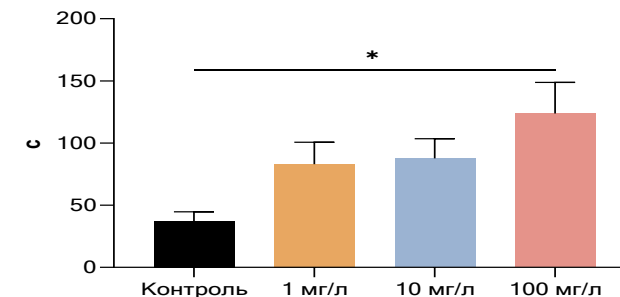
Максимальная скорость



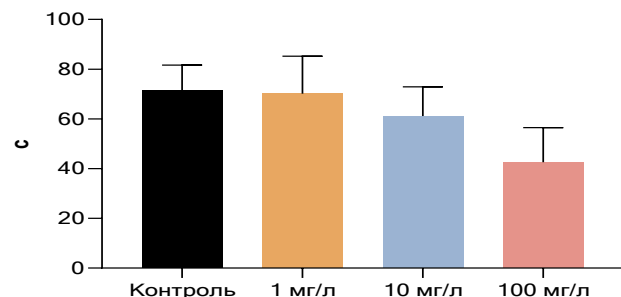
Частота замираний



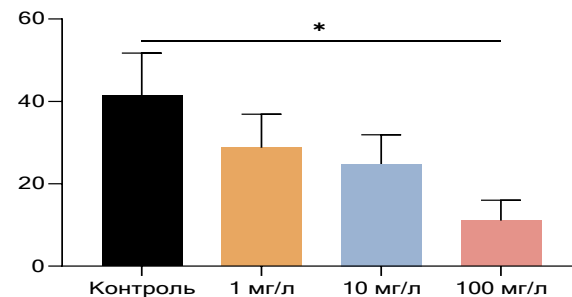
Время в неподвижном состоянии



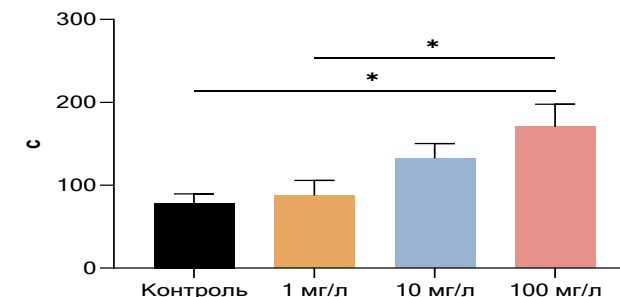
Время в верхней части



Число переходов



Латентность первого перехода



** $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой