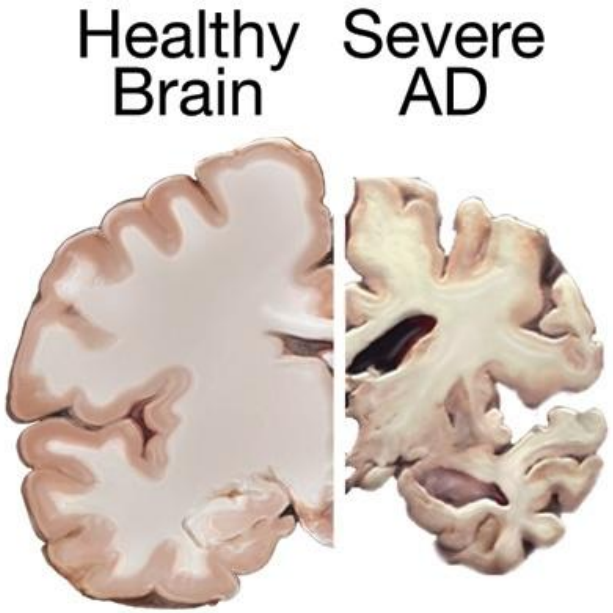
Дипломна магістерська робота на тему:

“Обгрунтування складу фармацевтичної композиції для лікування нейродегенеративних захворювань”

Виконав: студент
групи МгХФ-16
Горюшин Ілля
Керівник: к.х.н., доцент
Бессарабов В.І.

Нейродегенеративні захворювання – це захворювання, які супроводжуються порушенням функціонування нервової системи, внаслідок деструкції нервових клітин та зв’язків.



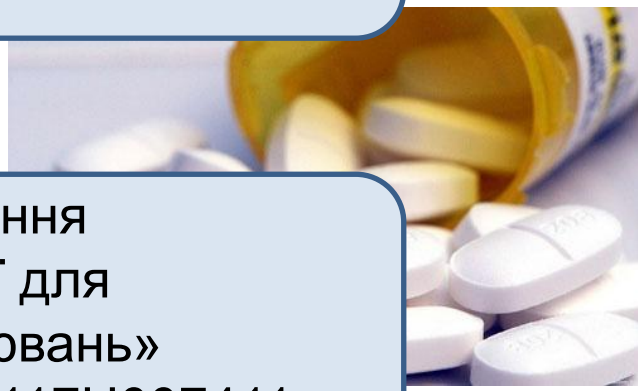
Загальносвітова захворюваність хворобою Альцгеймера:

- на 2010 рік – 35,6 млн чоловік;
- до 2030 року збільшиться до 65,7 млн;
- до 2050 року – до 115,4 млн;

Актуальність теми

На даний час існує лише симптоматичне лікування нейродегенеративних захворювань, яке, до того ж, викликає низку побічних ефектів, які можуть бути фатальними для людей літнього віку.

Внаслідок цього є актуальною розробка ефективного, малотоксичного лікарського засобу, який би обумовлював мінімальну кількість побічних ефектів.



МДР виконана в рамках НДР «Розроблення геріатричної фармацевтичної композиції для лікування нейродегенеративних захворювань»
№ ДЗ/30-2017/874 № держреєстрації 0117U007411

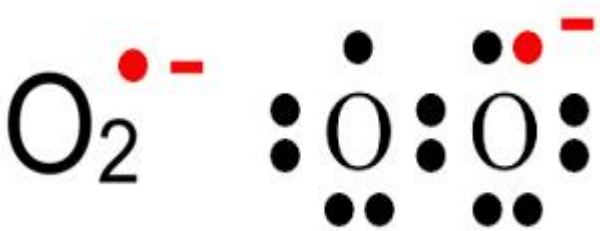
Мета роботи:

розробити модельний склад геріатричного лікарського засобу для лікування нейродегенеративних захворювань.

Причини та механізми розвитку нейродегенеративних захворювань

- Згідно сучасним дослідженням, однією з основних причин розвитку нейродегенеративних захворювань є **оксидативний стрес**, - процес в ході якого в тканині накопичується велика кількість вільних радикалів, під дією яких руйнуються клітинні структури.

- Основні механізми розвитку багатьох нейродегенеративних захворювань зв’язані с дефіцитом медіаторів в нервовій тканині. Наприклад, в процесі патогенезу хвороби Альцгеймера та міастенії виникає дефіцит ацетилхоліну.



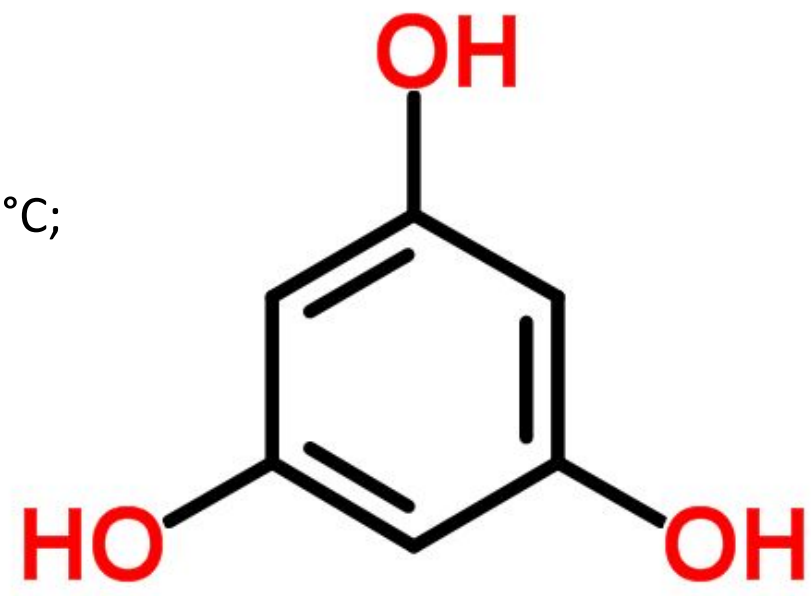
Флороглюцинол (1,3,5-бензетріол) – органічна, природня сполука, яка представляє собою похідне фенолу. В 1855 році австрійській хімік Heinrich Hlasiwetz відкрив флороглюцинол в продуктах гідролізу флоретину, котрий отримували із кори фруктових дерев.

Молекулярна маса: 126,110 D ;

Температура плавлення: 218 °C;

Log P: 0,2;

LD_{50} : 5,8 г/кг (миші, перорально);



Комп'ютерне прогнозування можливих плейотропних фармакологічних ефектів флороглюцинолу в системі PASS online

Обрані потенційні плейотропні фармакологічні ефекти флороглюцинолу за даними розрахунку в системі PASS online

P_a	P_i	Потенційна фармакологічна активність
0,941	0,004	Агоніст цілісності мембрани
0,857	0,001	Інгібітор проникності мембрани
0,826	0,004	Інгібітор холінестерази
0,754	0,005	Антимутаген
0,731	0,004	Поглинач кисню
0,682	0,007	Відновник

Дослідження антиоксидантних властивостей флороглюцинолу в хімічних окисно-відновних системах

Антиоксидантні властивості флороглюцинолу визначались за здатністю інгібувати процес аутоокиснення адреналіну в лужному середовищі.

Реактиви: карбонатний буфер, pH= 10,65; адреналіну гідротартрат 0,18% (готова аптечна форма); флороглюцинолу дигідрат в концентраціях 50, 100 та 200 мкМ; аскорбінова кислота в концентраціях 50, 100 та 200 мкМ.

Обладнання: УФ-спектрофотометр Optizen POP (Mecasys, Південна Корея).

Параметри досліду: довжина хвилі – 347 нм; час – 5 хвилин; інтервал – 15 с.

Результати досліджень:

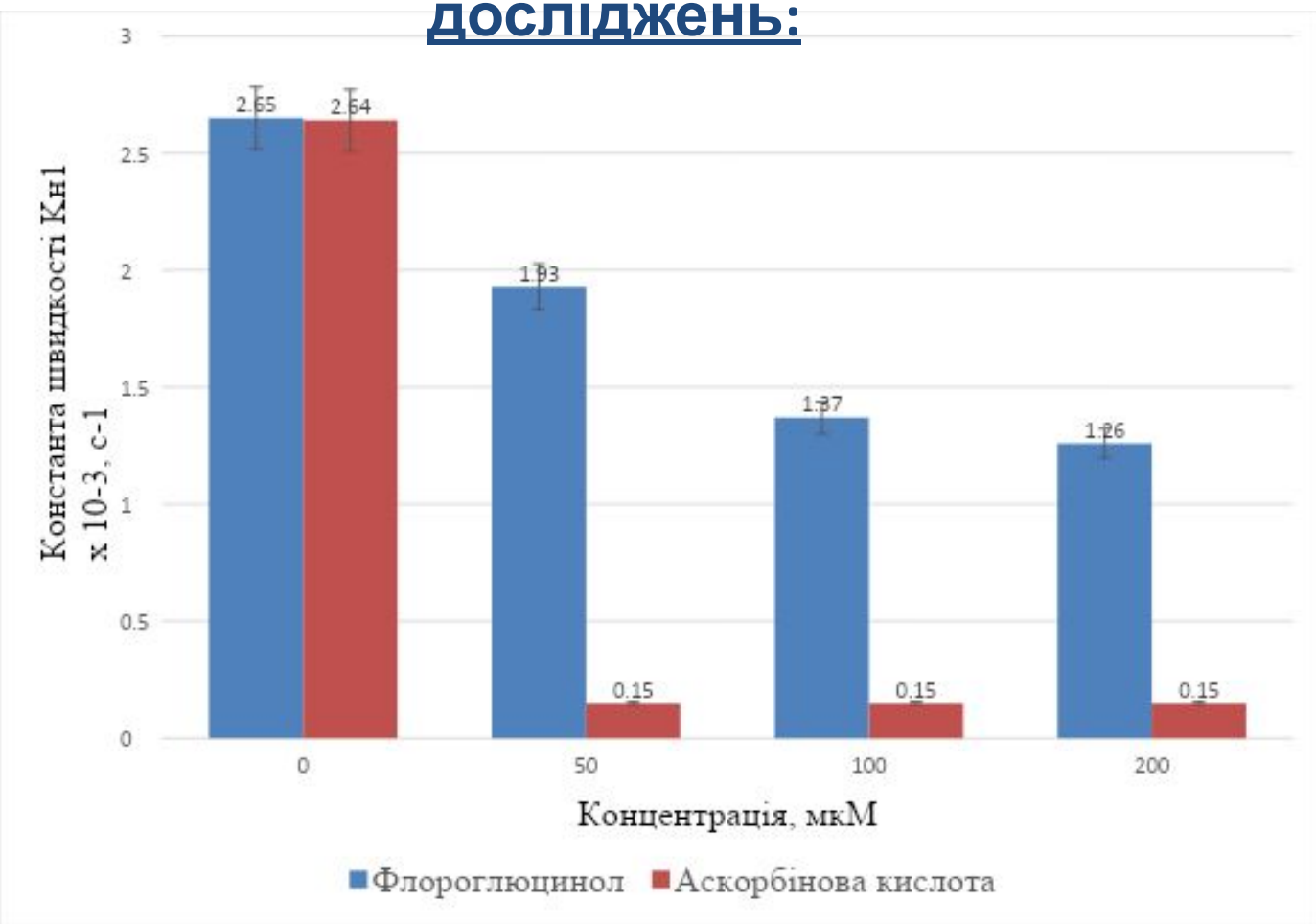


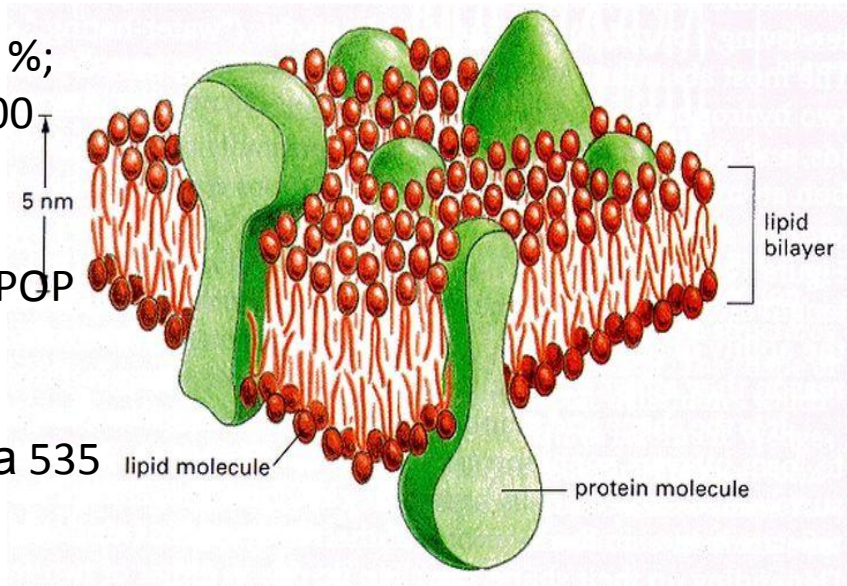
Рисунок 1 – Залежність величин константи швидкості першого порядку аутоокиснення адреналіну від концентрацій флорглюцинолу та аскорбінової кислоти, мкМ.

Дослідження антиоксидантних властивостей флороглюцинолу за здатністю інгібувати перекисне окиснення ліпідів *ex vivo*

Реактиви: контрольна сироватка ЛІОНОРМ ГУМ Н (Чехія, Erba Lachema s.r.o.); розчин ортофосфорної кислоти 2%, pH= 1,3; ТБК 0,8 %; флороглюцинолу дигідрат в концентрації 100 мкМ; н-бутанол.

Обладнання: УФ-спектрофотометр Optizen POP (Mecasys, Південна Корея).

Параметри досліду: довжина хвилі – 515 та 535 нм.



Результати досліджень:

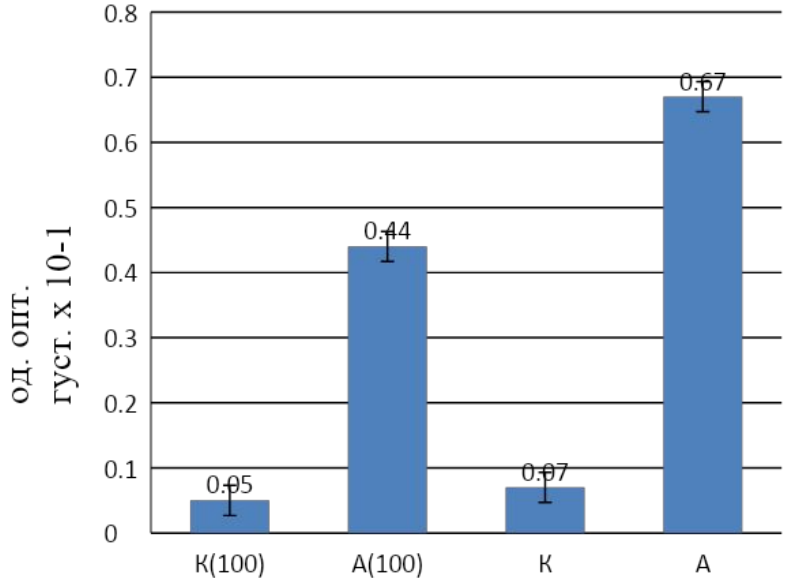


Рисунок 2 – Залежність оптичної густини проб від присутності флороглюцинолу в концентрації 100 мкМ при λ= 515 нм.

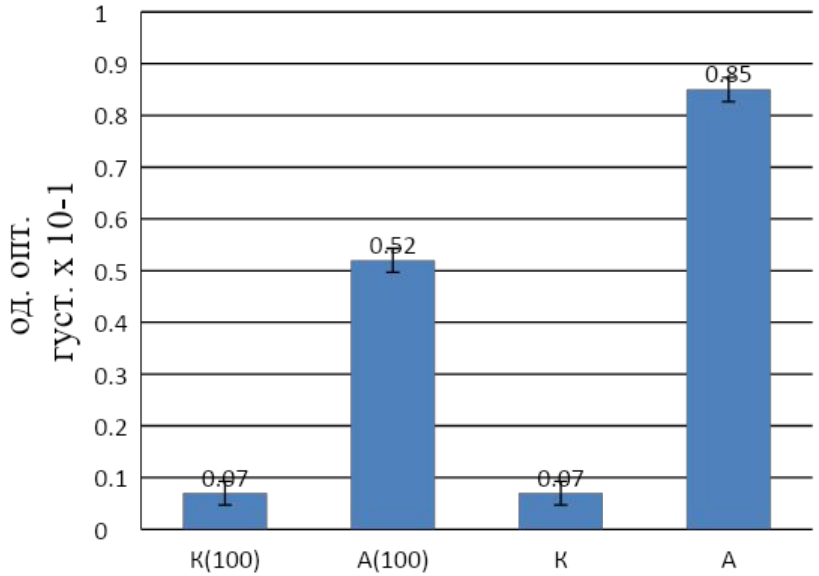


Рисунок 3 – Залежність оптичної густини проб від присутності флороглюцинолу в концентрації 100 мкМ при λ= 535 нм.

Значення параметрів в таблицях:

$К_{(100)}$ – оптична густина контрольної проби (без сироватки) при додаванні флороглюцинолу в концентрації 100 мкМ;

К – оптична густина в контрольній пробі;

$А_{(100)}$ – оптична густина в аналітичній пробі (з сироваткою) при додаванні флороглюцинолу в концентрації 100 мкМ;

А – оптична густина в аналітичній пробі

Оцінка потенційного інгібуючого впливу флороглюцинолу на бутирилхолінестеразу сироватки крові людини за допомогою методу молекулярного докінгу

Молекулярний докінг – метод дослідження афінності ліганду до активного центру білка-мішені на основі оцінки енергії утворення комплексу ліганд-білок.

Результати оцінки енергії зв'язування молекул (в умовних одиницях скорінгу) при молекулярному докінгу бутирилхолінестерази, флороглюцинолу та модельних речовин

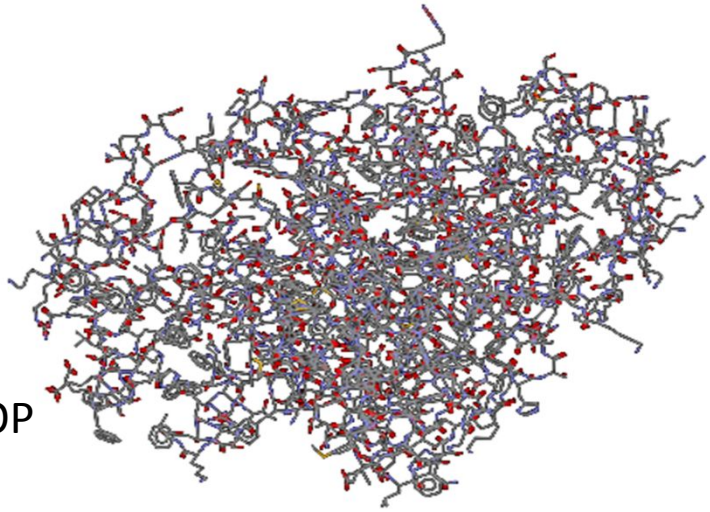
Назва	Молекулярна маса	HVR (P/L)	BChE (flex)	BChE (rigid)
Флороглюцинол	126,11	2,027	37,34	34,72
Бутирілтіохолін йодид	317,23	2,332	54,02	40,54
Параоксон	275,06	2,332	50,32	43,08
Метилпаратіон	263,07	3,109	42,85	39,72
Армін	259,20	2,332	50,04	41,2

Рисунок 4 – Візуалізація зв’язування флороглюцинолу з активним центром бутирилхолінестерази.

Експериментальне визначення інгібування флороглюцинолом бутирилхолінестерази сироватки крові людини

Визначення активності бутирилхолінестерази сироватки крові людини проводилось i*n vitro* спектрофотометрично, використовуючи модифікований метод Еллмана.

Реактиви: контрольна сироватка ЛІОНОРМ ГУМ Н (Чехія, Erba Lachema s.r.o.); реактив А (буфер фосфатний 7,6 pH – 90 ммоль/л, гексаціаноферат калію (III) – 2,4 ммоль/л); реактив Б (бутирилтіохолін – 30 ммоль/л); розчин флороглюцинолу – 25, 50, 100 мкМ.



Обладнання: УФ-спектрофотометр Optizen POP (Mecasys, Південна Корея).

Параметри досліду: довжина хвилі – 405 нм; час – 7 хвилин; інтервал – 15 секунд; поправочний коефіцієнт - 0,5405405 ммоль\л;

Результати досліджень:

Результати оцінки прийнятності кінетичної моделі з ранжируванням результатів за критерієм значення коефіцієнту кореляції R^2 при інгібуванні бутирилхолінестерази сироватки крові людини флороглюцинолом в умовах *ex vivo*

Ранг за R^2	Рівняння (модель)	R^2	Проходження тесту	Збіжність
1	Mixed (Partial)	0.94808	pass	Yes
2	Noncompetitive (Partial)	0.93999	pass	Yes
3	Mixed (Full)	0.93119	fail	Yes
4	Competitive (Partial)	0.92010	pass	Yes
5	Noncompetitive (Full)	0.91739	fail	Yes
6	Competitive (Full)	0.91294	fail	Yes
7	Uncompetitive (Full)	0.90791	fail	Yes
8	Uncompetitive (Partial)	0.90791	fail	Yes

В результаті експерименту було розраховано концентрацію полумаксимального інгібування бутирилхолінестерази для флороглюцинолу (**IC_{50}**), яка дорівнює

IC_{50} = 839,54 ± 184,51 мкМ.

Рисунок 5 – Зміна швидкості перетворення субстрату бутирилхолінестеразою в залежності від початкової концентрації субстрату та концентрації інгібітора (флороглюцинолу) в координатах рівняння Міхаеліса-Ментен.α = 2, β = 0,8177.

В результаті проведених досліджень було запропоновано наступний модельний склад геріатричного лікарського засобу для комплексного лікування нейродегенеративних захворювань:

Лікарська форма: капсули

Активний фармацевтичний інгредієнт на одну капсулу:

флороглюцинолу дигідрат, 400 мг.

Допоміжні речовини на одну капсулу:

1.Кальцію стеарат – ковзка речовина, 5 мг;

2. Метилцелюлоза – стабілізатор, який покращує розпад капсул, 1 мг.

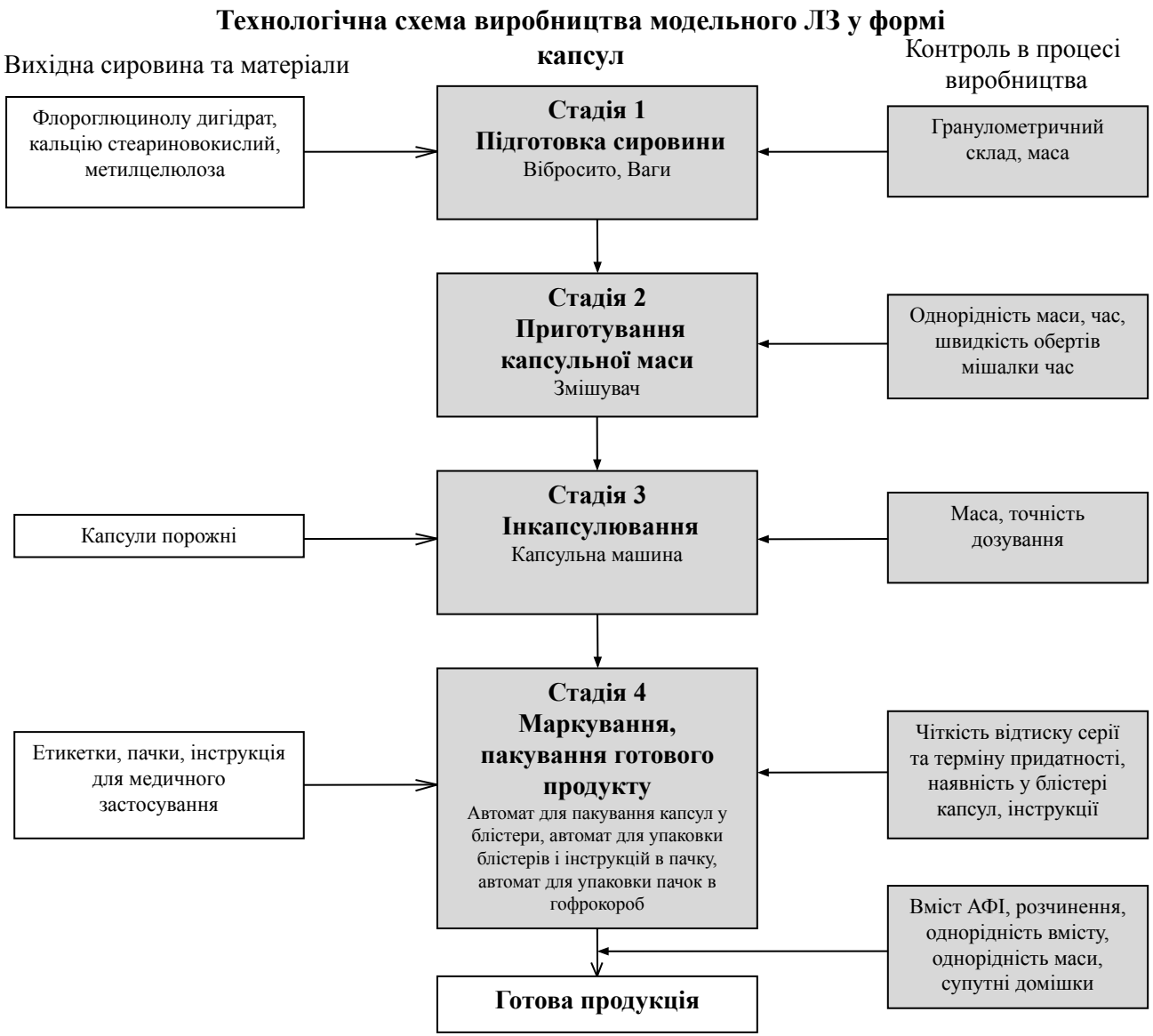


Рисунок 6 – Технологічна схема виробництва модельного ЛЗ у формі капсул.

Аналіз ризиків для якості модельного лікарського засобу

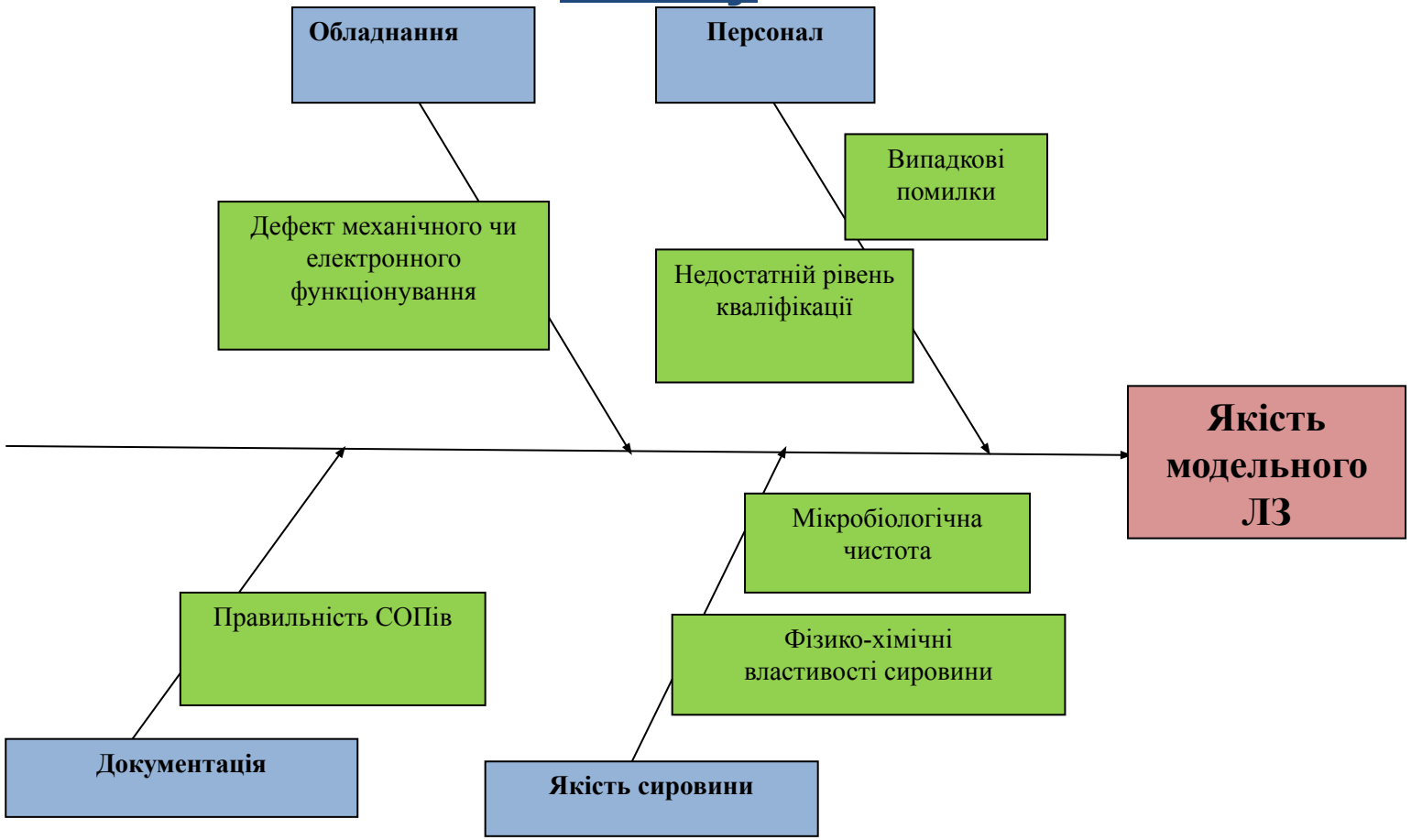


Рисунок 7 – Діаграма Ісікави, яка відображає залежність якості модельного ЛЗ від зазначених факторів.

Заходи по охороні праці

Розроблені заходи по охороні праці

Заходи	Результати розрахунків
Площа цеху, м^2	375
Необхідна кількість світильників з лампами ЛБ-40	48
Кількість вогнегасників ВП-10	2
Максимальний рівень шуму, дБ	87
Оптимальна температура, ºС	16-20

Висновки:

- В результаті дипломної роботи було досліджено потенційні плейотропні фармакологічні ефекти флороглюцинолу та виявлено помірний антиоксидантний та інгібуючий (відносно бутирилхолінестерази людини) ефект.

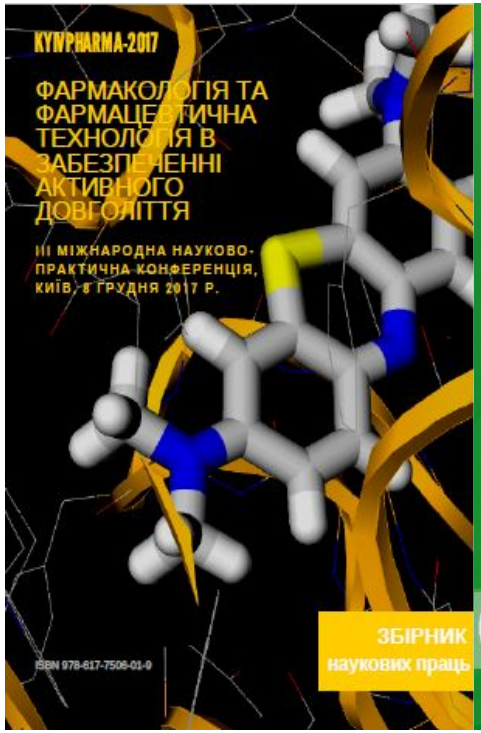
- На основі отриманих результатів досліджень та малої токсичності сполуки (LD_{50} = 5,8 г/кг) було запропоновано склад модельного лікарського засобу для комплексного лікування нейродегенеративних захворювань.

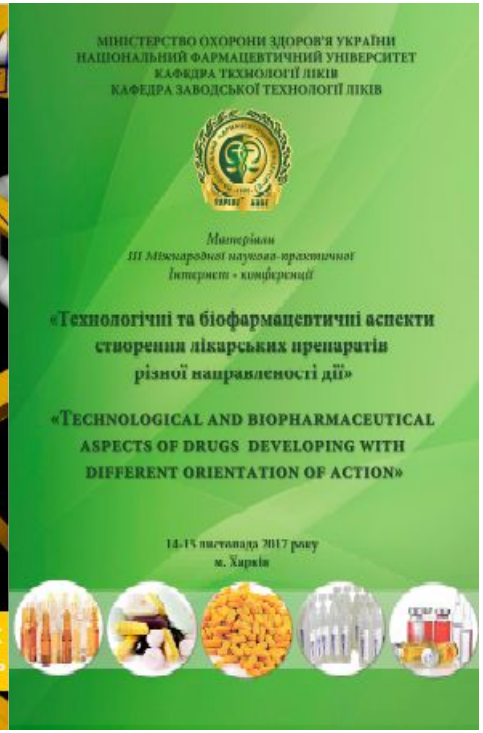
- Було обрано оптимальний технологічний процес виробництва препарату та розроблено відповідну технологічну схему.

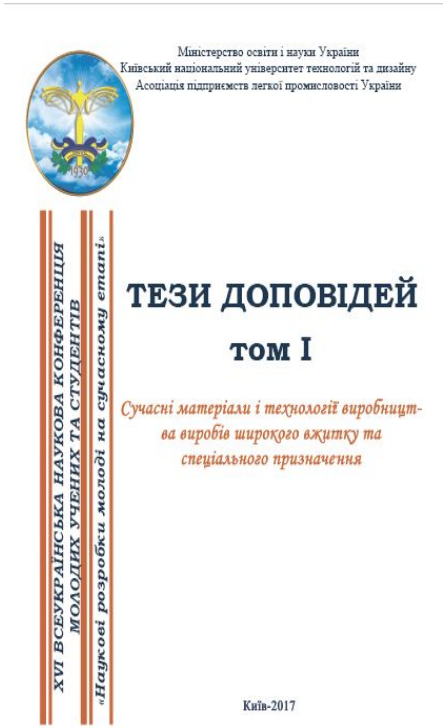
- Проведено попередній аналіз ризиків для якості модельного лікарського засобу.

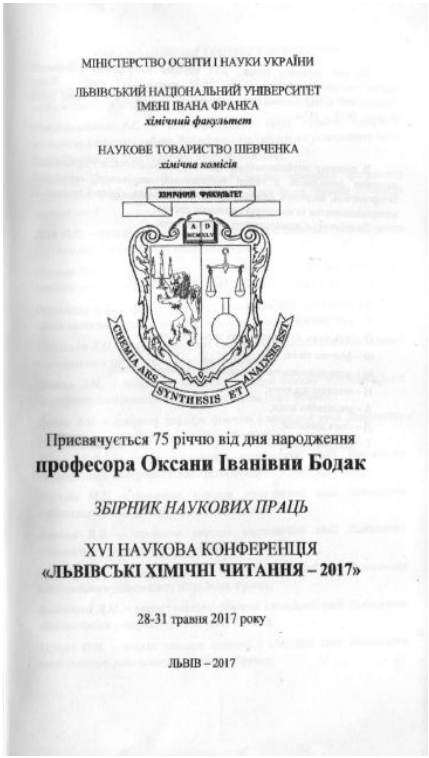
Публікації

За результатами дипломної роботи було опубліковано одну статтю у фаховому виданні та три тези доповідей у матеріалах наукових конференціях.









Дякую за увагу!