



КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА ЗООЛОГИИ И ОБЩЕЙ БИОЛОГИИ



Каюмова Рамиля Маратовна

Выпускная квалификационная работа

**Блокаторы периферического анионного сайта
ацетилхолинэстеразы на основе пиримидина в
качестве средства симптоматической терапии
болезни Альцгеймера**

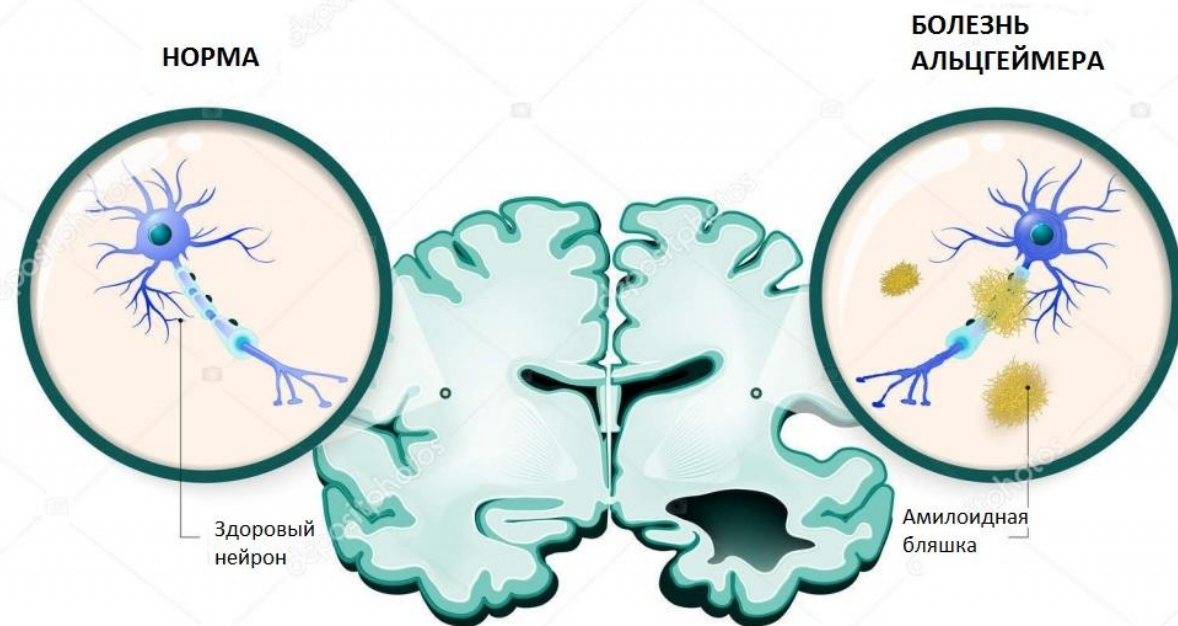
Научный руководитель:

Петров К.А., к.б.н., доцент каф. зоологии и общей биологии Института
фундаментальной медицины и биологии КФ(П)У.

Казань 2019

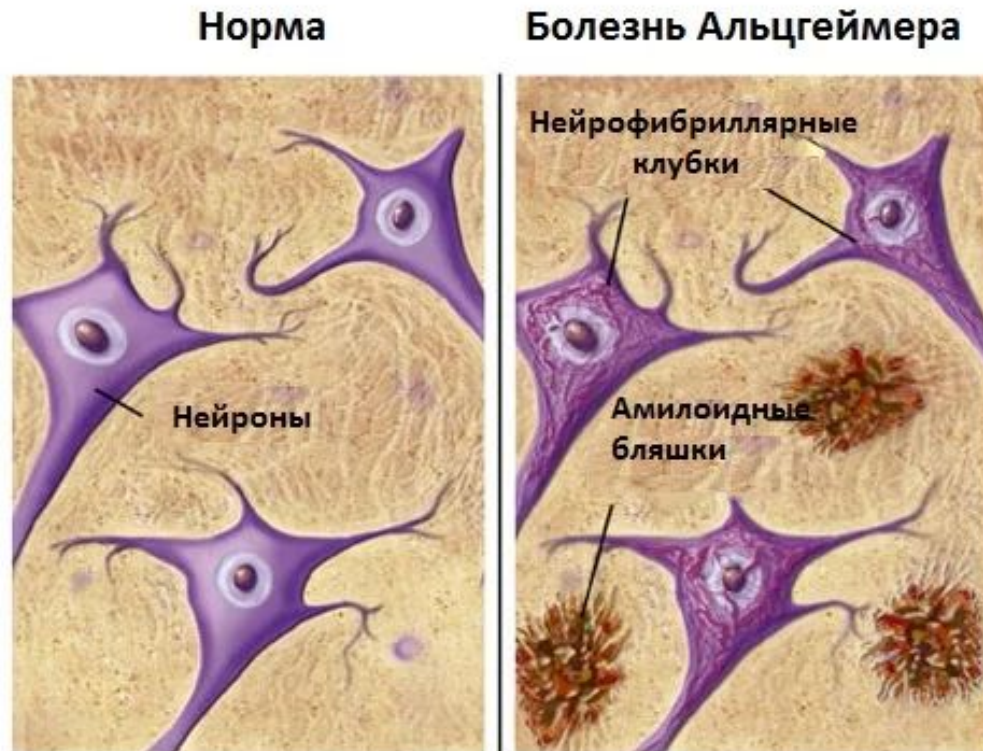
Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера – наиболее часто встречающееся нейродегенеративное заболевание у лиц пожилого возраста. Общепринятой гипотезой развития болезни Альцгеймера является «амилоидная гипотеза», согласно которой главной причиной запуска каскада нейродегенеративного процесса является нарушение метаболизма белка-предшественника амилоида. Ключевым звеном в этом каскаде является гиперпродукция токсического бета-амилоидного пептида, который приводит к образованию амилоидных бляшек и гибели нейронов головного мозга.



Болезнь Альцгеймера

Все существующие подходы лечения относятся к симптоматической терапии. Наиболее эффективные подходы основаны на попытках компенсации холинергического дефицита. Однако, существуют предпосылки считать, что ингибиторы фермента ацетилхолинэстеразы способны оказывать влияние на патогенез заболевания, уменьшая агрегацию бета-амилоидного пептида.



Цель работы:

Исследовать эффективность соединений-лидеров, синтезированных в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН, в отношении терапии симптомов болезни Альцгеймера.

Задачи работы:

1. Изучить способность исследуемых соединений ингибировать ацетил- и бутирилхолинэстеразу в условиях *in vitro*;
2. Исследовать острую токсичность выбранных соединений;
3. Исследовать эффективность симптоматической терапии болезни Альцгеймера в условиях фармакологической и генетической моделей данного заболевания на мышах и крысах,
4. Исследовать влияния соединений на количество амилоидных депозитов в коре головного мозга животных с болезнью Альцгеймера;

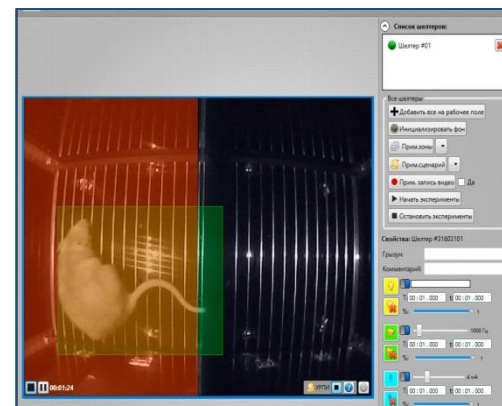
Материалы и методы

- **Проверка острой токсичности**

Оценка острой токсичности соединений проводилась согласно «Методическим рекомендациями по изучению общетоксического действия лекарственных средств».

- **Поведенческие тесты (Т-тест, УРПИ)**

Исследование способности соединений восстанавливать нарушения памяти в условиях модели болезни Альцгеймера изучали при помощи теста в Т-лабиринте, основанного на обучении животных вознаграждаемому чередованию, а также на основании скорости выработки рефлекса условно-пассивного избегания (УРПИ).



Моделирование Болезни Альцгеймера

Фармакологическая модель болезни Альцгеймера – основана на создании холинергического дефицита в результате инъекции лабораторным животным препарата скополамина.

Генетическая модель болезни Альцгеймера – воспроизводит мутацию гена предшественника амилоидного пептида, которая у человека в 100 % случаев приводит к развитию болезни Альцгеймера.

- **Приготовление срезов головного мозга и окрашивание амилоидных депозитов флуоресцентным красителем**



Криостат Microm HM 525



Конфокальный сканирующий микроскоп LEICA DM 6000 CFS

Окрашивание амилоидных бляшек проводили согласно методике Майера, используя флуоресцентный краситель амилоидных отложений Тиофлавин S.

Результаты исследования

Ингибиторная активность соединений

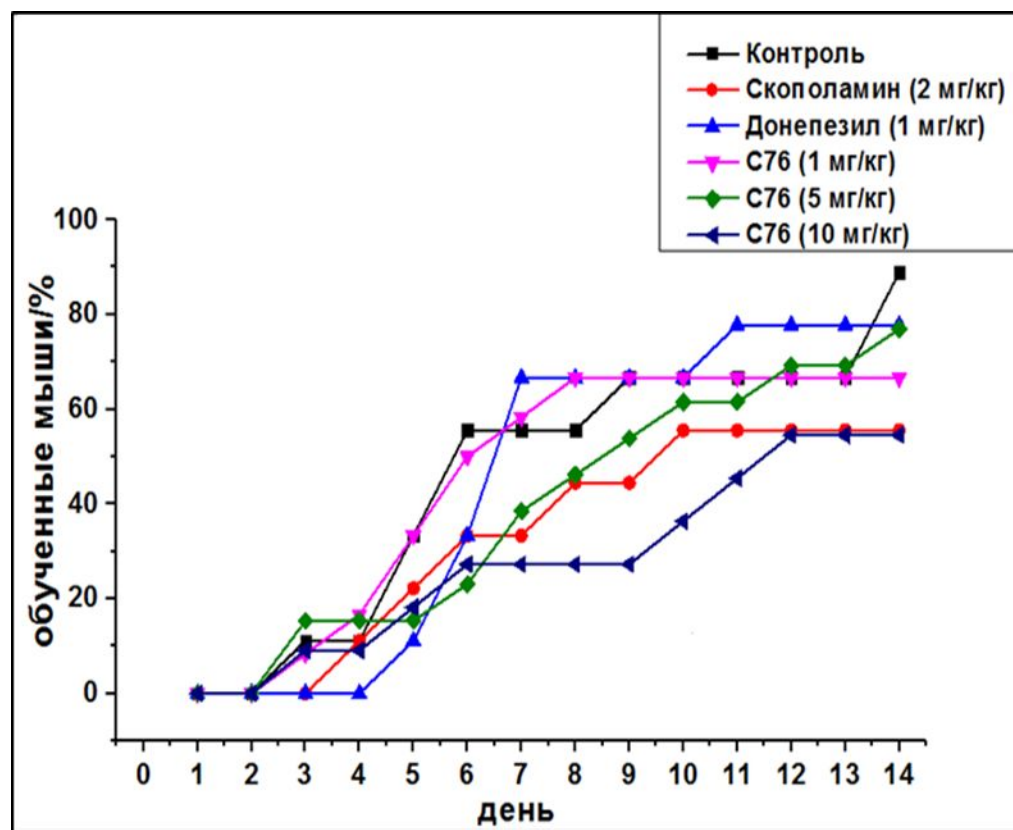
№ Соединения	АХЭ эритроцитов человека, IC50, моль/л	БуХЭ сыворотки крови человека, IC50, моль/л
C76	$7,3 \times 10^{-9}$	$>1,0 * 10^{-4}$
C82	$3,0 \times 10^{-10}$	$1,0 \times 10^{-5}$
C117	$3,2 \times 10^{-10}$	$3,0 \times 10^{-5}$

Антихолинэстеразная активность и токсичность соединения №117

	АХЭ человека, IC ₅₀ , моль/л	ЛД ₅₀ , мг/кг (мышь, п/о)	ЛД ₅₀ , мг/кг (мышь, в/б)
C76	7,28x10⁻⁹	220	138
C82	2,91x10⁻¹⁰	263	100
C117	2,33x10⁻¹⁰	523 самцы 517 самки	199
Донепезил	6,7x10 ⁻⁹	45	-
Ривастигмин	4,15x10 ⁻⁶	5,6 самцы 13,8 самки	-
Галантамин	3,5x10 ⁻⁷	18,7	-

Средний процент выбора правильного направления и процент обучившихся животных в тесте «вознаграждаемое чередование» в Т-образном лабиринте в условиях фармакологической модели на мышах (С76)

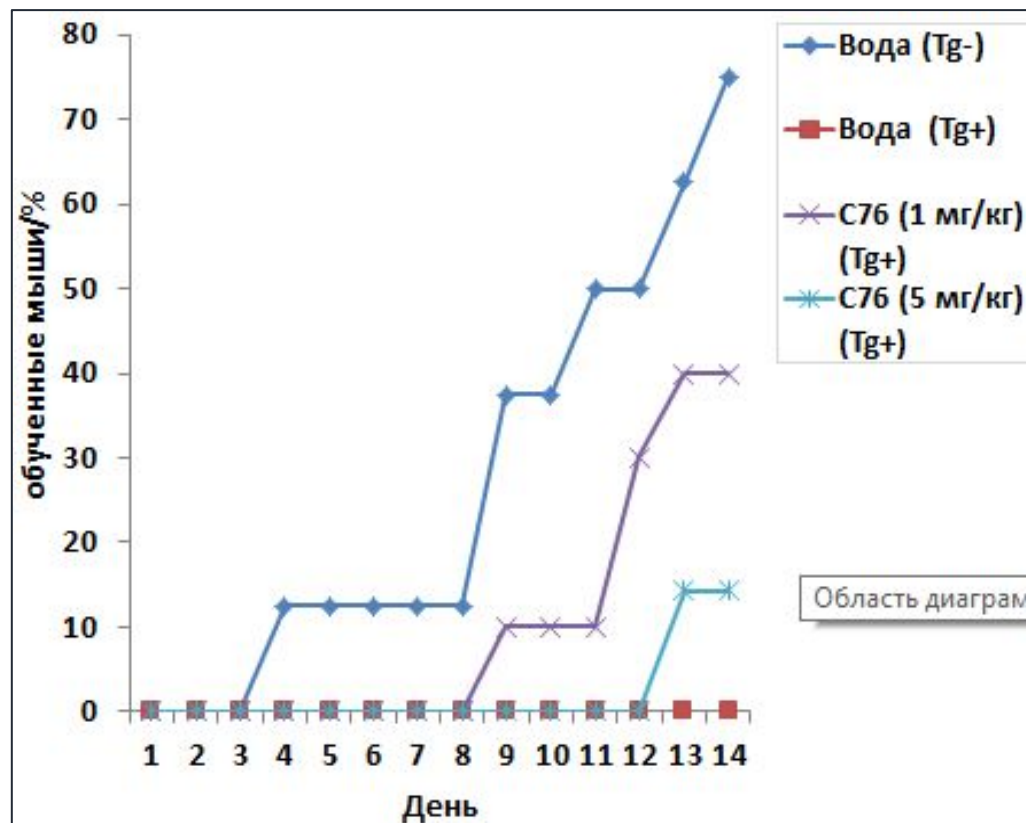
Группа животных	Средний процент чередований рукавов лабиринта (%)
Контроль	72,83±3,55
Скополамин	58,69±2,31*
С76, 1 мг/кг	66,67±2,65
С76, 5 мг/кг	71,14±1,85
С76, 10 мг/кг	65,14±1,90
Донепезила гидрохлорид, 1 мг/кг	68,14±2,31



*-различие с контролем статистически достоверно при $p \leq 0.05$.
(Сравнение выполнено по Манн-Уитни)

Средний процент выбора правильного направления и процент обучившихся животных в тесте «вознаграждаемое чередование» в Т-образном лабиринте в условиях генетической модели на мышах (С76)

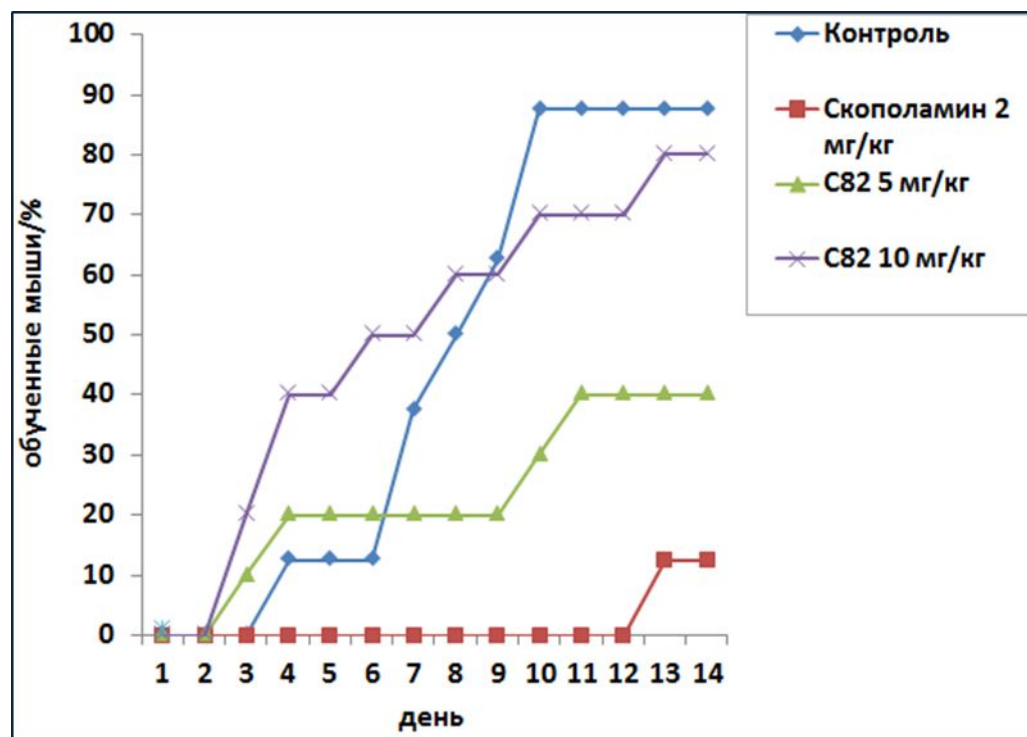
Группа животных	Средний процент чередований рукавов лабиринта (%)
Вода (Tg-)	70,05
Вода (Tg+)	55,36*
С76(Tg+), 1 мг/кг	52,35
С76(Tg+), 5 мг/кг	55,98



*-различие с контролем статистически достоверно при $p \leq 0.05$.
(Сравнение выполнено по Манн-Уитни)

Средний процент выбора правильного направления и процент обучившихся животных в тесте «вознаграждаемое чередование» в Т-образном лабиринте в условиях фармакологической модели на мышах (С82)

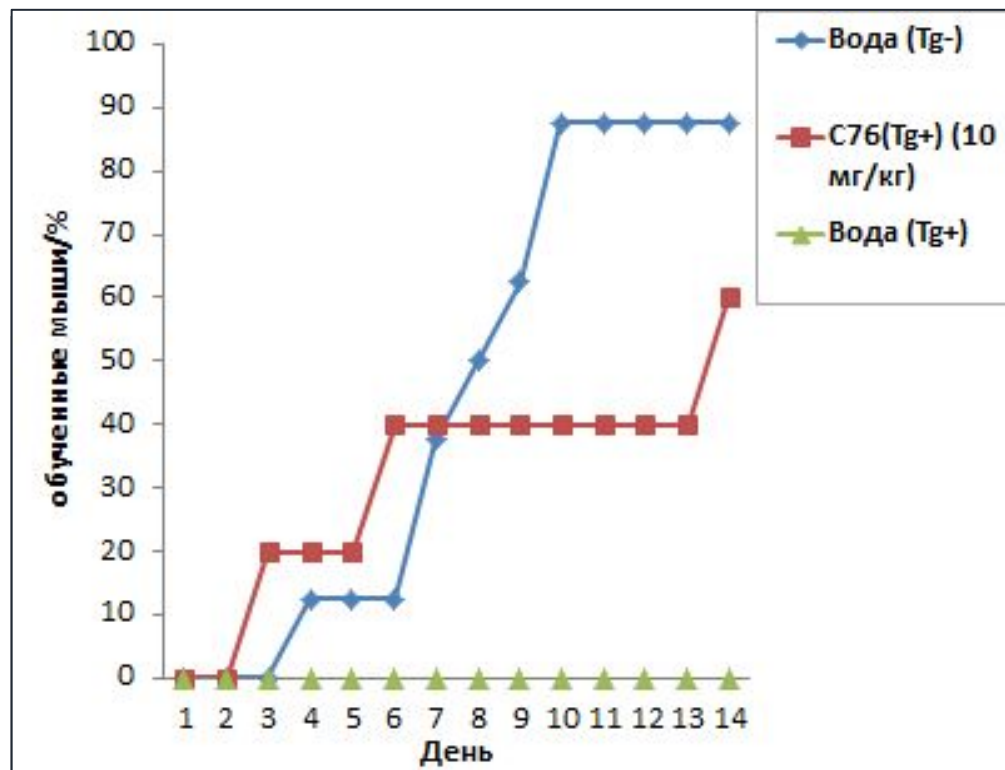
Группа животных	Средний процент чередований рукавов лабиринта (%)
Контроль	75,67
Скополамин	60,31*
С82, 5 мг/кг	64,47
С82, 10 мг/кг	75,47



*-различие с контролем статистически достоверно при $p \leq 0.05$.
(Сравнение выполнено по Манн-Уитни)

Средний процент выбора правильного направления и процент обучившихся животных в тесте «вознаграждаемое чередование» в Т-образном лабиринте в условиях генетической модели на мышах (С82)

Группа животных	Средний процент чередований рукавов лабиринта (%)
Вода (Tg-)	75,67
Вода (Tg+)	55,36*
С76(Tg+), 10 мг/кг	65,10



*-различие с контролем статистически достоверно при $p \leq 0.05$.
(Сравнение выполнено по Манн-Уитни)

**Средний процент выбора правильного направления в тесте
«вознаграждаемое чередование» в Т-образном лабиринте в условиях
фармакологической модели на мышах (С117)**

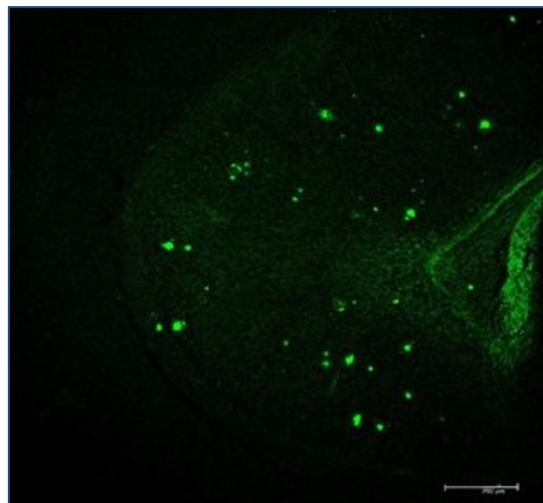
Группа животных	Средний процент чередований рукавов лабиринта (%)
Контроль	73,1±4,0
Скополамин	53,9±2,2*
С117, 1 мг/кг	62,9±2,1
С117, 10 мг/кг	72,8±2,4
Донепезила гидрохлорид, 1 мг/кг	67,4±2,4

**Средний процент выбора правильного направления в тесте
«вознаграждаемое чередование» в Т-образном лабиринте в условиях генетической
модели на мышах (С117)**

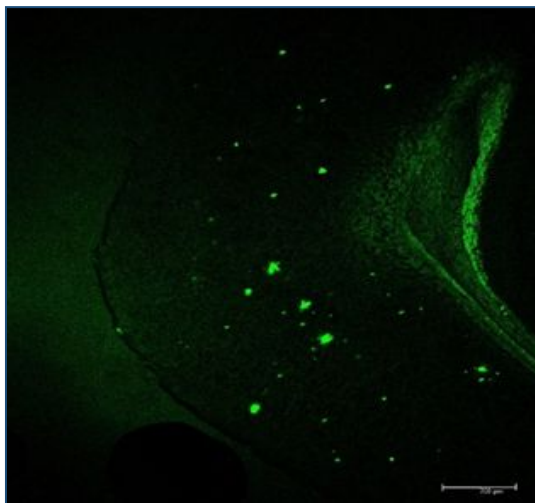
Группа животных	Средний процент выбора правильного направления
Вода (Tg-), п/о	68 ±3
Вода (Tg+), п/о	59 ±2**
С117, 1 мг/кг, п/о	62 ±3
С117, 10 мг/кг, п/о	65 ±2
Донепезила гидрохлорид моногидрат, 1 мг/кг	66±2

**Количество амилоидных бляшек в коре головного мозга мышей
(в поле зрения, увеличение x 10)**

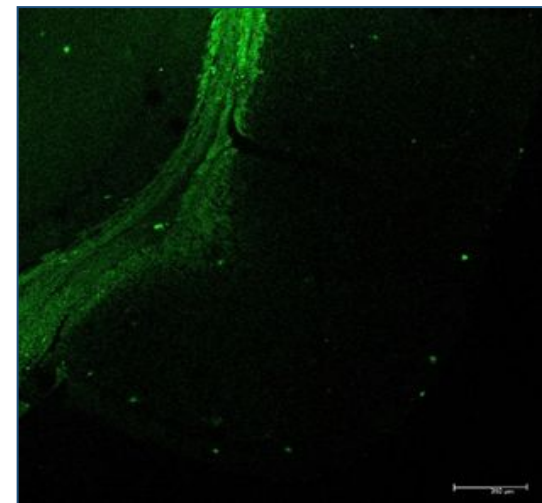
Группа животных	Количество бляшек в коре
Вода (Tg+)	40±2
Соединение №117, 1 мг/кг, п/о	28±2***
Соединение №117, 10 мг/кг, п/о	22±1***
Донепезил, 1 мг/кг, п/о	45±2



Контроль (Tg+)



Донепезил (Tg+)



Соединение №117 (Tg+)

Средний латентный период захода в затемненный отсек в поведенческом тесте УРПИ на скополаминовой модели БА (117)

Группа животных	Средний латентный период через 24 часа после выработки УРПИ, секунды
Контроль	180±0
Скополамин	36,7±6,1*
С117, 1 мг/кг	90,7±9,8*
С117, 5 мг/кг	148,8±8,8*
С117, 10 мг/кг	166,4±6,9
Донепезила гидрохлорид, 1 мг/кг	180±0

*-различие с контролем статистически достоверно при $p \leq 0.05$.
(Сравнение выполнено по Манн-Уитни)

Выводы

1. Исследуемые соединения с лабораторными С76, С82 и С117 показали способность угнетать активность АХЭ в наномолярном диапазоне концентраций, в то время как, активность БуХЭ угнетается данными соединениями миллимолярном диапазоне концентраций;
2. Соединения обладают низкой по сравнению с используемыми в клинике антихолинэстеразными препаратами токсичностью.
3. С76 в дозе 5 мг/кг при внутрибрюшинном способе введения купирует симптомы нарушения пространственной памяти в условиях скополаминовой модели БА, однако на генетической модели БА данное соединение оказалось не эффективно.
4. С82 показало свою эффективность как в условиях фармакологической, так и генетической модели БА в дозе 10 мг/кг.
5. С117 в дозах 1 и 10 мг/кг восстанавливает нарушения пространственной памяти у трансгенных мышей с БА, достоверно уменьшая количество бета-амилоидных отложений в головном мозге.
6. При использовании дозы в 10 мг/кг С117 показало способность восстанавливать нарушения пространственной памяти в условиях фармакологической модели БА на крысах в тесте УРПИ.

- Исследования были поддержаны грантами РФФИ 14-50-00014 и РФФИ 19-15-00344. Подана заявка на поддержку доклинических испытаний в рамках ФЦП «Фарма 2020».

Результаты исследования были доложены на 3-ей Российской конференции по медицинской химии (Казань, 28 сентября – 3 октября 2017) и X Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз 2017» (Казань, 25 – 28 октября 2017).

Спасибо за внимание!