

ДОКЛАД.

СЛАЙД 1.

Важную роль в разработке новых биологически активных соединений, в том числе и лекарственных препаратов, играют соединения, выделенные из природных источников. В Новосибирском институте органической химии СО РАН синтезированы новые производные на основе широко распространенных в природе монотерпеноидов вербенола и изопулегола, представляющие большой интерес с фармакологической точки зрения.

СЛАЙД 2.

Цель работы: Изучение фармакологической активности производных монотерпеноидов для оценки перспективности их использования в качестве противопаркинсонических и анальгетических средств

СЛАЙД 3.

Задачи

1. Провести фармакологические исследования новых кислородсодержащих производных *para*-ментанового ряда с использованием стандартных моделей с целью выявления перспективного агента, обладающего противопаркинсонической активностью. Установить зависимость противопаркинсонической активности от химической структуры.
2. Изучить влияние перспективного агента – диола на нейромедиаторные системы головного мозга для оценки предположительного механизма действия.
3. Исследовать противопаркинсоническую активность диола при различных схемах (однократное и длительное) и дозах введения. Изучить влияние диола на жизненно важные органы и системы животных при длительном введении.
4. Определить возможные метаболиты диола, выбрать наиболее активный, оценить влияние метаболитов на дофаминовые нейроны головного мозга животных.
5. Провести фармакологический скрининг анальгетической активности в ряду впервые синтезированных производных монотерпеноидов и выбрать наиболее перспективные агенты для проведения дальнейших фармакологических исследований.
6. Оценить влияние выбранных агентов на опиоидные структуры ЦНС и зависимость механизма действия от структуры соединения.
7. Оценить влияние перспективных агентов на нейромедиаторные системы ЦНС, в том числе каннабиноидную.

8. Изучить наличие у перспективных агентов возможных побочных эффектов, характерных для большинства анальгетических средств (влияние на двигательную активность и слизистую оболочку желудка животных).

СЛАЙД 4.

Научная новизна проведенной работы заключается в следующем:

- В настоящей работе впервые обнаружено кислородсодержащее производное ряда монотерпеноидов – диол, обладающее одномоментно выраженной противопаркинсонической, противосудорожной и анальгетической активностью. Впервые показали зависимость противопаркинсонической активности диола от химического строения.
- Впервые был обнаружен активный метаболит диола – моноэпоксид диола, проявляющий выраженную противопаркинсоническую активность и показана его способность проникать через гематоэнцефалический барьер. Было установлено, что моноэпоксид диола стимулирует рост дофаминовых нейронов мозга животных с индуцированным паркинсоническим синдромом, увеличивая количество дофаминовых синапсов в стриатуме.
- Впервые в ряду новых производных монотерпеноидов были обнаружены соединения, обладающие выраженной анальгетической активностью.
- Впервые при изучении предположительного механизма анальгетического действия новых производных монотерпеноидов показано, что в анальгетический ответ данных агентов вовлечена каннабиноидная и другие нейромедиаторные системы ЦНС при участии 5-HT₃-серотониновых, α_2 -адреналиновых и дофаминовых и мускариновых рецепторов ЦНС.

СЛАЙД 5-6.

- В работе было использовано 2162 мышей и 110 крыс
- Исследуемые агенты вводили в диапазоне доз от 0,5 до 30 мг/кг внутрижелудочным и подкожным способами введения.
- Противопаркинсоническую активность оценивали на модели синдрома Паркинсонизма, вызванного системным введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП); моделях каталепсий, вызванных трифтазином и галоперидолом
- Для исследования воздействия на центральную нервную систему использовали модели: «ареколиновый тремор», взаимодействие с L-ДОФА, «коразоловую

токсичность», «никотиновую токсичность», «йохимбиновую токсичность», «хлоралгидратовый сон», «открытое поле».

- Содержание дофамина в стриатуме головного мозга крыс определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией.
- Оценку влияния на дофаминовые нейроны *in vitro* проводили в соответствии со стандартными методиками
- Анальгетическую активность определяли в стандартных тестах «уксусные корчи» и «горячая пластина». Определение вовлечения нейромедиаторных структур ЦНС в анальгетический ответ проводили на модели «уксусные корчи» с использованием антагонистов к дофаминовым, ацетилхолиновым, серотониновым и адренорецепторам.
- Противовоспалительную активность соединений изучали на модели воспаления, вызванного введением раствора формалина (3%, 0,05 мл) в апоневроз стопы животного
- Влияние длительного введения исследуемого агента на жизненно важные органы и системы оценивали по общему состоянию животных (масса, температура тела), параметрам периферической крови, лейкоцитарной формулы, биохимическим показателям крови, гистологическому исследованию сердца, легких, печени, почек, селезенки, тимуса.
- Статистическую обработку данных вели с помощью стандартной программы Statistica 8.0, достоверность определяли по t-критерию Стьюдента и непараметрическому U-критерию Манна-Уитни..

СЛАЙД 7.

Представленные для исследования соединения были синтезированы в Лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН (зав. лаб. – член-корр. РАН, д.х.н. Салахутдинов Н. Ф.)

Синтез соединений (76 шт.) был осуществлен исходя из распространенного монотерпеноида (-)-вербенола и (-)-изопулегола

СЛАЙД 8.

С помощью компьютерной программы прогнозирования биологической активности было обнаружено, что среди новых гидроксипроизводных параментанового ряда 1-5) - соед. 2, вероятно, обладает дофаминиметической, холинолитической активностью а также возможно проявление им противосудорожных свойств.

И действительно, проведенные исследования показали, что введение диола в дозе 10 мг/кг приводит к достоверному снижению процента смертности животных, вызванных введением никотина, уменьшению на 20% продолжительности судорожного эффекта ареколина, то есть к проявлению агентом холинолитической активности.

Также диол в дозе 10 мг/кг способствует усилению угнетающего действия предшественника дофамина, проявляющегося в достоверном снижении всех параметров двигательной-исследовательской активности. Таким образом, можно предположить, что исследуемое нами соединение является агонистом дофаминергической системы.

Основная часть работы посвящена исследованию фармакологической активности агента 2, которому дали название «диол».

СЛАЙД 9.

Учитывая одномоментное проявление диолом дофаминергических и холинолитических свойств целесообразно было следующим шагом провести исследования диола на противопаркинсоническую активность.

Болезнь Паркинсона – одно из наиболее распространенных неврологических заболеваний с преимущественно двигательными нарушениями, обусловленное в основном утратой дофаминсодержащих клеток nigrostriального пути. Число людей, страдающих болезнью Паркинсона, составляет 1% среди взрослого населения в возрасте до 60 лет, 5-10% – в группе 60-80-летних. Не смотря на разнообразие применяемых противопаркинсонических препаратов, проблема разработки эффективных препаратов для терапии болезни Паркинсона, обладающих минимальными побочными действиями, остается на сегодняшний день актуальной.

Наиболее адекватной моделью ПС у животных является модель, вызванная системным введением нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП).

СЛАЙД 10.

Эффективность противопаркинсонического действия диола оценивали по его способности уменьшать проявления олигокинезии в тесте «открытое поле» с помощью установки Tru Scan. Изучение противопаркинсонической активности диола при однократном и трехдневном введении МФТП показало, что наибольшую противопаркинсоническую активность диол проявил в дозе 20 мг/кг, восстанавливая показатели двигательной активности до уровня таковых у животных контрольной группы, и все дальнейшие исследования проводились для агента, вводимого в данной дозе.

СЛАЙД 11 -12.

Известно, что абсолютная конфигурация химических соединений играет важную роль в проявлении их фармакологической активности. Поэтому, нами была изучена противопаркинсоническая активность 8 оптических изомеров диола. Рассмотрим противопаркинсоническое действие изомеров на примере такого параметра как время двигательной активности.

По результатам проведенного эксперимента нами была установлена связь структура-активность, а именно зависимость противопаркинсонической активности от пространственного расположения гидроксильных групп в 5-м и 6-м положении, а также изопропенильной группы в 4-м положении.

Эффективнее всего снимает проявления экспериментального ПС соединение **6**, восстанавливая показатели двигательной-исследовательской активности до уровня таковых у животных контрольной группы. Изменение конфигурации гидроксильной группы в 5-м (переход от **6** к **7**) положении, а также одновременное изменение положения обеих гидроксильных групп (переход от **6** к **8**) привело к полному исчезновению влияния на развитие олигокинезии. Изменение же конфигурации гидроксильной группы в 6-м положении (переход от **6** к **9**) привело к достоверному усугублению проявления симптомов ПС.

СЛАЙД 12.

Большое значение имеет абсолютная конфигурация изопропенильной группы. Соединения **10-13**, с R расположением данной группы не оказали достоверного влияния на двигательную-исследовательскую активность животных с индуцированным ПС.

Таким образом, показано, что абсолютная конфигурация диола оказывает решающее влияние на его противопаркинсоническую активность в тесте с МФТП. Дальнейшие исследования проведены для соединения **II** (диола) в качестве противопаркинсонического агента, так как он, с одной стороны, на 85% состоит из наиболее активного стереоизомера (**6**) и на 15% из изомера, обладающего тенденцией к проявлению противопаркинсонической активности (**11**), а с другой, обладает широкой ресурсной базой (то есть может быть синтезирован из отечественного скипидара с природной оптической чистотой), что делает его получение наиболее экономически доступно

СЛАЙД 13.

Следующие эксперименты направлены на более углубленное изучение противопаркинсонической активности диола.

Диол практически полностью предотвращает развитие каталепсии, вызванной введением данного галоперидола, значительно снижая общую продолжительности каталепсии у животных и уменьшая процент животных с каталепсией в группе. И также предотвращает развитие экстрапирамидных расстройств, вызванных введением трифтазина, снижая продолжительность каталепсии у животных. В то время как эталонный препарат леводопа лишь замедляет развитие каталепсии.

В тесте «йохимбиновой токсичности» диол усилил токсическое действие йохимбина, что указывает на то, что диол не является ингибитором MAO-B, а значит, проявляет именно противопаркинсоническую активность.

Результаты проведенных исследований подтверждают наличие противопаркинсонической активности у выбранного нами агента

СЛАЙД 14.

В связи с длительностью применения противопаркинсонических лекарственных средств было исследовано лечебное действие диола в длительном эксперименте в течение 30 дней. Было показано, что диол снимал проявление олигокинезии, вызванной введением нейротоксина и не оказал влияния на исследовательскую активность проявляя противопаркинсоническую активность аналогичную леводопе.

СЛАЙД 15.

При исследовании влияния диола на содержание дофамина в стриатуме головного мозга крыс в 30-дневном эксперименте, было установлено, что введение нейротоксина МФТП в течение 30 дней снижало содержание дофамина в стриатуме более чем в 2 раза. Диол, действуя однонаправлено с леводопой, значительно ослаблял действие нейротоксина, достоверно увеличивая содержание дофамина в стриатуме.

При исследовании острой токсичности было установлено, что LD_{50} диола = 4250 мг/кг (при пероральном однократном способе введения), в то время как LD_{50} леводопы = 2363 мг/кг, что почти в 2 раза меньше.

На основании общего состояния животных, общего и биохимического анализа крови, функции печени, гистологического исследования установлено, что диол не оказывает токсического воздействия на жизненно важные органы и системы животных при длительном (30 дней) введении.

СЛАЙД 16.

Известно, что люди страдающие болезнью Паркинсона и синдромом Паркинсонизма испытывают боли, связанные с ригидностью и гипокинезией в мышцах. Поэтому, учитывая присущие обезболивающие свойства некоторым монотерпеноидам, было решено провести исследования на выявление анальгетической активности диола. Исследование анальгетической активности диола показало, что данный агент в дозах 10 и 1 мг/кг проявил селективную анальгетическую активность в тесте на висцеральную боль, снижая кол-во укусных корчей в эксперименте.

СЛАЙД 17.

Далее была изучена связь структура-активность в отношении влияния четырех функциональных групп, содержащихся в молекуле диола (две гидроксигруппы и две двойные связи), на проявление им противопаркинсонической активности. Были синтезированы соединения **14-17**, у которых отсутствует одна из функциональных групп. Проведенные исследования показали, что отсутствие одной из групп приводит к исчезновению противопаркинсонической активности у данных соединений.

То есть, наличие в структурной формуле диола всех четырех функциональных групп (две гидроксигруппы и две двойные связи) имеет решающее значение для проявления им противопаркинсонической активности.

СЛАЙД 18.

Далее было принято решение синтезировать ряд производных диола (**18-26**), модифицируя С-9 положение, не внося изменения в основную молекулу, оставляя все четыре функциональные группы (две двойные связи и две гидроксигруппы), важные для проявления диолом противопаркинсонической активности.

Результаты исследования показали, соединения 18, 19, 20 и 25 привело к исчезновению противопаркинсонической активности. Переход к производным 21 и 22 привело к усилению токсического эффекта МФТП. А соединения 23, 24 и 26 оказали положительное коррегирующее влияние на развитие экспериментального паркинсонизма, улучшая показатели двигательной-исследовательской активности животных.

СЛАЙД 19.

Одной из важных задач доклинических испытаний является изучение метаболизма и исследование активности найденных метаболитов. Было обнаружено несколько метаболитов диола, которые, возможно, проявляют противопаркинсоническую активность. Один из метаболитов был ранее нами получен - кетоспирт.

Противопаркинсоническая активность была изучена для двух его стереоизомеров (**соединения 31-32**) и было показано, что введение этих соединений усугубило проявление олигоконезии, вызванной введением МФТП. Также были синтезированы 4 возможных варианта эпоксидов (27-30) и исследована их противопаркинсоническая активность.

Введение транс-эпоксида **27** привело к практически полному восстановлению (до уровня контрольной группы) показателей двигательной-исследовательской активности животных. Его цис-изомер **28** не проявил противопаркинсонической активности.

Эпоксид **29** не оказал влияния на проявления олигокинезии, вызванной введением нейротоксина МФТП, в то время как его транс-изомер **30** достоверно увеличил показатели как двигательной-исследовательской активности животных (табл. 3.27).

Кроме того, для эпоксида была показана его возможность проявлять противопаркинсонический эффект при введении в дозе 5 мг/кг. Была определена острая токсичность, которая составила более 1000 мг/кг.

Совместо с Лабораторией молекулярной нейронауки Института биотехнологии города Хельсинки были проведены исследования *in vitro*, и обнаружена способность эпоксида **27** стимулировать рост дофаминовых нейронов, увеличивая количество дофаминовых синапсов в стриатуме, что, вероятно, является причиной увеличения содержания дофамина в полосатом теле и способствует облегчению симптомов болезни Паркинсона.

По результатам проведенных исследований диол был рекомендован для прохождения доклинических исследований, которые уже были успешно проведены и в настоящее время диол находится на 1 этапе клинических испытаний.

СЛАЙД 20.

Учитывая проявленную анальгетическую активность диолом и литературные данные о присущей многим монотерпеноидам анальгетической активности, было принято решение о синтезе ряда новых производных монотерпеноидов для оценки их анальгетической активности. Среди полученных соединений был проведен скрининг и выявлены соединения, обладающие выраженной анальгетической активностью.

Первыми были синтезированы гетероциклические соединения с различными типами остовов путем взаимодействия (1*R*,2*R*,6*S*)-3-метил-6-(проп-1-ен-2-ил)циклогекс-3-ен-1,2-диола и эпоксида вербенола с ароматическими альдегидами, содержащими три метокси-группы.

Результаты скрининга показали, что соединения **34, 38** в дозе 10 мг/кг проявляют выраженную анальгетическую активность в тесте «уксусные корчи». В то же время, достоверной анальгетической активностью в обоих тестах обладает только трициклическое соединение **38**.

То есть, анальгетическая активность обнаружена у соединений разных структурных типов с различным расположением метокси-групп в ароматическом кольце, что подтверждает перспективность дальнейшего поиска новых анальгетиков среди соединений, сочетающих монотерпеновый и ароматический фрагменты

СЛАЙД 21.

Соединения следующего ряда были так же синтезированы на основе диола и сочетают в своей химической структуре *para*-ментановый и ароматический фрагменты, но имеют отличия только среди заместителей в ароматическом кольце, а гексагидро-2Н-хроменовый остов остается неизменным.

В данной группе также было выявлено несколько соединений, проявивших выраженную анальгетическую активность в тесте «уксусные корчи» (**41, 47, 50-52**), и соединения, проявившие активность в обоих тестах: **44,45,48**.

Установлено, что необходимым условием для проявления выраженной анальгетической активности в обоих скрининговых тестах является наличие одновременно и гидрокси-, и метокси-группы в ароматическом кольце.

СЛАЙД 22.

Следующим синтезирован ряд аналогичных соединений, содержащих гетероароматические (фурановые и тиофеновые) заместители, исходя из монотерпеноида изопулегола. В данной группе обнаружено лишь одно соединение, проявившее выраженную анальгетическую активность в обоих тестах (**54**)

СЛАЙД 23.

Также был синтезирован еще один ряд соединений, сочетающих диазаадамantanовый и монотерпеноидный фрагменты. Введение адамантильного фрагмента в биологически активные молекулы часто приводит к уменьшению токсичности и значительному улучшению терапевтического эффекта.

Среди новых соединений было обнаружены соединения **66 и 71**, обладающие выраженной анальгетической активностью в обоих тестах. А также было установлено, что монотерпеноид миртеналь (**76**) достоверно снижает количество корчей, вызванных

введением уксусной кислоты. Объединение в одной структуре остатка (-)-миртеналя **76** и диазаадамантанового фрагмента приводит к резкому усилению анальгетической активности.

СЛАЙД24

По результатам скрининговых исследований на анальгетическую активность среди новых производных монотерпеноидов, для проведения дальнейших фармакологических исследований были выбраны соединения **44, 45, 54, 66**, обладающие выраженной анальгетической активностью и являющихся коммерчески доступными в процессе их синтеза.

СЛАЙД 25

Среди различных механизмов действия, опосредующих анальгетический ответ биологически активных соединений, наиболее распространенными являются вовлечение в механизм анальгетического действия каннабиноидной и опиоидной систем ЦНС.

Изучение вовлечения опиоидных и каннабиноидных рецепторов в механизм анальгетического действия соединений было проведено на модели "уксусные корчи" с использованием налоксона - антагониста опиоидных рецепторов и римонабанта – антагониста каннабиноидных рецепторов.

Эксперименты показали, что в анальгетический ответ всех исследуемых соединений, вероятно, вовлечены каннабиноидные рецепторы, а механизм анальгетического действия соединения **44** опосредован еще и через опиоидные рецепторы центральной нервной системы.

То есть, положение метоксигруппы в фенильном кольце оказывает решающее влияние на механизм анальгетического действия соединений **44 и 45**, вовлекая в анальгетический ответ различные рецепторы: каннабиноидные для соединения **45** и, по крайней мере, частично, опиоидные для соединения **44**.

Учитывая вовлечение в механизм действия соединения **44** опиоидных (наркотических) рецепторов, проведение дальнейших исследований по изучению его анальгетической активности посчитали нецелесообразным

СЛАЙД 26.

Исследование вовлеченности различных медиаторных систем головного мозга в механизм анальгетического действия тестируемых соединений было проведено в серии экспериментов на модели УК с использованием антагонистов к рецепторам основных

нейро-медиаторных систем, которые могут принимать участие в реализации анальгетического ответа.

Подводя итог, можно заключить, что все исследуемые соединения имеют сходство в механизме действия, так как опосредуют анальгетический ответ, по крайней мере, частично, через каннабиноидные СВ1-рецепторы. Вовлечение же других нейромедиаторных структур в механизм анальгетического действия исследуемых соединений варьируется и представлен в таблице.

СЛАЙД 27.

При исследовании раздражающего действия на слизистую желудка крыс было показано, что соединения **45, 54, 66** не оказывают выраженного раздражающего действия на слизистую оболочку желудка крыс, то есть обладают явным преимуществом по сравнению с группой нестероидных противовоспалительных препаратов, обладающих выраженным гастротоксическим побочным эффектом.

При исследовании двигательной-исследовательской активности соединений **45, 54, 66** в тесте открытого поля значимых отклонений от показателей контрольной группы обнаружено не было

СЛАЙД 28-29.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенного фармакологического скрининга среди кислородсодержащих производных пара-ментанового ряда обнаружено перспективное соединение - диол, обладающее выраженной противопаркинсонической активностью, низкой токсичностью, а также проявляющее высокую анальгетическую и противосудорожную активность. Впервые установлено, что абсолютная конфигурация диола и наличие всех четырех функциональных групп (две гидроксигруппы и две двойные связи) оказывает решающее влияние на его противопаркинсоническую активность.
2. Установлено, что диол проявляет дофаминомиметическое и холинолитическое действия, восстанавливая нейромедиаторный дисбаланс, развивающийся при болезни Паркинсона.
3. Впервые показано, что диол проявляет выраженную противопаркинсоническую активность в дозе 20 мг/кг *per os* при различных схемах введения (от однократного до 30-дневного). Установлено, что длительное (30 дней) внутрижелудочное введение диола крысам в дозе 20 мг/кг не оказывает токсического влияния на жизненно важные органы и системы.

4. Установлено, что обнаруженный активный метаболит диола (эпоксид **27**) способствует выживаемости дофаминовых нейронов в тестах *in vitro*, а также достоверно увеличивает количество дофаминовых синапсов в стриатуме, стимулируя в условиях *in vivo* рост дофаминовых нейронов мозга животных с индуцированным паркинсоническим синдромом.
5. На основании вышеизложенного диол может быть предложен для дальнейшей разработки противопаркинсонического препарата.
6. Впервые в ряду новых производных монотерпеноидов обнаружены несколько соединений (**44**, **45**, **54**, **66**), обладающих выраженной анальгетической активностью одновременно в тестах "уксусные корчи" и "горячая пластина" и низкой токсичностью.
7. Установлено, что положение метоксигруппы в фенильном кольце изомеров **44** и **45** оказывает решающее влияние на механизм анальгетического действия, вовлекая в анальгетический ответ каннабиноидные для соединения **45** и опиоидные для соединения **44**. Соединения **45**, **54** и **66** не оказывают влияния на опиоидные рецепторы.
8. Установлено, что механизм анальгетического действия соединений **45**, **54** и **66** реализуется через каннабиноидную систему, а также через 5HT₃-серотониновые, α 2-адреналиновые и D₂-дофаминовые рецепторы (**45**); M-холинорецепторы и дофаминовые D₁ и D₂рецепторы (**54**) и M-холинорецепторы для соединения **66**
9. Установлено, что соединения **45**, **54** и **66** не оказывают угнетающего действия на двигательную-исследовательскую активность животных, не оказывают раздражающего влияния на слизистую оболочку желудка крыс.
10. Соединения **45**, **54** и **66** представляют интерес для дальнейших доклинических исследований в качестве высокоэффективных и низкотоксичных анальгетиков.