



СПХФУ

Санкт-Петербургский государственный  
химико-фармацевтический университет

# ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ПРОИЗВОДНЫХ АЛЛИЛМОРФОЛИНА У РЫБ *DANIO RERIO* В ТЕСТЕ «НОВЫЙ АКВАРИУМ»

**Исполнитель:**

**Вероника Александровна Приходько,**

аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии II года обучения

**Руководители:**

**Сергей Владимирович Оковитый,**

д-р мед. наук, проф., заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии

**Юрий Игоревич Сысоев,**

канд. биол. наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии,  
н. с. лаборатории нейропротезов Института трансляционной биомедицины СПбГУ

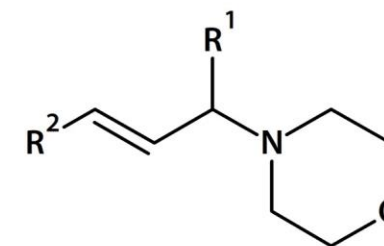
Санкт-Петербург

2021

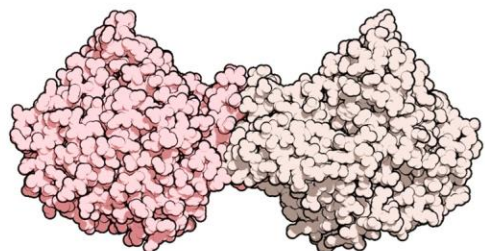
# ПРОИЗВОДНЫЕ АЛЛИЛМОРФОЛИНА

Производные аллилморфолина (ПАМ) (А) — группа соединений, для которых показана *in vitro* блокирующая активность в отношении ацетилхолинэстеразы (Б), бутирилхолинэстеразы (В), а также рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA) (Г)<sup>1</sup>.

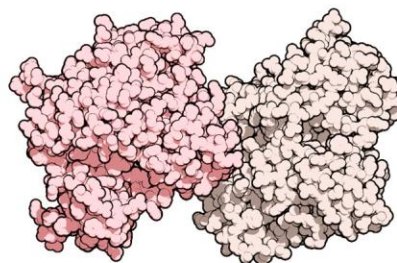
ПАМ представляют интерес в качестве потенциальных **нейропротекторных средств**, однако особенности их фармакологической активности *in vivo* требуют дальнейшего изучения.



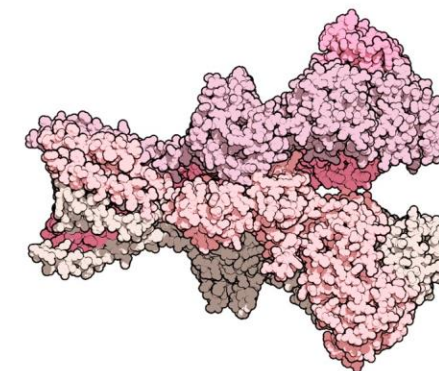
А. Общая формула ПАМ



Б. Ацетилхолинэстераза



В. Бутирилхолинэстераза



Г. NMDA-рецептор

1. Chernov, N. M., et al. (2018). Synthesis of Chromone-Containing Allylmorpholines through a Morita-Baylis-Hillman-Type Reaction. *European Journal of Organic Chemistry*, 45(2018): 6304-6313.

# DANIO RERIO

*Danio rerio* (данио-рерио, зебрафиш) — высокочувствительная биологическая тест-система и популярный модельный организм в биомедицинских, в том числе — нейрофармакологических исследованиях.

## Достоинства *Danio rerio*:

- низкая стоимость и простота содержания;
- способность быстро расти и размножаться;
- высокая степень генетического, анатомического и физиологического сходства с грызунами и человеком;
- высокая релевантность многих фармакологических мишеней и основных нейромедиаторных систем, включая глутаматергическую и холинергическую системы<sup>2</sup>.



2. Santana, S., et al. (2012). Can zebrafish be used as animal model to study Alzheimer's disease? *American Journal of Neurodegenerative Disease*, 1(1): 32-48.

# ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Провести **фармакологический скрининг** новых ПАМ на рыбах *Danio rerio* в тесте «Новый аквариум».

# ЗАДАЧИ:

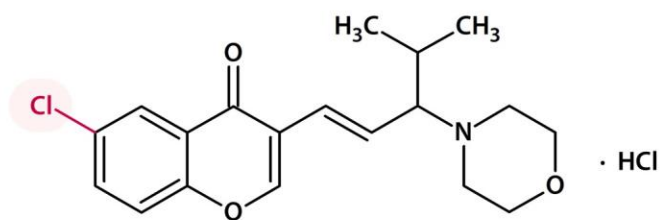
1. Изучить влияние пяти ПАМ различной структуры в различных концентрациях на поведение *Danio rerio* в тесте «Новый аквариум»:

	<b>9a</b>	<b>9j</b>	<b>9l</b>	<b>33a</b>	<b>33b</b>
Исследуемые концентрации	1 мг/л	1 мг/л	1 мг/л	1 мг/л	1 мкг/л
	10 мг/л	10 мг/л	10 мг/л	10 мг/л	10 мкг/л
	20 мг/л	100 мг/л	100 мг/л	100 мг/л	100 мкг/л

2. Оценить значение воздействия на глутаматергическую и холинергическую нейротрансмиссию для реализации поведенческих эффектов ПАМ.

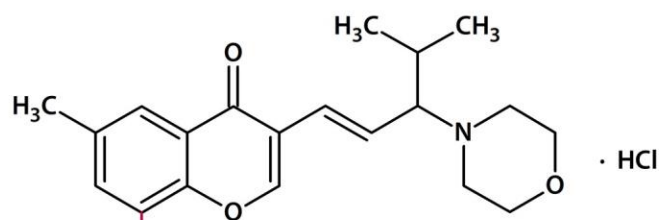


# ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ



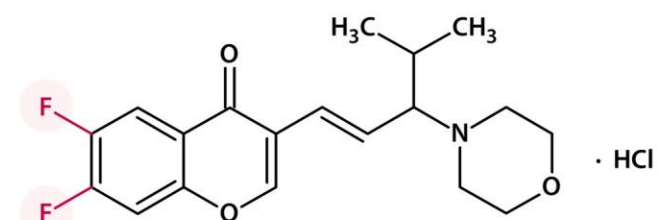
**9a**

(*E*)-4-[3-(6-хлоро-4-оксо-4*H*-хромен-3-ил)-4-метилпент-1-ен-3-ил]морфолин-4-ия хлорид



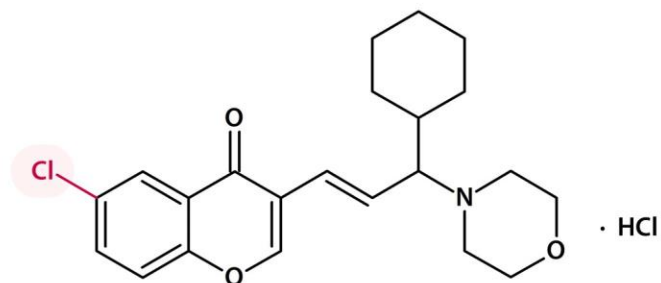
**9j**

(*E*)-4-[1-(8-бром-6-метил-4-оксо-4*H*-хромен-3-ил)-4-метилпент-1-ен-3-ил]морфолин-4-ия хлорид



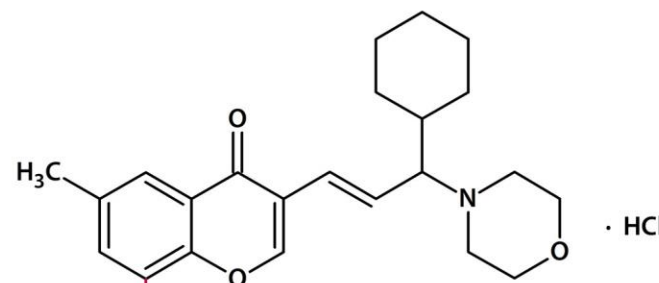
**9l**

(*E*)-4-[1-(6,7-дифтор-4-оксо-4*H*-хромен-3-ил)-4-метилпент-1-ен-3-ил]морфолин-4-ия хлорид



**33a**

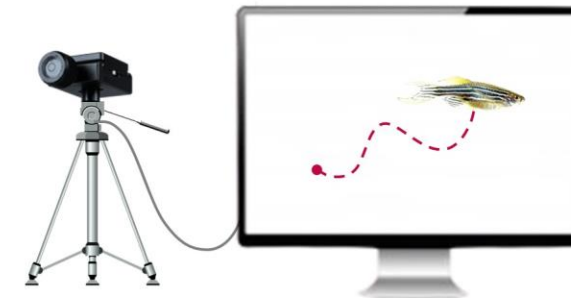
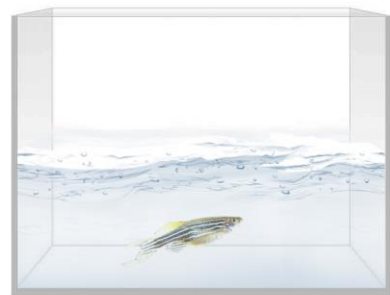
(*E*)-4-[3-(6-хлор-4-оксо-4*H*-хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил]морфолин-4-ия хлорид



**33b**

(*E*)-4-[3-(8-бром-6-метил-4-оксо-4*H*-хромен-3-ил)-1-циклогексилаллил]морфолин-4-ия хлорид

# МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / тест «Новый аквариум»



*Danio rerio*

0.5 л × 20 мин:

«Новый аквариум»<sup>3</sup>

 EthoVision® XT<sup>4</sup>:

♂ 1:1 ♀

● контроль, вода  $n = 16$

5 мин

5-7 месяцев

● ПАМ, концентрация 1  $n = 16$

$n = 320$

● ПАМ, концентрация 2  $n = 16$

(64 × 5)

● ПАМ, концентрация 3  $n = 16$

- проплытая дистанция, см
- средняя скорость, см/с
- максимальная скорость, см/с
- число замираний
- время в неподвижном состоянии, с
- время в верхней части аквариума, с
- число переходов из нижней части аквариума в верхнюю
- латентность первого перехода, с

3. Egan, R. J. et al. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural brain research*, 205(1): 38-44.

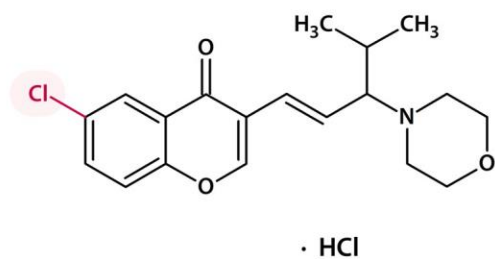
4. Demin, K. A., et al. (2017). Acute effects of amitriptyline on adult zebrafish: Potential relevance to antidepressant drug screening and modeling human toxidromes. *Neurotoxicology and teratology*, 62: 27-33.

# СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ

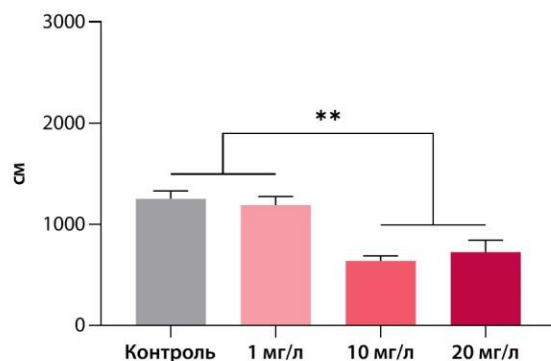
1. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программного обеспечения **GraphPad Prism 8.0.2**;
2. Осуществляли проверку нормальности распределения количественных признаков с использованием  $W$ -критерия Шапиро-Уилка;
3. При нормальном распределении количественных признаков значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с *post hoc* тестом по Тьюки;
4. При ненормальном распределении количественных признаков значимость различий оценивали с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса с *post hoc* тестом по Данну;
5. Числовые данные, приведенные на слайдах, представлены в виде **средних арифметических**; планки погрешностей отражают **стандартные ошибки средних**.



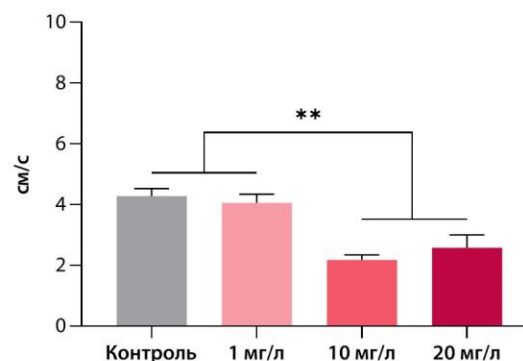
# РЕЗУЛЬТАТЫ / фармакологическая активность ПАМ 9a



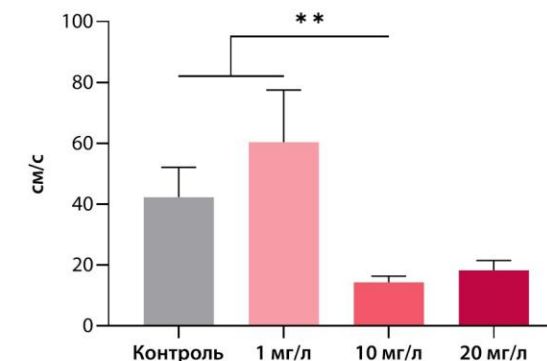
### Проплытая дистанция



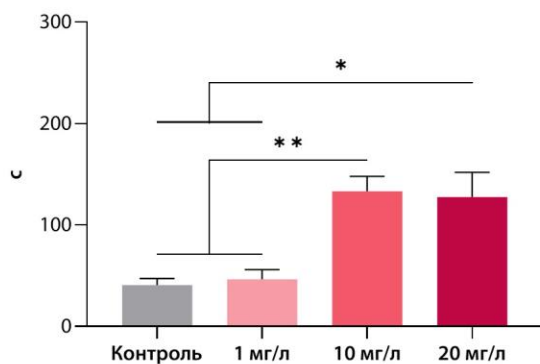
### Средняя скорость



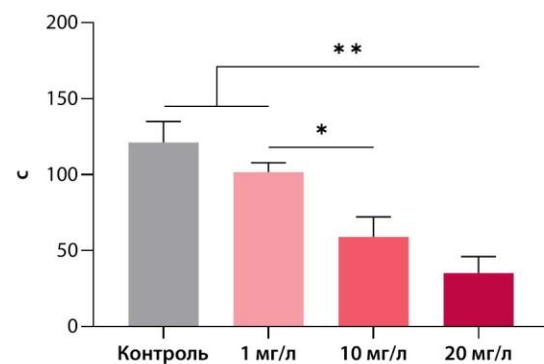
### Максимальная скорость



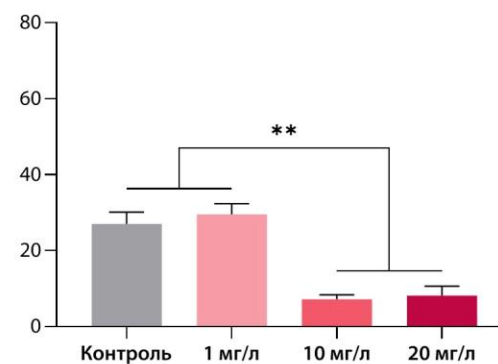
### Время в неподвижном состоянии



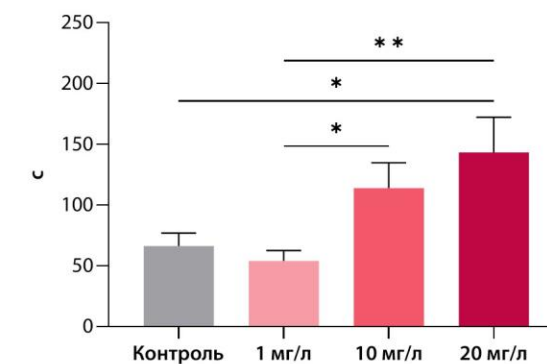
### Время в верхней части



### Число переходов



### Латентность первого перехода

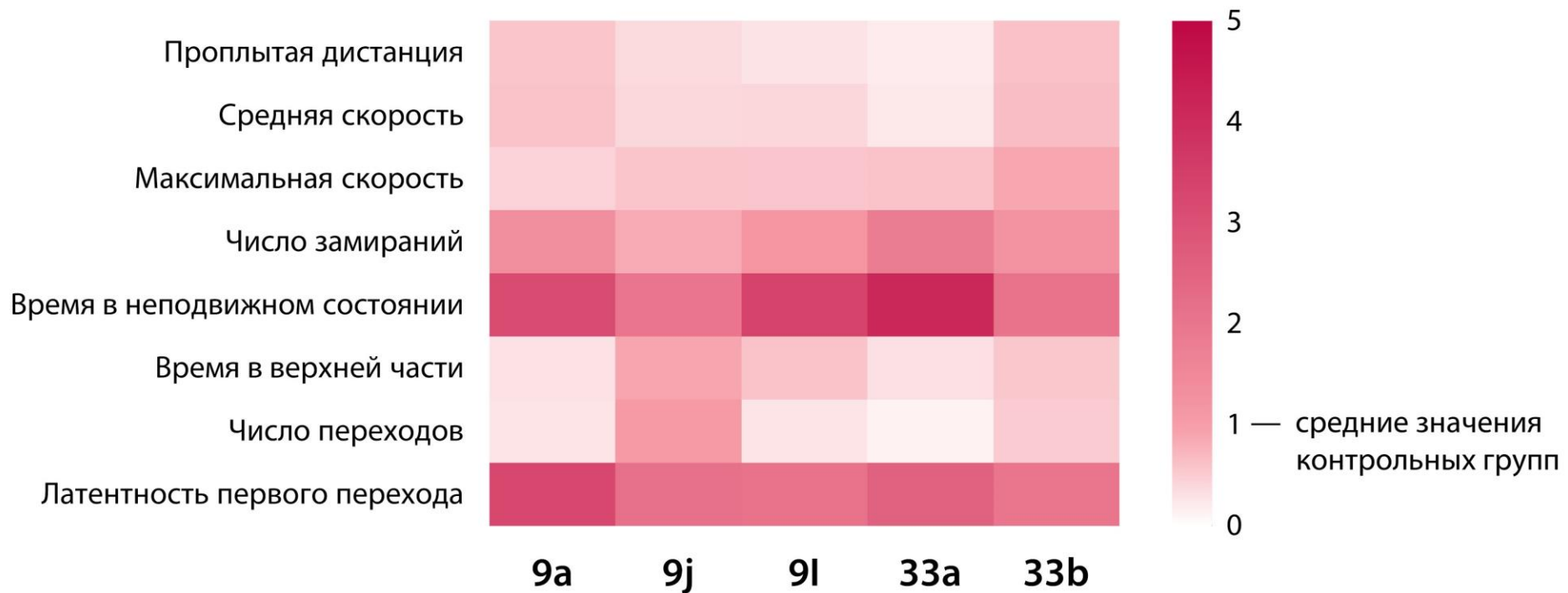


\*  $p < 0.05$

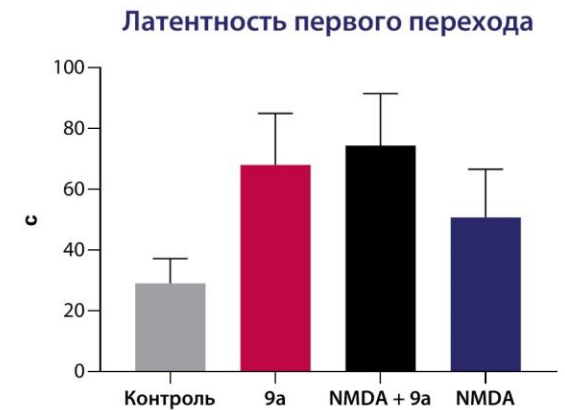
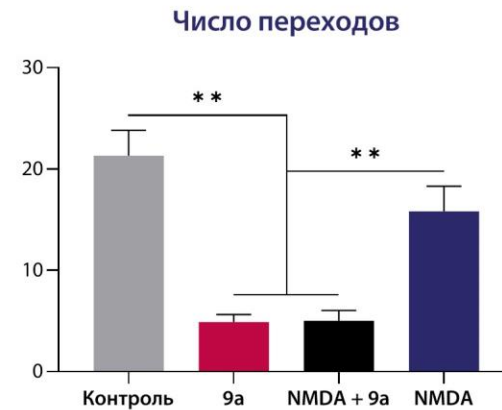
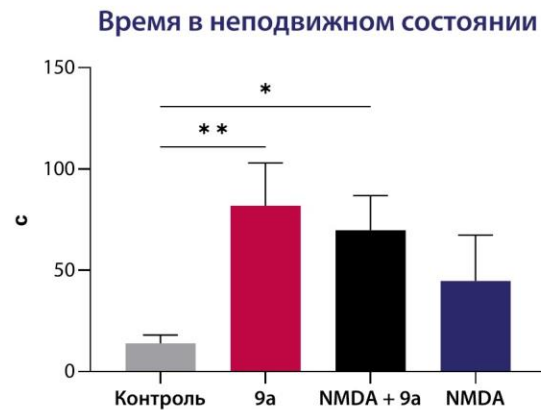
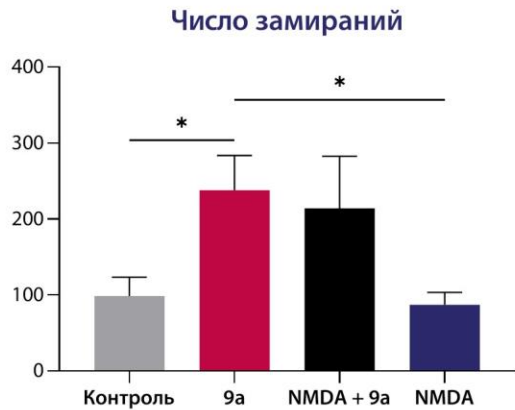
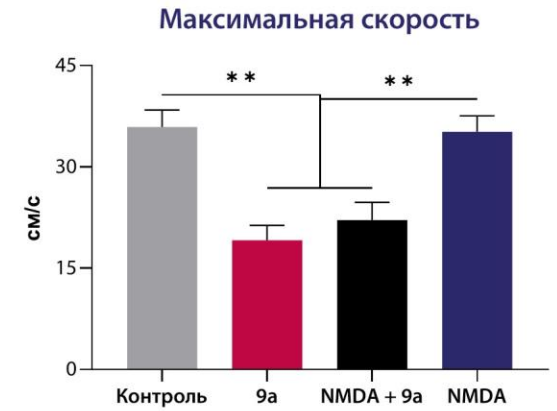
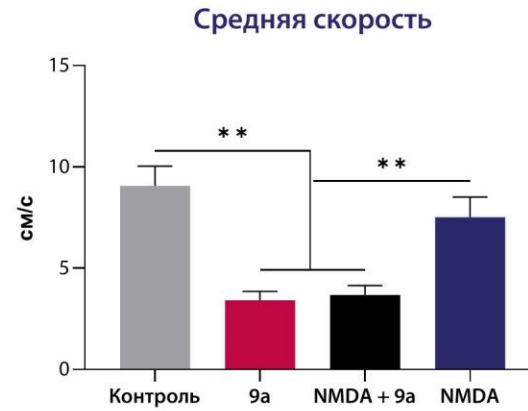
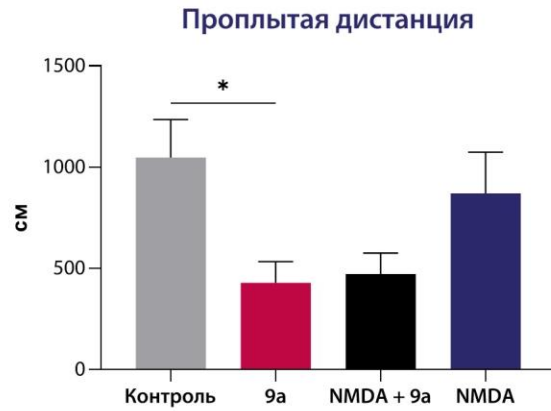
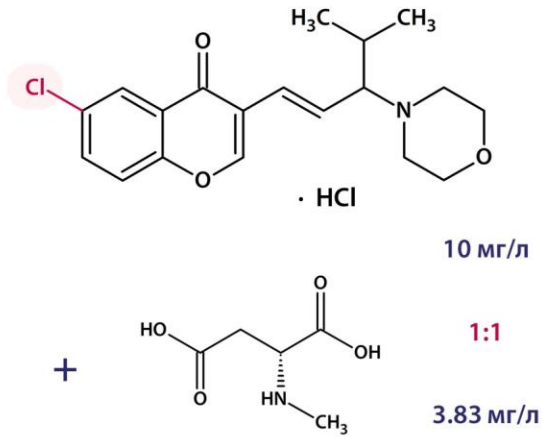
\*\*  $p < 0.01$



# РЕЗУЛЬТАТЫ / фармакологическая активность ПАМ 9a, 9j, 9l, 33a, 33b



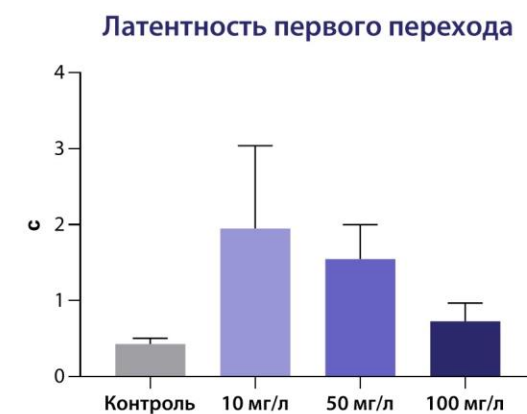
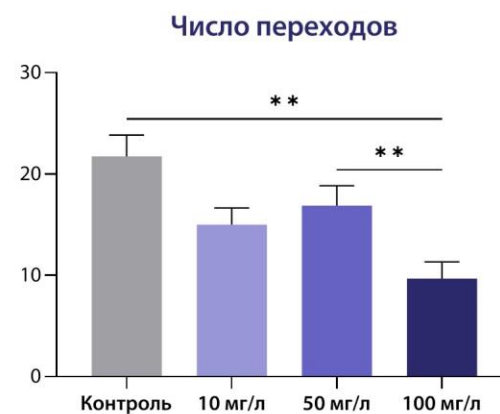
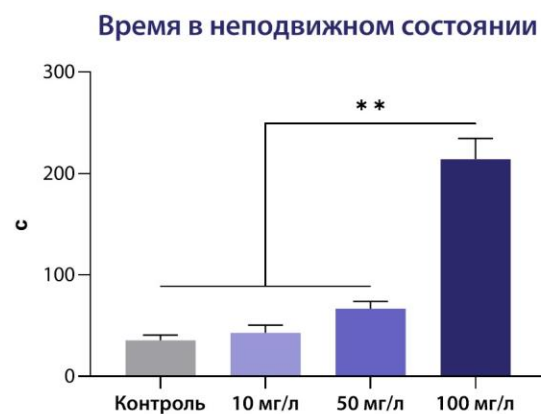
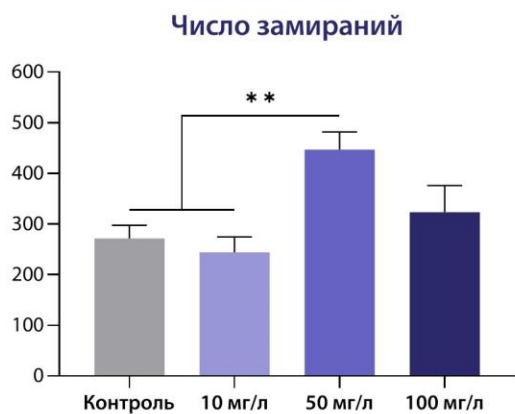
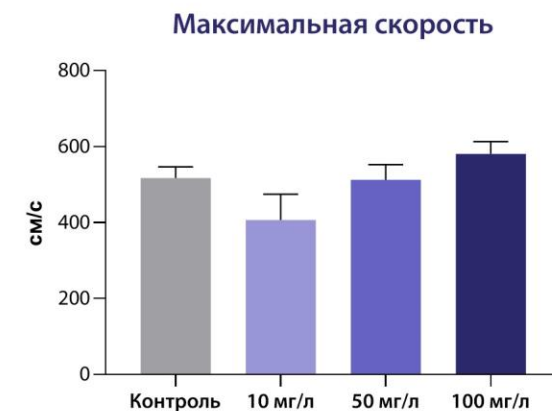
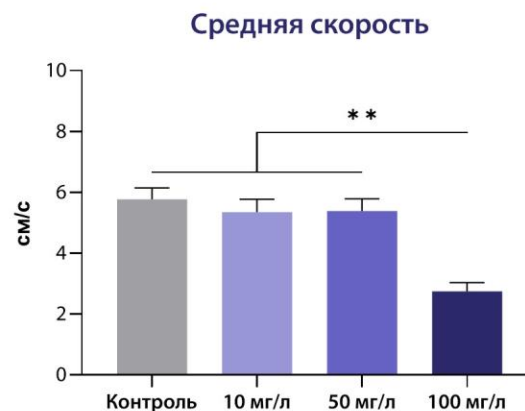
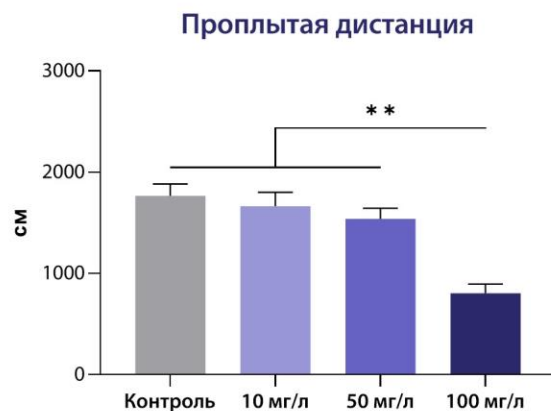
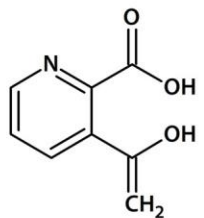
# РЕЗУЛЬТАТЫ / влияние ПАМ 9a на глутаматергическую нейротрансмиссию



\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.01$

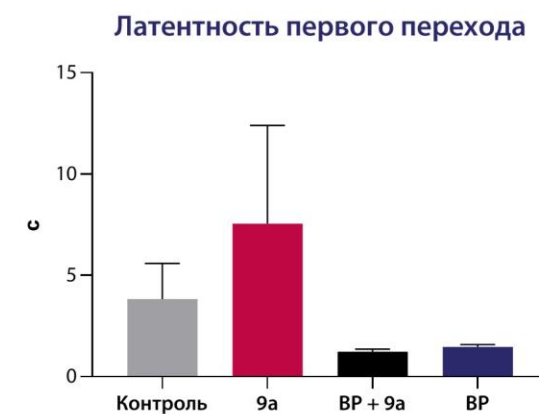
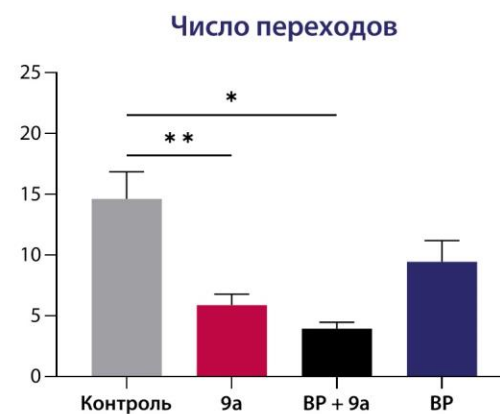
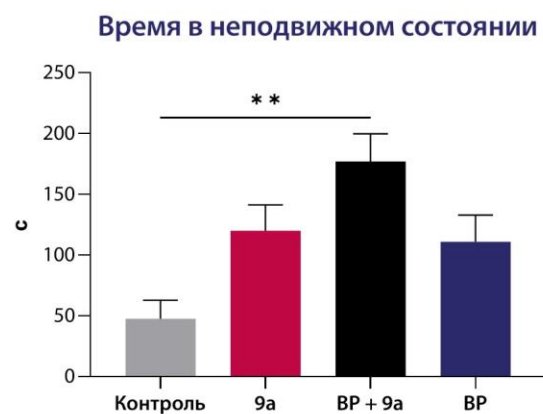
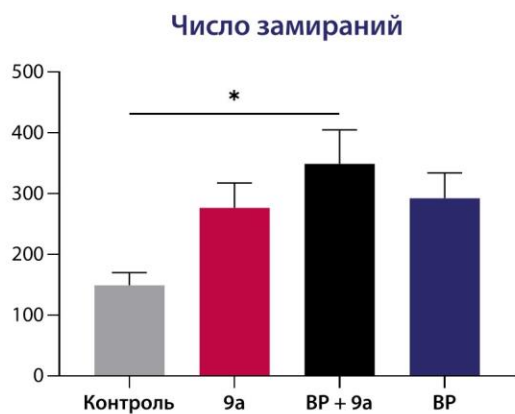
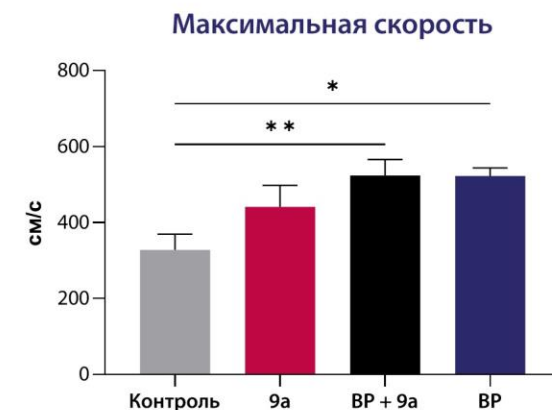
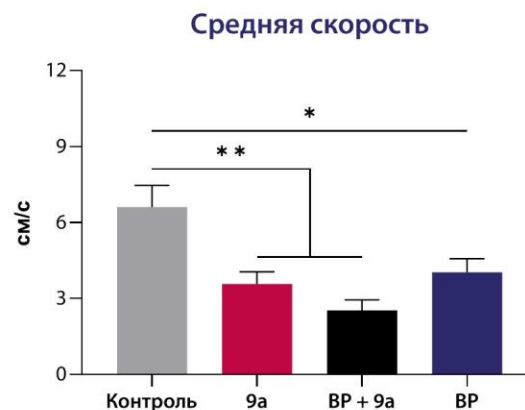
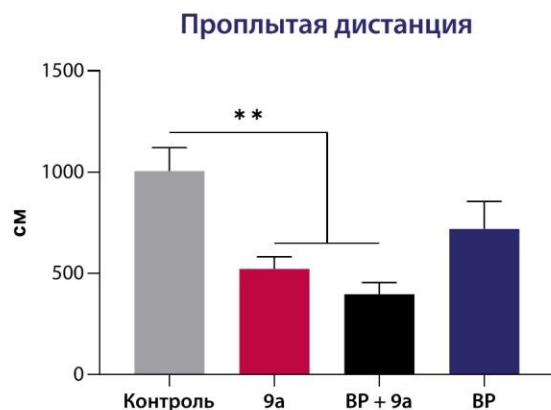
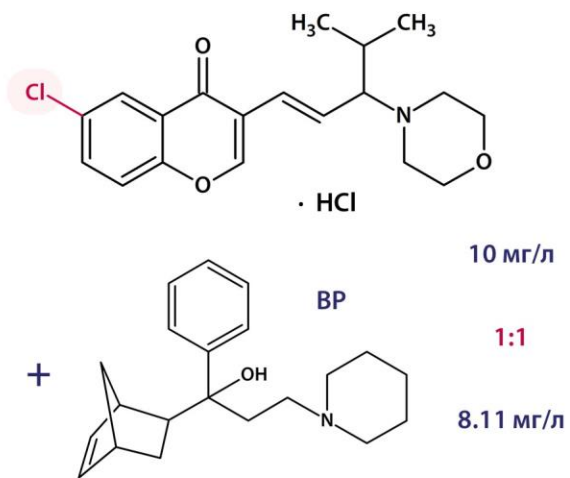
# РЕЗУЛЬТАТЫ / фармакологическая активность хинолиновой кислоты



\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.01$

# РЕЗУЛЬТАТЫ / влияние ПАМ 9a на холинергическую нейротрансмиссию



\* p < 0.05

\*\* p < 0.01



# МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / оценка межвидовой идентичности компонентов холинергической и глутаматергической систем

**BLAST** (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool — средство поиска основного локального выравнивания) — инструмент поиска идентичных участков известных нуклеотидных и/или аминокислотных последовательностей<sup>5</sup>.

FASTA-последовательности (NCBI Gene):

- М-холинорецепторы
- АХЭ, БХЭ
- NMDA-рецепторы

- **BLASTn** (алгоритмы *megablast* и *blastn*): определение межвидовой идентичности нуклеотидных последовательностей — **генов**;
- **BLASTp** (база данных *Reference proteins*): определение межвидовой идентичности аминокислотных последовательностей — **белков**.



ATGAAAGGTGACCTGCAGGC  
TTGTTAGTTCTGAGGAACTG  
CAACACAACGCTAACGTACG  
TGCGACCAGCTGTCTTTAGG  
AGTCCATCTGCAATGCCCTG  
GGACACGTTTTACGCCAACC

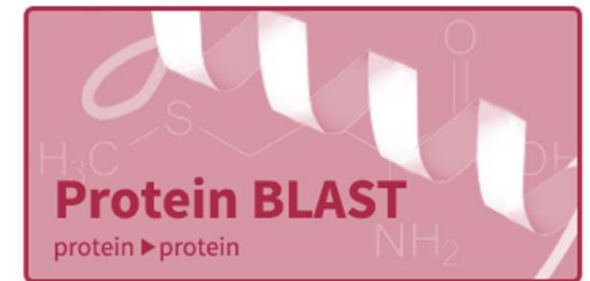
[ncbi.nlm.nih.gov/gene](http://ncbi.nlm.nih.gov/gene)

2.



[blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)

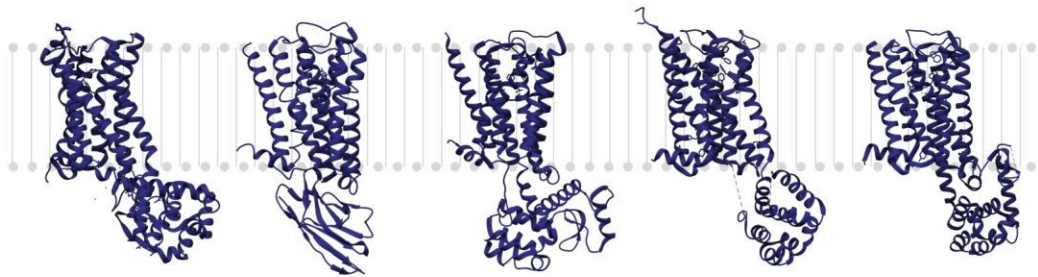
3.



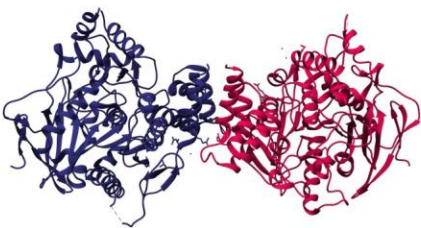
5. Altschul, S. F. et al. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3): 403-410.

# РЕЗУЛЬТАТЫ / межвидовая идентичность компонентов холинергической системы

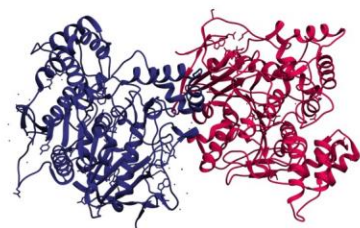
М-холинорецепторы:



CHRM1 M<sub>1</sub>    CHRM2 M<sub>2</sub>    CHRM3 M<sub>3</sub>    CHRM4 M<sub>4</sub>    CHRM5 M<sub>5</sub>



ACHE  
ацетилхолинэстераза



BCHE  
бутирилхолинэстераза



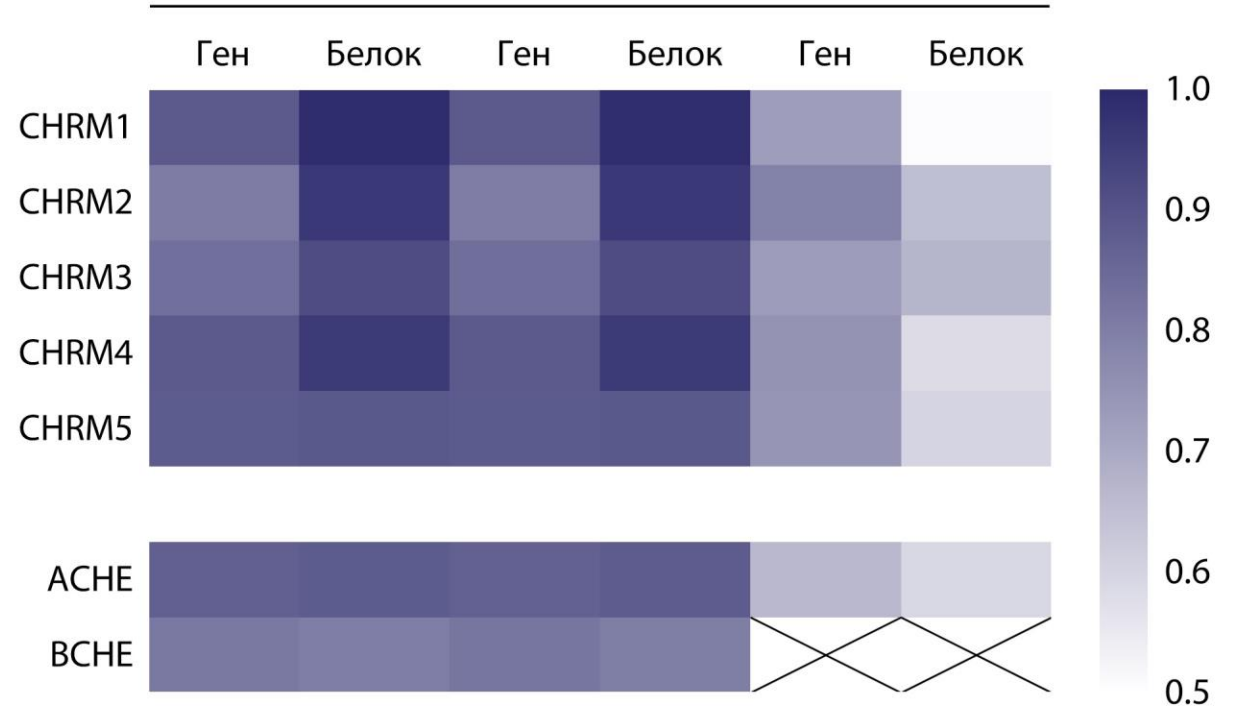
*M. musculus*



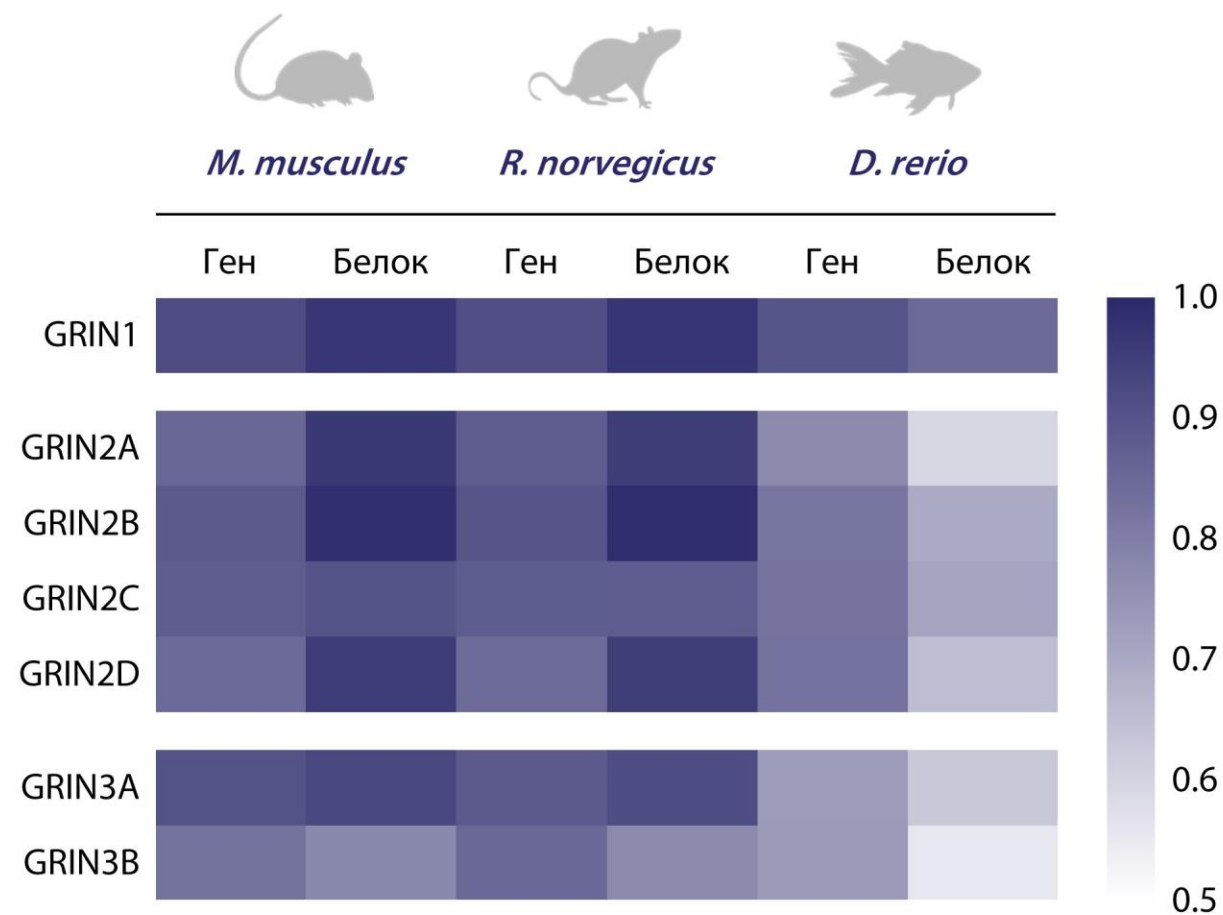
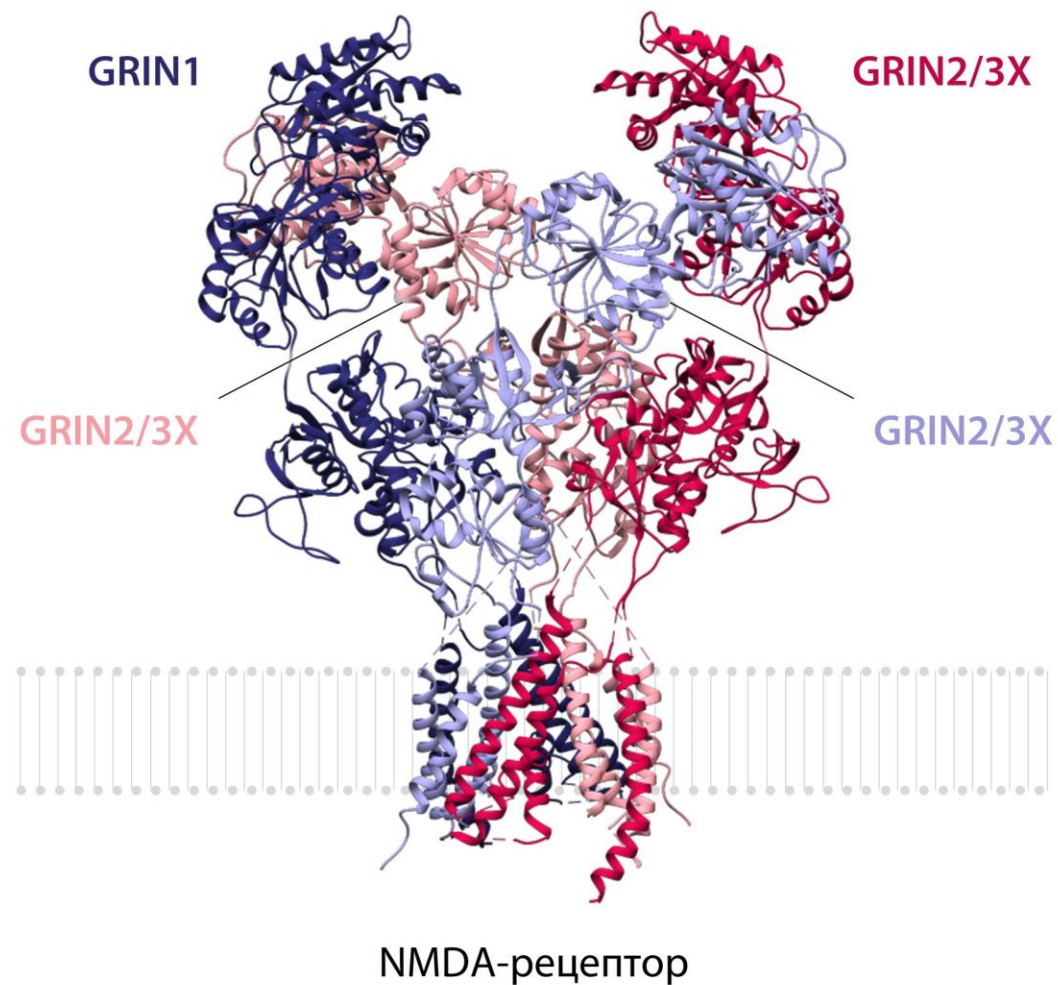
*R. norvegicus*



*D. rerio*



# РЕЗУЛЬТАТЫ / межвидовая идентичность компонентов глутаматергической системы

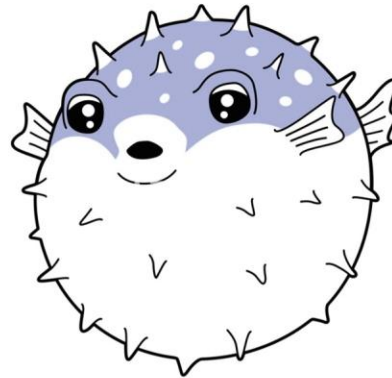


# ВЫВОДЫ

1. Производные аллилморфолина (ПАМ) различной структуры оказывают **седативный эффект** у *Danio rerio* в тесте «Новый аквариум»;
2. Седативный эффект ПАМ не опосредован их действием на **NMDA-рецепторы**;
3. Седативный эффект ПАМ также не опосредован их антихолинэстеразным действием; напротив, ПАМ могут обладать **холиноблокирующей активностью**.



# СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!



**Вероника Александровна Приходько**

Кафедра фармакологии и клинической фармакологии СПХФУ  
[veronika.prihodko@pharminnotech.com](mailto:veronika.prihodko@pharminnotech.com)

Санкт-Петербург  
2021