

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **235217**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **419074**

(51) Int.Cl.

A61K 31/473 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **11.10.2016**

(54)

Zastosowanie medyczne magnofloryny

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

23.04.2018 BUP 09/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

15.06.2020 WUP 07/20

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,
Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**WIRGINIA KUKUŁA-KOCH, Lublin, PL
MARTA KRUK-SŁOMKA, Lublin, PL
GRAŻYNA BIAŁA, Lublin, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Anna Bełz

PL 235217 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie medyczne magnofloryny o właściwościach poprawiających pamięć oraz przeciwamnestycznych do leczenia upośledzenia/zaburzenia pamięci.

Choroby neurodegeneracyjne stanowią coraz większy problem dotyczący mieszkańców krajów rozwiniętych. Rozwój medycyny oraz wzrost świadomości pacjentów przyczyniły się do wydłużenia życia, co sprzyja zaburzeniom pracy OUN. Choroby neurodegeneracyjne spowodowane są nieodwracalnym uszkodzeniem (degeneracją) i w konsekwencji przyspieszoną śmiercią komórek nerwowych (apoptozą). Najczęściej występującą chorobą neurodegeneracyjną jest choroba Alzheimera (AD), która charakteryzuje się dysfunkcją układu cholinergicznego – degeneracją neuronów cholinergicznym i spadkiem stężenia acetylocholino (ACh), neuroprzekaźnika kluczowego dla procesów kognitywnych. Z tego względu zaburzenia kognitywne są podstawowym objawem AD.

Szacuje się, że liczba osób cierpiących na AD podwoi się do 2050 roku – z 25 milionów do około 50 milionów chorych. Wobec powyższego, jedną z kluczowych potrzeb badawczych jest zwiększenie skuteczności istniejących i opracowanie nowych strategii terapeutycznych AD oraz poszukiwania skutecznych leków hamujących procesy neurodegeneracyjne w OUN.

Aktywnością tego typu odznaczają się związki o charakterze polarnym lub umiarkowanie polarnym, do których możemy zaliczyć wybrany związek. Istniejące dane literaturowe dotyczące wpływu alkaloidów izochinolinowych na funkcje OUN potwierdzają ich zdolność do przenikania przez barierę krew-mózg po podaniu obwodowym.

W badaniach przeprowadzanych przy urazowym uszkodzeniu mózgu, Chen i wsp. (2014) podawali myszom dawki 10 mg/kg berberyny – wzorcowego alkaloidu izochinolinowego. Badania właściwości neuroprotektoryjnych, przeciwzapalnych oraz testy przenikalności przez barierę krew-mózg potwierdziły ochronne działanie berberyny oraz jej zdolność do przenikania do mózgu już po 10 minutach od podania (Chen et al., 2014). Działanie to wynikało ze zmniejszenia przenikalności leukocytów do miejsca urazu. Ponadto testy na szczurach, którym podawano wyciąg z *Coptis chinensis*, którego głównym ciałem czynnym jest berberyna, wykazały działanie przeciw-amnestyczne wyciągów w zwierzęcym modelu amnestycznym przy użyciu skopolaminy (Hsieh et al., 2000).

Wynalazek dotyczy zastosowania magnofloryny z grupy alkaloidów izochinolinowych do leczenia upośledzenia pamięci zwłaszcza długotrwałego lub zaburzenia pamięci.

Przeprowadzone badania dotyczą istotnego zagadnienia, jakim jest prewencja chorób ośrodkowego układu nerwowego (OUN), zwłaszcza chorób neurodegeneracyjnych, przy zastosowaniu substancji pochodzenia roślinnego.

Jak się nieoczekiwanie okazało, w wyniku badań, magnofloryna wykazuje właściwości poprawiające pamięć oraz przeciwamnestyczne – odwracanie upośledzenia pamięci. Dzięki tym właściwościom może być stosowana jako substancja aktywna w otrzymywaniu preparatów farmaceutycznych do leczenia chorób przebiegających z zaburzeniami pamięci.

Metodyka i cel badań

Badania *in vivo* mające na celu ocenę wpływu jednorazowego i przewlekłego podawania magnofloryny na procesy formowania się szlaków pamięciowych u myszy przy użyciu zwierzęcego testu pamięci: testu biernego unikania (passive avoidance, PA).

Procedura testu umożliwi ocenę formowania się szlaków kognitywnych zarówno pamięci krótko-, jak i długotrwałej. Obok efektów kognitywnych magnofloryny, oceniony został również jej wpływ na upośledzenie pamięci wywołane podaniem skopolaminy. Skopolamina jako antagonist cholinergicznym receptorów muskarynowych, blokując transmisję cholinergiczną, jest jednym z częściej używanych w farmakologii doświadczalnej zwierzęcym modelem amnestycznym służących do wywołania deficytów pamięciowych.

Magnoflorynę podawano zwierzętom przed iniekcją skopolaminy, by w ten sposób ocenić potencjalną możliwość odwracania przez magnoflorynę zaburzeń pamięci indukowanych skopolaminą. Dodatkowo, oceniony został także wpływ magnofloryny na aktywność lokomotoryczną myszy, gdyż jakiegokolwiek zaburzenia aktywności lokomotorycznej mogą mieć wpływ na wyniki badań w opisanym powyżej teście pamięci. Niniejszy test miał także wykluczyć ewentualne efekty toksyczne wywołane przez badaną substancję, które objawiać się mogą zaburzeniem aktywności lokomotorycznej u zwierząt.

Opis przeprowadzonych badań:

a) Badania aktywności lokomotorycznej

Badanie ruchliwości spontanicznej u myszy przeprowadza się w urządzeniach fotoopornikowych, zgodnie z ogólnie akceptowaną procedurą (Vogel and Vogel, 1997). W przebiegu zaplanowanego doświadczenia zwierzęta zostały umieszczone w pojemniku z metalu (średnica 32 cm), przez który biegną dwa prostopadłe do siebie promienie świetlne, na wysokości 1 cm. Zainstalowane wewnątrz fotooporniki, na które padają promienie, rejestrowały jako ruch każde przerwanie promienia przez poruszające się zwierzę. Czas pomiaru wynosił 60 min. Konieczność wykonania niniejszego testu wynika z tego, iż wpływ związków na aktywność lokomotoryczną może modyfikować zachowanie się zwierząt w zaplanowanych testach.

Magnoflorinę, w różnych dawkach (10, 20, 50 mg/kg m.c.) oraz sól fizjologiczną, dla grupy kontrolnej, podano jednorazowo dootrzewnowo (i.p.). 30 minut po ostatniej iniekcji dokonano pomiaru ruchliwości lokomotorycznej zwierząt w aktymetrach – przez 60 minut. Wyniki porównano do grupy kontrolnej.

Podczas całej procedury zwierzęta miały zapewnione standardowe warunki takie jak: temperaturę, hałas i oświetlenie oraz wolny dostęp do pożywienia i wody (z wyjątkiem trwania pomiaru aktywności lokomotorycznej).

Wyniki: Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w ruchliwości zwierząt dla dwóch dawek magnofloryny: 10 oraz 20 mg/kg m.c. w porównaniu z grupą kontrolną, otrzymującą sól fizjologiczną, co obrazuje poniższa figura. Dawka magnofloryny (50 mg/kg m.c.) istotnie statystycznie zwiększała aktywność lokomotoryczną myszy, została więc wykluczona z dalszych eksperymentów (Fig. 1).

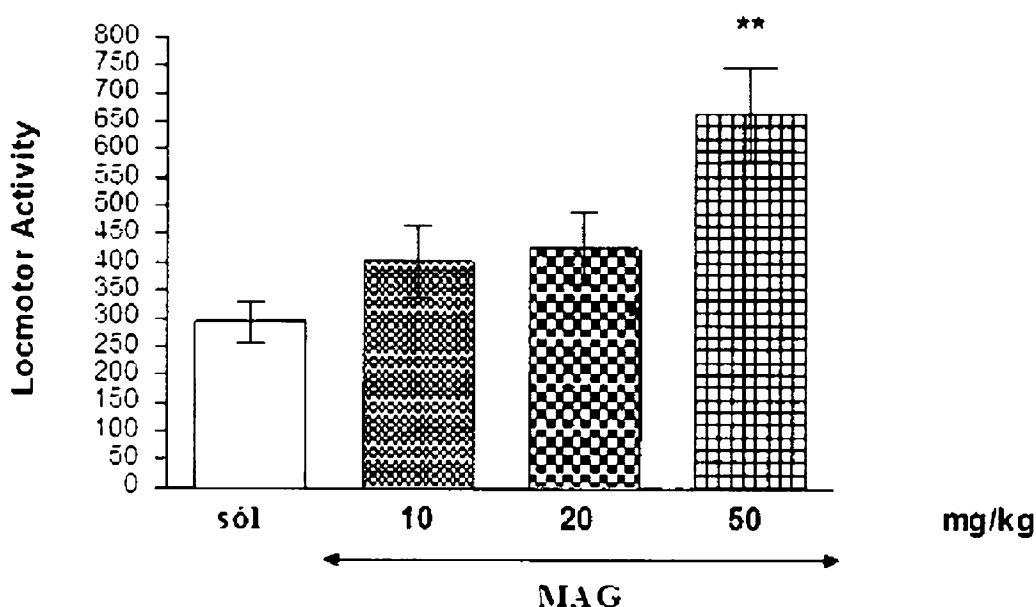


Fig. 1. Ocena aktywności lokomotorycznej dla trzech badanych dawek magnofloryny: 10, 20, 50 mg/kg m.c. ** $p < 0,01$ vs. sól; test post-hoc Tukeya

b) Ocena procesów pamięci krótko- i długotrwałej (procedura ogólnie akceptowana, Javadi-Paydara et al., 2011). Procesy kognitywne oceniano przy użyciu testu PA. Test wykonywany był w aparacie zbudowanym z połączonych ze sobą zamykanym przejściem dwóch pomieszczeń – oświetlonego oraz ciemnego. Podłoga pomieszczenia ciemnego posiadała pręty przewodzące prąd elektryczny o ustalonych parametrach (0,6 mA przez 2 s).

Procedura doświadczalna testu PA obejmowała następujące sesje:

- **habitucję** (zaznajomienie gryzoni ze środowiskiem doświadczalnym. Zwierzę umieszczano w jasnym pomieszczeniu aparatu, przy zamkniętych drzwiach, na około 30 s);

- **sesję treningową** (po upływie czasu habituacji otwierano drzwi oddzielające pomieszczenie jasne i ciemne. Wiedzione naturalnym instynktem gryzonie przechodziły do pomieszczenia ciemnego, gdzie wyzwalany był impuls elektryczny, odbierany przez zwierzę jako negatywny bodziec. Mierzono czas, jaki upłynął do momentu przejścia zwierzęcia z jasnego do ciemnego pomieszczenia (TL1);
- **test właściwy** po zakończeniu sesji treningowej przeprowadzano test, polegający na ponownym umieszczeniu gryzonia w jasnej części aparatu i pomiarze czasu przejścia myszy do ciemnego pomieszczenia (TL2). Podczas testu właściwego nie wyzwalano już impulsu elektrycznego. Czas przebywania gryzonia w nieoświetlonym pomieszczeniu mógł maksymalnie wynosić 300 s. W przypadku braku reakcji zwierzęcia, test przerywano zapisując wynik 300 s. Test właściwy przeprowadzany był po 2 h (do oceny pamięci krótkotrwałej) lub 24 h (do oceny pamięci długotrwałej) po sesji treningowej.

Związki wpływające korzystnie na procesy pamięci i uczenia się podczas testu właściwego wydłużają czas przejścia myszy z jasnego do ciemnego pomieszczenia testu PA, w odniesieniu do odpowiedniej grupy kontrolnej. Natomiast substancje, które osłabiają pamięć, skracają ten czas, w odniesieniu do danej grupy kontrolnej.

Podczas całej procedury zwierzęta miały zapewnione standardowe warunki takie jak: temperaturę, hałas i oświetlenie oraz wolny dostęp do pożywienia i wody (z wyjątkiem trwania sesji treningowej i testu właściwego).

Myszom podawano trzy dawki magnofloryny (i.p.): 10, 20 i 50 mg/kg m.c. 30 min przed rozpoczęciem sesji treningowej w teście PA. Następnie po 2 h (w przypadku oceny pamięci krótkotrwałej) lub po 24 h (kolejna grupa myszy do oceny pamięci długotrwałej) przeprowadzano test właściwy. Wyniki porównano do grupy kontrolnej, której podano sól fizjologiczną.

Opracowanie wyników dotyczących procesów kognitywnych odbyło się w oparciu o tzw. Indeks Przejścia (IP), który wyraża się wzorem:

$$IP1 = (TL2 - TL1)/TL1$$

TL1 – czas przejścia zwierzęcia z jasnego do nieoświetlonego pomieszczenia w trakcie trwania sesji treningowej;

TL2 – czas przejścia zwierzęcia z jasnego do nieoświetlonego pomieszczenia w trakcie trwania sesji właściwej.

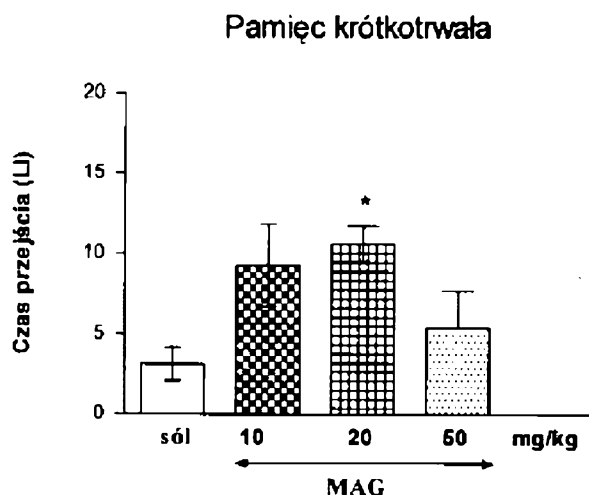
Wysoka wartość IP po podaniu danych substancji oznacza, że wpływają one korzystnie na procesy formowania się szlaków pamięciowych. Niska wartość IP świadczy o tym, że badana substancja zaburza procesy kognitywne. Wyniki są porównywane z odpowiednimi grupami kontrolnymi.

Ocenę statystyczną wyników przeprowadzono posługując się analizą wariancji ANOVA. Porównania pomiędzy grupami dokonano wykorzystując test post-hoc Tukeya. Istotne statystycznie różnice występowały wtedy, gdy wartość parametru „p” była mniejsza niż 0,05 ($p < 0,05$). Średnie wyniki z poszczególnych grup przedstawiono z uwzględnieniem odchylenia standardowego (SEM).

Wyniki: Magnofloryna w dawce 20 mg/kg m.c. poprawiała procesy kognitywne pamięci krótko- i długotrwałej u myszy w teście PA, gdyż znacząco wydłużała czas przejścia zwierząt do ciemnego pomieszczenia w trakcie trwania testu właściwego. Zwierzęta kojarzyły ciemne pomieszczenie z negatywnym bodźcem elektrycznym, co tłumaczy ich przedłużony czas przebywania w jasnym pomieszczeniu i niechęć do wejścia do pomieszczenia ciemnego.

Pojedyncza dawka alkaloidu (20 mg/kg m.c., i.p.) poprawiała funkcje kognitywne, oceniane zarówno tego samego dnia – po 2 h od sesji treningowej, ale również 24 h po teście, co potwierdziło wpływ alkaloidu zarówno na procesy pamięci krótko-, jak i długotrwałej. Dawka 10 mg/kg m.c. wykazywała zbliżoną tendencję prokognitywną, niemniej otrzymane wyniki nie były istotne statystycznie. Najwyższa z użytych dawek magnofloryny – 50 mg/kg m.c. nie wpływała na procesy kognitywne (Fig. 2A i 2B).

A



B

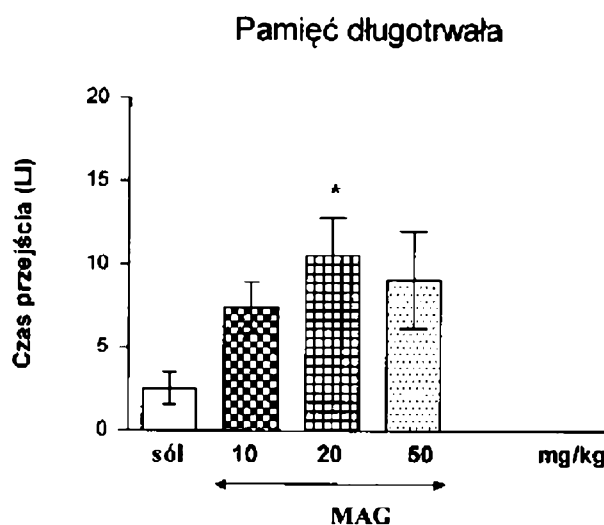


Fig. 2. Wpływ magnofloryny na pamięć krótkotrwałą (A) oraz długotrwałą (B) w zastosowanych dawkach 10, 20 i 50 mg/kg m.c., w porównaniu z grupą kontrolną (sól). * $p < 0,05$ vs. sól; Test post-hoc Tukeya.

- c) Ocena wpływu magnofloryny na upośledzenie procesów formowania się szlaków pamięci krótkotrwałej i długotrwałej indukowane jednorazowym podaniem skopolaminy (1 mg/kg m.c., i.p.) – ogólnie akceptowany model amnestyczny (Javadi-Paydara et al., 2011).

Ocenę powyższych działań prowadzono przy zastosowaniu testu PA według procedury opisanej w punkcie (b), opartej na habituacji, sesji treningowej i teście właściwym.

Magnoflorynę (10 i 20 mg/kg, i.p.) podawano 15 min przed iniekcją skopolaminy (1 mg/kg m.c., i.p.) lub w przypadku grupy kontrolnej: sól fizjologiczną – przed iniekcją skopolaminy (1 mg/kg m.c., i.p.). Po 15 min od ostatniej iniekcji przeprowadzono sesję treningową testu PA, a 24 h po sesji treningowej wykonano test właściwy, według analogicznego schematu jak w punkcie (b).

Skopolamina jest jednym z częściej używanym w farmakologii behawioralnej zwierzęcym modelem amnestycznym. Blokując cholinergiczne receptory muskarynowe powoduje upośledzenie transmisji cholinergicznej, a przez to spadek procesów kognitywnych. Zastosowanie skopolaminy w przedstawionych badaniach miało na celu upośledzenie pamięci u zwierząt, by móc ocenić wpływ magnofloryny na indukowane skopolaminą dysfunkcje pamięci.

Magnofloryna w przeprowadzonych badaniach odwracała zaburzenia pamięci długotrwałej indukowane skopolaminą (Fig. 3), zarówno w dawce 10 mg/kg m.c. oraz 20 mg/kg m.c., w porównaniu do skopolaminowej grupy kontrolnej. Niniejsze wyniki świadczą o właściwościach przeciwmnesticznych alkaloidu izochinolinowego, czyli zdolności do odwracania działania upośledzającego pamięć, wywołanego skopolaminą.

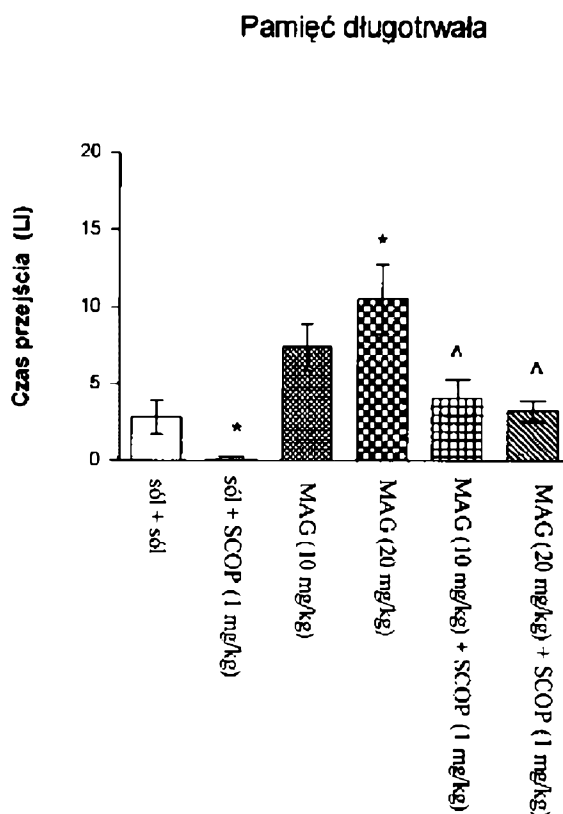


Fig. 3. Wyniki oceny wpływu magnofloryny w dawkach 10 i 20 mg/kg m.c. na skopolaminowe (1 mg/kg m.c.) upośledzenie procesów pamięci długotrwałej. Wyniki porównywano do grupy kontrolnej, która otrzymywała jednorazową iniekcję skopolaminy (1 mg/kg m.c.) poprzedzoną iniekcją soli fizjologicznej. * $p < 0,05$ vs. sól; ^ $p < 0,05$ vs. sól/scop (1 mg/kg); test post-hoc Tukeya

Zbadane w testach *in vivo* na myszach właściwości farmakologiczne magnofloryny podawanej w dawce 20 mg/kg m.c. potwierdzają możliwość jej stosowania jako leku prokognitywnego w wielu chorobach przebiegających z deficytami pamięci, jak choroby otępienne, np. choroba Alzheimera. Udowodniono, że magnofloryna wpływa korzystnie na procesy pamięci krótkotrwałej oraz długotrwałej, jak również odwraca mnesticzne działanie skopolaminy, silnego leku zaburzającego pamięć. Wybrane do badań dwie dawki (10 oraz 20 mg/kg m.c.) nie wywierały wpływu na aktywność lokomotoryczną myszy, co może świadczyć o dobrej tolerancji alkaloidu w tak dobranych dawkach.

Otrzymane wyniki pozwalają potwierdzić efekt) prokognitywne magnofloryny i kwalifikować ją do dalszych badań farmakologicznych.

Biorąc pod uwagę oceniany wcześniej wpływ magnofloryny na poziom ACh (Kukula-Koch, Mroczek, 2015), jak i obecne badania na poziomie behawioralnym, można sugerować o dużym wpływie tego związku na transmisję cholinergiczną i związane z tym procesy kognitywne. Być może magnofloryna stanie się nowym punktem terapii wielu chorób przebiegających z upośledzeniem pamięci, zwłaszcza tych, w które zaangażowane są szlaki cholinergiczne, jak np. AD.

Zastrzeżenie patentowe

1. Magnofloryna do zastosowania w profilaktyce i leczeniu upośledzenia lub zaburzenia pamięci.