

На правах рукописи

Ленская Карина Владимировна

**ЦИКЛИЧЕСКИЕ ГУАНИДИНЫ - НОВЫЙ КЛАСС
ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИХ СРЕДСТВ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Волгоград – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России

Научные консультанты:

Заслуженный деятель науки РФ,
Академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Спасов Александр Алексеевич

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник

Васильев Павел Михайлович

Официальные оппоненты:

Заслуженный деятель науки РФ,
Заведующая лабораторией
психофармакологии ФГБНУ НИИ Фармакологии им.Закусова,
доктор медицинских наук, профессор

Воронина Татьяна Александровна

заведующий кафедрой
фармакологии и клинической
фармакологии ФГБОУ ВО СПХФА Минздрава России,
доктор медицинских наук, профессор

Оковитый Сергей Владимирович

член-корреспондент РАН
заведующий кафедрой
фармакологии ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук, профессор,

Галенко-Ярошевский Павел Александрович

Ведущее учреждение:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Белгородский государственный национальный исследовательский университет"

Защита диссертации состоится «__» _____ 2017 г. в «__» часов на заседании Диссертационного совета Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России по адресу: г.Волгоград, пл.Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан _____ 2017

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Сахарный диабет типа 2 представляет собой серьёзную медико-социальную проблему, значимость которой обусловлена его высокой распространенностью, хроническим течением, высоким уровнем инвалидизации и смертности больных в результате развития поздних сердечно-сосудистых осложнений и дисфункции эндотелия, а также необходимостью создания системы специализированной помощи больным (Аметов А.С., 2014). По данным ВОЗ, сахарный диабет увеличивает смертность в 2—3 раза и сокращает продолжительность жизни. При этом заболеваемость ежегодно увеличивается во всех странах на 5-7%, а каждые 12-15 лет – удваивается (Дедов И.И., 2011; Петров В.И., 2013).

Одно из направлений поиска – циклические гуанидины. (Valerie A., 2000; Scott D. Larsen., 2001; Fumiyoshi Ishikawa, 1978). Учитывая, что производные гуанидина, в частности метформин является золотым стандартом современной фармакотерапии сахарного диабета, интенсивно проводятся исследования для создания на базе гуанидинов новых лекарственных средств. Ранее проводились исследования на кафедре фармакологии ВолгГМУ совместно с НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, которые показали, что среди этих веществ есть соединения с высокой гипогликемической активностью. Вследствие этого, направленный поиск позволит найти активные вещества среди новых производных циклических гуанидинов.

Несмотря на значительные достижения современной антидиабетической фармакотерапии отмечаются различные формы устойчивости к назначаемым препаратам, со сложным генезом развития побочных эффектов (Стаценко М.Е., 2015; Mazzi R., 2007; Недогода С.В., 2015). Стадийность и особенности генеза сахарного диабета сказываются на развитии резистентности к лекарственным препаратам, либо оказывают большое количество отрицательных эффектов (Drucker D.J., 2006; Тюренков И.Н., 2008).

В существующем многообразии лекарственных препаратов, применяемых в клинике, не существует препарата, влияющего на патогенетические звенья сахарного диабета, кроме того длительная терапия любым из существующих препаратов приводит к развитию толерантности, поэтому целесообразность создания новых высокоэффективных и низкотоксичных препаратов остается актуальной. В настоящее время существует два подхода к поиску новых веществ с

гипогликемической активностью: оптимизация структуры известных лекарственных препаратов для снижения токсичности и увеличение эффективности (Зефирова О. Н., 2000) и мишень-ориентированный поиск (Спасов А.А., 2013).

В данной работе разработана система ретроспективного и проспективного прогноза, позволившая провести анализ существующих баз данных по структуре и активности соединений для поиска новых эффективных гипогликемических веществ.

Степень научной разработанности проблемы

Производные гуанидина с прошлого столетия привлекают внимание в качестве основы создания препарата для лечения сахарного диабета.

Один из препаратов данной группы, используемый в клинической практике – метформин, который по последним данным является активатором АМК-киназы (Carling, D., 2004; DeSimone 2004), что вероятно, и определяет его мультитаргетность и плеiotропность действия.

В этой связи, не меньший интерес вызывают и другие гуанидины, в частности, циклические гуанидины (Valerie A., 2000; Scott D. Larsen., 2001; Спасов А.А, 1999; Fumiyoshi Ishikawa, 1978).

В ВолгГМУ совместно с НИИ ФОХ ЮФУ инициировались попытки поиска гипогликемических соединений гуанидинсодержащих структур, на основе конденсированных амибензимидазолов, в узких гомологических рядах (Анисимова, 1995). Были выявлены активные вещества, которые по силе гипогликемического действия не уступали препаратам сравнения (метформин, глибенкламид) (Дудченко Г.П., 1996).

В настоящее время создан банк данных производных циклических гуанидинов, более 1000 соединений. В связи с этим, очевидно важным является проведение анализа перспективности на гипогликемическую активность препаратов из банка данных и углубленное изучение их фармакологических свойств.

Целью настоящего исследования является разработка системы направленного поиска среди нового класса – циклических гуанидинов, соединений с гипогликемической активностью; изучение антидиабетогенного механизма действия наиболее активных веществ; проведение комплекса доклинических испытаний наиболее перспективных соединений с антидиабетическими свойствами.

Задачи исследования:

1. Теоретическое и экспериментальное обоснование перспективности нового класса «привилегированных молекул» – циклических гуанидинов как источника веществ с высокой гипогликемической активностью.
2. Создание системы направленного поиска *in silico* новых эффективных гипогликемических соединений среди производных циклических гуанидинов - конденсированных бензимидазолов на основе 2D- и 3D-QSAR технологий, методов 3D-молекулярного моделирования и докинга в релевантные белки-мишени, с использованием баз данных по структуре и активности известных гипогликемических лекарственных веществ и новых испытанных соединений.
3. С применением разработанной системы компьютерного поиска и экспериментальных методик, проведение многоэтапного итеративного скрининга циклических гуанидинов, обладающих гипогликемическими свойствами, с отбором соединений-лидеров для дальнейших углубленных испытаний.
4. С использованием методов 3D-молекулярного моделирования и методов докинга в релевантные белки-мишени проведение анализа *in silico* возможных механизмов действия наиболее активных веществ.
5. Изучение гипогликемической активности исследуемых веществ на интактных животных, а также при моделировании экспериментального сахарного диабета типа 2 (стрептозотоциновый сахарный диабет) при курсовом введении.
6. Изучить влияние соединения диабенол на структуру островков Лангерганса и секрецию инсулина (на количество С-пептида).
7. Изучить инкретиномиметический эффект диабенола (субстанция и гранулята таблеток).
8. Исследовать механизм гипогликемического действия диабенола (субстанция и гранулята таблеток) при сахарной нагрузке на компоненты углеводного обмена (гликоген печени, мышц, молочная кислота, пируват), на скорость гликолиза и гликогенолиза, на количественное содержание гликозилированного гемоглобина и на количество С-пептида в плазме крови.
9. Исследовать влияние диабенола на реологические свойства крови *in vitro* и *in vivo*, и на тромбогенный потенциал крови в условиях экспериментальной патологии.

Научная новизна

Впервые создана система направленного поиска *in silico* нового класса - производных циклических гуанидинов с гипогликемической активностью, основанная на консенсусе прогнозных оценок, полученных несколькими методами (система PASS, ИТ «Микрокосм», подструктурный анализ, частотный анализ физико-химических свойств, ADMET). Впервые выполнен анализ *in silico* механизма антидиабетического действия высокоактивного вещества класса циклических гуанидинов. Впервые проведено изучение *in silico* основных фармакокинетических, фармакодинамических, токсических свойств наиболее активных производных циклических гуанидинов. Впервые изучено влияние диабенола на активность следующих белков мишеней, регулирующих углеводный обмен: PYGL_{Cat}; JAK2 inh; PARP1; PDK4; MGAM_{AGlu}; НК-4; AMPK; PPAR_g agon; НК-4 activ; FBP1; PTP1B и AMPK. Впервые показано (*in silico*, *in vitro* и *in vivo*) отсроченное ингибирование фермента дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4) диабенолом при курсовом введении.

Впервые изучена эффективность лекарственной формы в сравнении с субстанцией при курсовом введении. Показано, что лекарственная форма, как и субстанция, увеличивает секрецию инсулина, снижает гликемию, скорость гликолиза и гликогенолиза, а также повышает гликоген в печени. Кроме этого, наблюдалось снижение вязкости и тромбогенного потенциала крови. Впервые изучен механизм гипогликемического действия твердой лекарственной формы диабенола.

Научно-практическая значимость

Создан банк данных производных циклических гуанидинов проявляющих гипогликемическую активность. В результате выявленных закономерностей между гипогликемической активностью производных бензимидазола (встроенных циклических гуанидинов) и их химической структурой разработана система поиска с использованием нескольких информационных технологий компьютерного прогноза для выявления наиболее значимых веществ, проявляющих гипогликемические свойства.

Определены перспективные базовые структуры для поиска и последующего изучения новых лекарственных веществ. Полученные экспериментальные данные позволяют проводить направленный поиск гипогликемических веществ среди циклических гуанидинов. Доказано, что эффективность лекарственной формы не

уступает субстанции, что является доказательством целесообразности проведения клинических исследований.

Комплексное исследование фармакологических и токсических свойств наиболее эффективных соединений позволяет наметить перспективы по созданию на их основе лекарственных препаратов с оригинальным механизмом действия для лечения сахарного диабета типа II.

Методология и методы исследования

Исследование носило комплексный характер, предполагающий сочетание экспериментальных исследований *in vivo* и разработанной системы компьютерного поиска и экспериментальных методик проведение многоэтапного итеративного скрининга циклических гуанидинов, обладающих гипогликемическими свойствами, с отбором соединений-лидеров для дальнейших углубленных испытаний.

Экспериментальные исследования выполнены с использованием достаточного количества лабораторных животных (крысах линии wistar, белых беспородных крысах, мышах и кроликов-самцах породы «Шиншилла») и в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств (Миронов, 2012), а также с использованием современных информативных методов, имеющихся в распоряжении в НИИ фармакологии ВолгГМУ и ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ (ВолгГМУ).

Использованы методы *in silico* для поиска нового класса химических веществ с высокой гипогликемической активностью, основанные на консенсусе прогнозных оценок, полученных несколькими методами (система PASS, ИТ «Микрокосм», подструктурный анализ, частотный анализ физико-химических свойств, ADME), позволяющие достоверно провести прогноз и выявить значимые признаки циклических гуанидинов с высокой гипогликемической активностью.

Для статистической обработке результатов экспериментов проводили в пакете прикладных программ «Statistica 6.0» (StatSoft, США) с использованием стандартных параметрических и непараметрических методов.

Все исследования были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, протокол №135-2011 от 06.05.2011г.

Реализация результатов исследования.

Выявленные закономерности между гипогликемическим видом активности циклических гуанидинов и их химической структурой, используются при синтезе новых веществ в НИИ Физической и органической химии Южного федерального университета (г. Ростов-на-Дону).

Методологические подходы к изучению антидиабетической активности циклических гуанидинов используются при проведении исследований в лаборатории экспериментальной фармакологии ВМНЦ, НИИ фармакологии и кафедр фармакологии, фармакологии и биофармации ФУВ Волгоградского государственного медицинского университета.

Результаты работы внедрены в лекционные курсы кафедры фармакологии Саратовского государственного медицинского университета, кафедры фармакологии Пермской государственной медицинской академии, кафедрах фармакологии, фармакологии и биофармации ФУВ, фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета, кафедре фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала Волгоградского государственного медицинского университета.

Положения, выносимые на защиту

1. Система поиска (основанная на консенсусе прогнозных оценок) *in silico* позволяет проводить ретроспективный и проспективный анализ гипогликемических структур в широких гомологичных рядах циклических гуанидинов;
2. На основании результатов математических исследований, полученных несколькими методами (система PASS, ИТ «Микрокосм», подструктурный анализ, частотный анализ физико-химических свойств) установлено, что циклические гуанидины по силе гипогликемической активности расположились в следующей последовательности: N^9 -ДгИмБИ=ПрмБИ>2-ИмиБИ> N^1N^9 -ДгИмБИ> N^9 -ИмБИ > N^1 -ИмБИ>ТрзиБИ>ТрзоБИ>2-АмБИ;
3. Циклические гуанидины являются структурой, на основе которой можно проводить поиск веществ, проявляющих гипогликемическую активность;
4. Выявлены базовые структуры, производные которых проявляют гипогликемическое действие: N^9 -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола и одна химическая структура у соединения-лидера РУ-254 с помощью компьютерных технологий;

5. Соединение диабенол в виде субстанции и твердой лекарственной формы оказывал плеiotропное антидиабетогенное действие: стабилизировал содержание β -клеток, повышал содержание с-пептида, снижал гликемию, скорости гликолиза и гликогенолиза, увеличивал глюконеогенез при длительном курсовом введении.

Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность экспериментальных данных обеспечивалась применением верифицированных методов исследований, экспериментальных моделей, лабораторных животных (крысах линии wistar и белых беспородных крысах (700), мышах (600) и кроликов-самцов породы «Шиншилла» (10) и методов исследования *in silico*.

Анализ данных и их обобщение проведены с применением методов математической статистики и прикладной математики, соответствующих характеру полученных данных и задачам диссертационной работы. Все выявленные закономерности, эффекты, обобщения и выводы подтверждались сериями независимых экспериментов, компьютерных расчетов и результатами статистического анализа.

Основные материалы диссертации докладывались и обсуждались на XVIII российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 11-15 апреля 2011); IV всероссийском научно-практическом семинаре молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств» (Волгоград, 29-31 октября 2012); IV съезде фармакологов России (Казань, 18-21 сентября 2012); XX российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 15-19 апреля 2013); первой российской конференции по медицинской химии «MedChem Russia-2013» с международным участием (Москва, 8-12 сентября 2013); XX - Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 26-30 сентября 2016).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 35 печатных работ, в том числе 13 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и 2 монографии.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 285 страницах машинописного текста, иллюстрирована 59 таблицами (а также 63 таблицами в приложениях), 38 рисунками, состоит из введения, обзора литературы (глава I), экспериментальной части (главы II-VIII), обсуждения результатов, заключения,

включающего выводы, практические рекомендации, списка литературы и приложений. Список литературы включает 146 отечественных и 199 иностранных источника.

Личный вклад автора. Автору принадлежит существенная роль в формировании научной тематики, обосновании цели и постановке задач. Автор принимал непосредственное участие в создании базы данных соединений, содержащих гуанидиновую группировку и испытанных на гипогликемические свойства; проведении большинства экспериментов *in vivo* и *in vitro*, а также исследований *in silico*. Интерпретация и анализ полученных результатов, их публикация в научных изданиях и обсуждение на конференциях, формулировка выводов и практических рекомендаций, а также написание диссертации выполнено автором лично.

Материалы и методы исследования

Изучены соединения семи химических классов производных имидазобензимидазола (102 соединения): 2-АмБИ (31 соединение); N⁹-ИмБИ (10 соединений); N⁹-ДгИмБИ (25 соединений); N¹-ИмБИ (3 соединения); N¹-ДгИмБИ (7 соединений); N¹,N⁹-ДгИмБИ (3 соединения); ПрмБИ (23 соединения), которые были синтезированы к.х.н. В.А. Анисимовой, Кузьменко Т.А., Жуковской О.Н. на базе НИИ физической и органической химии Южного федерального университета. В работе использовались субстанция и таблетки диабенола (соединение РУ-254) (дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2,3-дигидроимидазо[1,2-α]бензимидазола) (субстанция Erregierre, Italy», Италия и «АКРИХИН», Россия); субстанция метформина, («ХарманФайнокем», Индия).

Исследования проводили на 500-та половозрелых белых беспородных крысах-самках массой 250-300г.; 18 кроликах массой 2,5-3,5 кг обоего пола; 600 белых неинбредных мышах обоего пола массой 15-22 г, доставленных из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.) и НИЦ БМТ (Москва), прошедших двухнедельный карантин.

Во время проведения всех исследований все животные были разделены на группы по 10 особей. Клетки находились в стандартных условиях вивария и на полноценном сбалансированном (по содержанию основных питательных веществ) рационе согласно ГОСТ Р50258-92. Все исследования по изучению антидиабетогенных свойств были выполнены согласно нормативным документам и

правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96). Проведение экспериментов было одобрено этической комиссией ВолгГМУ (№ 123 от 15.12.2012) и соответствовало всем методическим руководствам и нормативным документам (правила лабораторной практики (GLP) в Российской Федерации, приказ МЗ.РФ. №267 от 19 июня 2003 г; правила и международные рекомендации Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997); ГОСТ Р 51000.3-96 и 51000.4-96). Кормление лабораторных животных осуществлялось кормом «Лаборокорм» (ГОСТ Р 50258-92).

Компьютерный прогноз гипогликемической активности 1036 новых производных циклических гуанидинов был выполнен с помощью ИТ «Микрокосм» и системы PASS. Прогноз в системе PASS выполнялся с использованием программы «PASS 10.4 Professional Extended» (К.М. Merz, 2010). Прогноз в ИТ «Микрокосм» был выполнен с использованием программного комплекса версии 5.1 (Свидетельство, 2011). Информационная технология «Микрокосм» позволяет по структурной формуле оценивать наличие и уровень заданной фармакологической активности прогнозируемого соединения по предварительно подготовленным обучающим выборкам (Vassiliev P. M., 2014). Границы классов гипогликемической активности экспериментально изученных циклических гуанидинов определялись в результате кластерного анализа показателей IndR двумя методами – геометрическим методом расстояний и вероятностным методом гистограмм (Мандель И Д, 1988). В рамках данной работы для выявления базовых структур производных циклических гуанидинов, ответственных за высокий уровень гипогликемической активности, был применен метод медианного оценивания. Метод супремального оценивания был применен для выявления влияния вводимых заместителей на уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов. Расчеты медианных и супремальных оценок проводили в программе Excel 2007 (MS Office XP, США), с использованием дополнительного пакета анализа данных. Точный анализ соответствия показателей соединений-лидеров характеристикам Для анализа предварительного соответствия показателей соединений-лидеров основным характеристикам ADME была использована свободно доступная программа DruLiTo (Drug Likeness Tool, 2015). ADME референсных лекарственных веществ был выполнен с помощью модуля QikProp системы Schröginger (пробная версия 10.2) (QikProp, 2015).

Моделировали сахарный диабет внутривенным введением (хвостовая вена) стрептозотоцина в дозе 45 мг/кг. Диабет развивался на 3-5 сутки. После этого проводилось ежедневное пероральное введение субстанции и гранулята таблеток диабенола в дозе 50 мг/кг, в течение 28 дней. Определение концентрации глюкозы определялось в пробах, взятых из вены хвоста перед введением изучаемых соединений и через 2, 4, 6 часов после введения, ортотолуидиновым методом (Северин С.Е., Соловьева Г.А., 1989) с помощью набора «Глюкоза ФКД» (Россия). Кроме этого гипогликемическую активность рассчитывали по методу (Larsen S. D., Connell M. A., 2001), где показателем служила величина Ind_R – отношение концентраций глюкозы в плазме крови опытной и контрольной групп животных.

$$Ind_R = \frac{C[\text{глюкозы}]_{\text{опыт}}}{C[\text{глюкозы}]_{\text{контроль}}}$$

Острая токсичность активных соединений изучалась путем определения средней летальной дозы (LD_{50}) (Прозоровский В.Б., 1962; Миронов А.Н., 2012). Мышам вводили субстанцию изучаемого соединения.

Концентрацию С-пептида в плазме крови определяли иммуноферментативным способом (DRG, Австрия). Тест толерантности к глюкозе (ч.д.а., «Экрос», Россия) в дозе 3 г/кг проводили на 14 и 28 день введения по методу (Бондарь Т.П., 2003). Определение аланина проводилось в пробах крови. Для анализа применяли тонкослойную хроматографию на пластинках «Силуфол» (Патент №2095808, 1997; Северин С.Е., Соловьева Г.А., 1989). Обработку изображения проводили в программе «Image J», результаты обозначали в ммольях. Гликозилированный гемоглобин определяли с помощью набора реагентов для определения гликозилированного гемоглобина «Диабет-тест» («Фосфосорб», Россия). Определение скорости гликолиза и гликогенолиза оценивалось по содержанию молочной кислоты (конечный продукт) в гомогенате инсулинзависимой ткани печени и проводилось по методике Северина С.Е. и Соловьевой Г.А. [1989]. Содержание молочной кислоты с параоксидифенилом определяли по методу Меньшикова В.В. [1987], в супернатанте. Оценка скорости гликолиза и гликогенолиза проводилась исходя из накопления молочной кислоты за 1 минуту инкубации, и выражалась в ммольях лактата на мг белка ткани. Определение гликогена проводилось в печени по методу VanderVies. J [1954]. Определение

содержания общего белка в гомогенате проводилось по методу [Дарбре А., 1989; Ткачук В.А., 2004], с помощью биуретового реактива. Для выявления эндокриноцитов β островков Лангерганса использовали первичные моноклональные антитела к инсулину (клон Ab-6 (INS04 + INS05), LabVision, Великобритания). Морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной программы «Видео ТестМорфо-4» (Россия).

Для изучения агрегации тромбоцитов был использован двухканальный лазерный анализатор агрегации тромбоцитов – модель 220 LA (НПФ «Биола», Москва). Измерение проводилось по методу G.Born в модификации Габбасова [G. Born 1962; Габбасов 1989]. Дальнейшие определения проводили на богатой тромбоцитами плазме по методу В.А. Люсова и Ю.Б. Белоусова [1971]. Для измерения вязкости крови был использован анализатор крови реологический АКР-2 (МП «Комед» и НИИ физико-химической медицины, Россия) (Добровольский Н.А., 1998). Расчет индекса агрегации эритроцитов проводили путем вычисления отношения вязкости крови при скорости сдвига 10 с^{-1} к вязкости крови при 300 с^{-1} [Dintenfas Lb., 1989]. Определение осмотической резистентности эритроцитов проводилась по методу [M. Katoh, T. Karasawa, 2001].

Для оценки ДПП-4 ингибиторной активности *in vitro* смешивали 10 мкл раствора исследуемого соединения в различном диапазоне концентрации с 50 мкл 0,1 М Трис-HCl буфера (pH 8,4) и 40 мкл плазмы человека. В качестве отрицательного контроля использовали вилдаглиптин (Sigma, США) (Pi-Sunyer F.X., 2007). Ингибирование α -глюкозидазы определяли с помощью метода описанного Elya V.(2012). Определяли прирост оптической плотности при длине волны 400 нм (Elya V., 2012) используя микропланшетный ридер Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия). В качестве отрицательного контроля использовали акарбозу (Sigma, США) (Fujisawa T., 2005). Реакцию гликирования белков моделировали в реакционной смеси с добавлением азиды натрия в концентрации 0,02% для предупреждения бактериального роста [Jedsadayanmata A., 2005]. В качестве вещества сравнения использовали известный ингибитор неферментативного гликозилирования – аминокуанидин [P.J. Thornalley, 2003]. Определения активности гликогенфосфорилазы (PYGL) *in vitro* проводили по методу (Hess H.H., 1975), используя микропланшетный ридер Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия). В качестве

положительного контроля использовали экспериментальный ингибитор гликогенфосфорилазы CP-316819 (Sigma #PZ0189, США) (Suh S.W., 2007). Определения активности глюкокиназы (GK) *in vitro* определяли посредством сопряженной реакции образования глюкозо-6-фосфата с генерацией NADH с помощью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ *L. mesenteroides*, 550-1100 ЕД/мг, Sigma #G2921, США). В качестве положительного контроля использовали экспериментальный активатор глюкокиназы MBX-2982 (Ohishi T., 2012).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни, табличного редактора Microsoft Excel 2007 и программы GraphPad Prism 5.0., а также с помощью критерия Стьюдента (значимыми считали различия, если вероятность ошибки $p \leq 0,05$).

Основное содержание работы.

В первой главе представлен анализ отечественной и зарубежной литературы, обосновывающий гипогликемический потенциал циклических гуанидинов. Описываются новые подходы к поиску и созданию антидиабетических средств. В данной главе подтверждается, что циклические гуанидины являются новым классом гипогликемических средств. Заключительный раздел обзора посвящен разработке лекарственных веществ методами *in silico*.

Вторая глава посвящена виртуальному скринингу гипогликемической активности среди новых производных циклических гуанидинов. Для поиска соединений, обладающих гипогликемической активностью, были использованы методы компьютерной обработки информации.

В настоящей главе на первом этапе был проведен прогноз в системе PASS, который показал перспективность нескольких классов из всех изученных циклических полных гуанидинов (рис. 1).

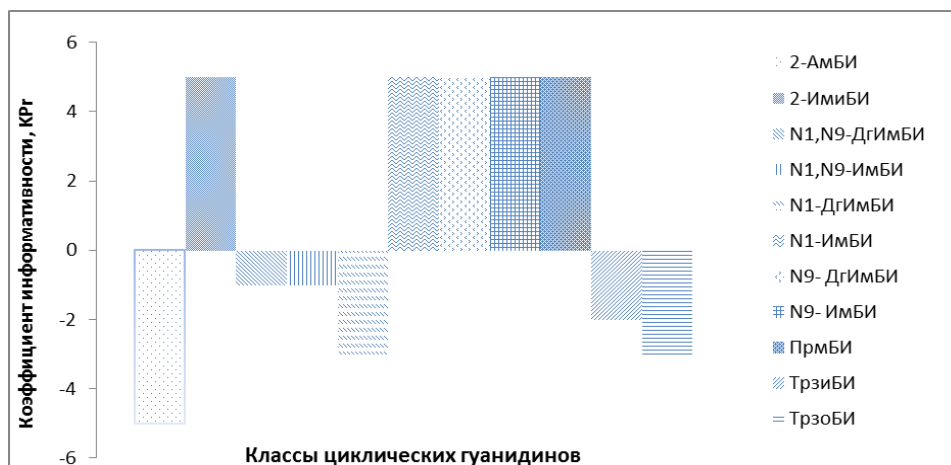


Рис. 1 – Перспективность классов циклических гуанидинов по результатам прогноза в PASS антидиабетической активности

На основании полученных результатов прогноза в PASS одиннадцати классов циклических полных гуанидинов можно полагать, что для поиска соединений с высокой гипогликемической активностью наиболее перспективными (по величине среднего коэффициента информативности) являются следующие производные: 2-имино-бензимидазола, N1-имидазо[1,2-а]бензимидазола, N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола, N9-имидазо[1,2-а]бензимидазола, 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2а]бензимидазола.

Далее был проведен прогноз в ИТ «Микрокосм» наличия гипогликемической активности производных циклических гуанидинов, путем анализа перспективности классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" по выборке известных противодиабетических препаратов приведены рис. 2.



Рис. 2– Перспективность классов циклических гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" антидиабетической активности

Прогноз наличия антидиабетической активности в ИТ "Микрокосм" показал, что наиболее перспективными (исходя из индекса информативности) для дальнейшего изучения являются следующие классы: 2-амино-бензимидазола; 2-имино-бензимидазола, N1,N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола, N1-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола, N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а] бензимидазола и 2-триазино[2,3-а] бензимидазола.

После проведенного прогноза в ИТ "Микрокосм" антидиабетической активности и выделения наиболее перспективных для дальнейшего изучения классов, появилась необходимость в прогнозе уровня гипогликемической

активности производных циклических полных гуанидинов. Для этого прогноза использовали также информационную технологию «Микрокосм» и выборку по ранее изученным производным этого ряда.

Были выполнены следующие расчеты: 1) оценка перспективности классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" наличия гипогликемической активности; 2) оценка перспективности классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" выраженной гипогликемической активности; 3) оценка перспективности классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" высокой гипогликемической активности.

Оценка перспективности классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" наличия гипогликемической активности показала перспективность всех изученных классов циклических гуанидинов, кроме производных 2-АмБИ. Данные прогноза приведены на рис. 3.

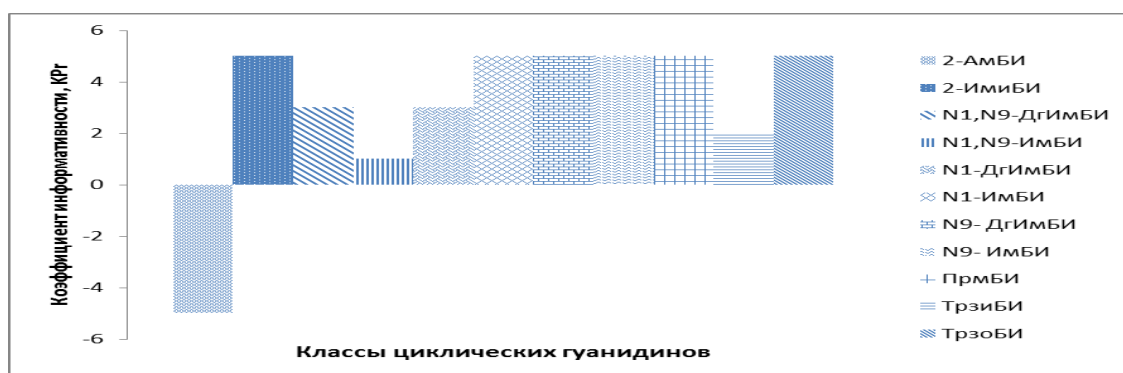


Рис.3– Перспективность классов циклических гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" наличия гипогликемической активности

По данным прогноза наличия гипогликемической активности производных циклических полных гуанидинов были выделены несколько классов, имеющие рассчитанный показатель K_p в диапазоне от 1 до 5: 2-имино-бензимидазола, N^1, N^9 -2,3-дигидро-имидазолы[1,2-а]бензимидазола; N^1, N^9 -имидазо[1,2-а]бензимидазола, N^1 -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола, N^1 -имидазо[1,2-а]бензимидазола, N^9 -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола, N^9 -имидазо[1,2-а]бензимидазола, 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2а]бензимидазола, 2-триазино[2,3-а]бензимидазола, 2-триазоло[1,5-а] бензимидазола.

После прогнозирования наличия гипогликемической активности исследуемых классов необходимо проанализировать результаты прогноза

выраженного уровня гипогликемической активности для производных циклических полных гуанидинов (рис. 4).

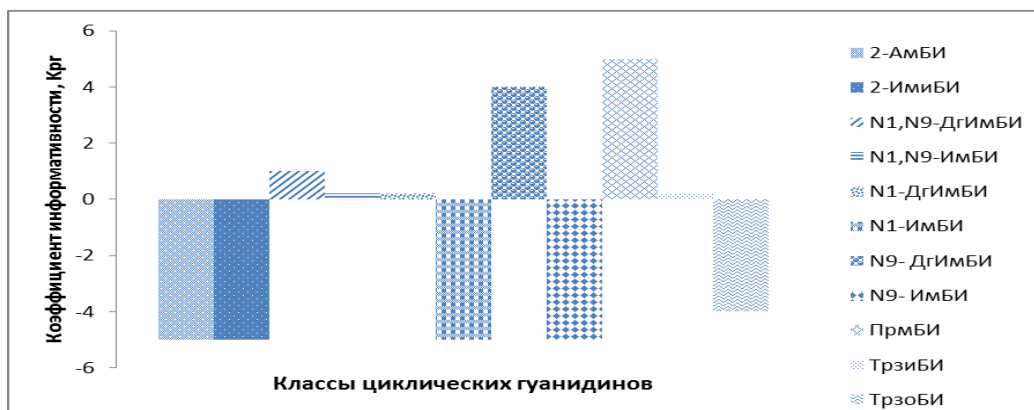


Рис. 4 – Перспективность классов циклических гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" выраженной гипогликемической активности

По данным прогноза выраженной гипогликемической активности производных циклических полных гуанидинов были выделены несколько перспективных классов: N^1, N^9 -2,3-дигидро-имидазолы[1,2-а]бензимидазола, N^9 -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2а]бензимидазола.

Заключительным этапом служил анализ результатов прогноза высокой гипогликемической активности в ИТ "Микрокосм" исследуемых классов, который показал следующие результаты, представленные на рис. 5.

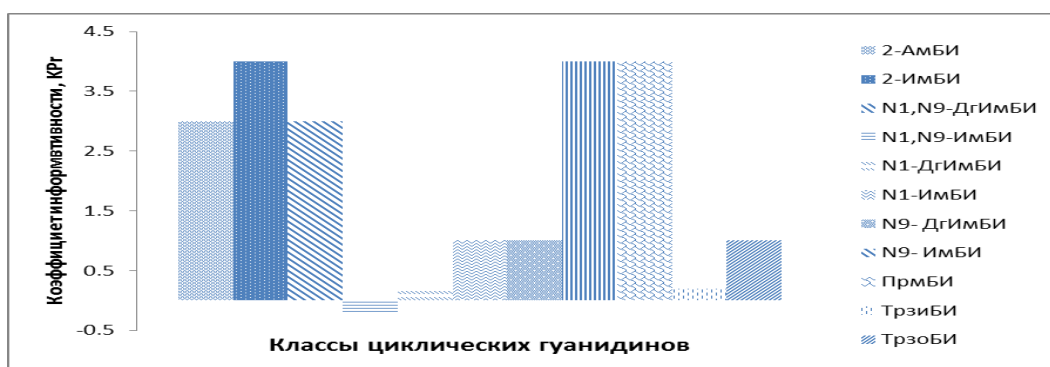


Рис. 5 – Перспективность классов циклических гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" высокого уровня гипогликемической активности

По данным анализа в ИТ "Микрокосм" перспективности классов циклических полных гуанидинов видно, что основные перспективные классы имеют индекс информативности от 1.0 до 5.0: 2-амино-бензимидазола; 2-имино-бензимидазола; N^1, N^9 -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N^1 -имидазо[1,2-а]бензимидазола; N^9 -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N^9 -имидазо[1,2-

а]бензимидазола; 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2а]бензимидазола; 2-триазоло[2,3-а]бензимидазола. Четыре химических класса имеют индекс информативности ниже единицы, соответственно перспективными считаться не могут: пиримидо[1,2а]бензимидазола; N¹,N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N¹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и триазино-[1,5а]бензимидазола.

Далее был проведен подструктурный анализ перспективности различных классов циклических полных гуанидинов, в котором исследовали вещества семи химических классов: производные 2-аминобензимидазолов (2-АмБИ); 9-замещенные имидазо[1,2-а]бензимидазола (N⁹-ИмБИ); 1-замещенные имидазо[1,2-а]бензимидазола (N¹-ИмБИ); 9-замещенные 2,3-дигидроимидазобензимидазола (N⁹-ДгИмБИ); 1-замещенные 2,3-дигидроимидазобензимидазола (N¹-ДгИмБИ) и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2а]бензимидазола (ПрмБИ). В анализируемой выборке присутствовало только одно N¹N⁹-ДгИмБИ, поэтому этот класс в подструктурный анализ не был включен, из-за малого объема данных. Результаты подструктурного анализа приведены на рис. 6.

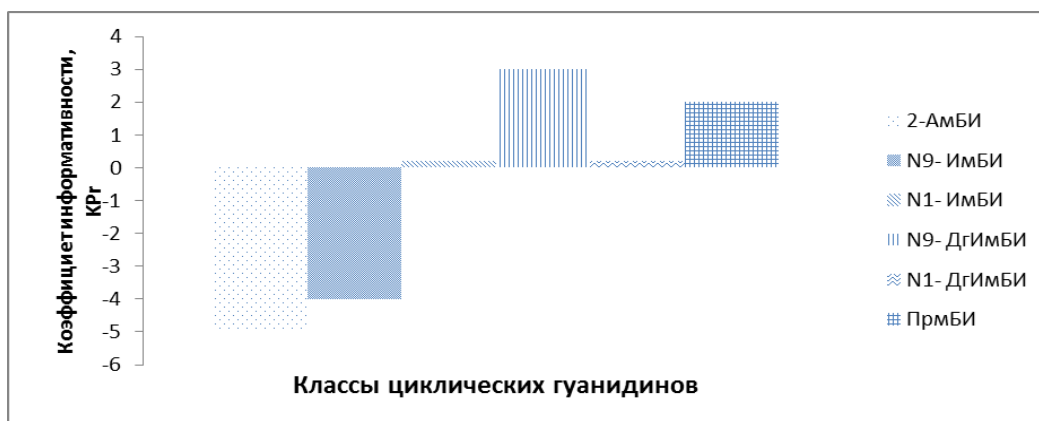


Рис. 6 – Подструктурный анализ влияния типа ядра на высокую гипогликемическую активность производных циклических гуанидинов

Наиболее перспективными с точки зрения наличия веществ с высокой гипогликемической активностью является класс N⁹-ДгИмБИ, имеющий коэффициент информативности $K_{Pr} = 3$ ($Pr = 0,038$). Производные пиримидобензимидазола можно также рассматривать, как возможный источник соединений с высокой гипогликемической активностью. Однако, степень влияния ядра базовой химической структуры на высокую гипогликемическую активность в этом случае недостаточно высока, коэффициент информативности $K_{Pr} = 2$ ($Pr = 0,08$), поэтому данное влияние можно рассматривать как слабое. Тем не менее,

при наличии в структуре пиримидобензимидазола заместителей, значительно влияющих на уровень гипогликемической активности в данном классе, возможно появление веществ с высоким уровнем гипогликемической активности. В соответствии с коэффициентом информативности, безусловно, неперспективным для поиска высокоактивных гипогликемических веществ являются классы: 2-аминобензимидазолов (2-АмБИ) – коэффициент информативности $K_{Pr} = -5$ ($Pr = 0.0008$); 9-замещенные имидазо[1,2-а]бензимидазолы (N_9 -ИмБИ) – коэффициент информативности $K_{Pr} = -4$ ($Pr = 0.0095$). В отношении производных N^1 -ИмБИ ясно, что влияние ядра на уровень гипогликемической активности отсутствует. Однако каких-то определенных выводов не представляется сделать возможным, так как в анализируемой выборке присутствует лишь три соединения данного класса, что является статистически недостоверным. Что касается N^1 -ДгИмБИ, то для этого класса влияния типа ядра на уровень гипогликемической активности отсутствует. Тем не менее, поскольку отрицательного влияния здесь не наблюдается, то в этом случае также при оптимальном подборе заместителей, возможно нахождение в данном классе соединений веществ с высоко гипогликемической активностью. Все же вероятность нахождения таких соединений в данном классе следует считать более низкой, чем среди производных ПрмБИ.

Таким образом, данный подструктурный анализ показал, что наиболее перспективным и статистически достоверным химическим классом производных циклических гуанидинов является класс N^9 -ДгИмБИ.

Для оценки перспективности изучаемых циклических гуанидинов методом медианного и супремального оценивания были изучены производные семи химических классов: 2-амино-бензимидазола; N^9 -имидазо[1,2-а]бензимидазола; N^9 -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N^1 -имидазо[1,2-а]бензимидазола; N^1 -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N^1, N^9 -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола; 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола.

При обработке результатов анализа производные N^1, N^9 -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и N^1 -имидазо[1,2-а]бензимидазола были исключены из рассмотрения, в связи с малым числом испытанных соединений и невозможностью получить статистически достоверные результаты.

Результаты медианного оценивания гипогликемической активности пяти

классов производных циклических гуанидинов приведены на рис. 7.

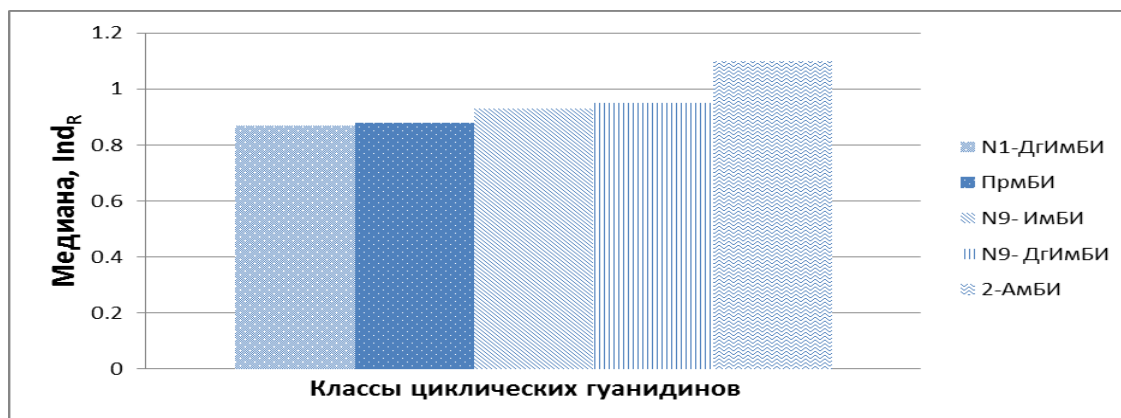


Рис. 7 – Медианные оценки гипогликемической активности классов циклических гуанидинов

По значениям медианных оценок перспективность химических классов производных циклических гуанидинов как источников веществ с гипогликемической активностью убывает в следующей последовательности: N¹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола > 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола > N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола > N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола >> 2-амино-бензимидазола. Анализ разностей этих величин в упорядоченном ряду показывает, что только класс 2-амино-бензимидазолов можно считать не перспективным, так как его медианная оценка 1,10 существенно ниже оценки 0,95 соседнего с ним класса N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола (разность составляет 0,15; экспертный коэффициент информативности K_р=-2). Остальные классы несущественно отличаются друг от друга: разность между парами соседних значений колеблется от 0,01 до 0,05, а максимальная разность между крайними по медианным оценкам классами N¹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бенз-имидазола составляет 0,08.

Таким образом, по результатам анализа методом медианных оценок перспективными классами циклических гуанидинов для поиска гипогликемических веществ являются N¹-ДгИмБИ, ПрмБИ, N⁹-ИмБИ и N⁹-ДгИмБИ, так как медианные показатели их активности сопоставимы между собой.

Результаты супремального оценивания гипогликемической активности пяти классов производных циклических гуанидинов приведены рис. 8.

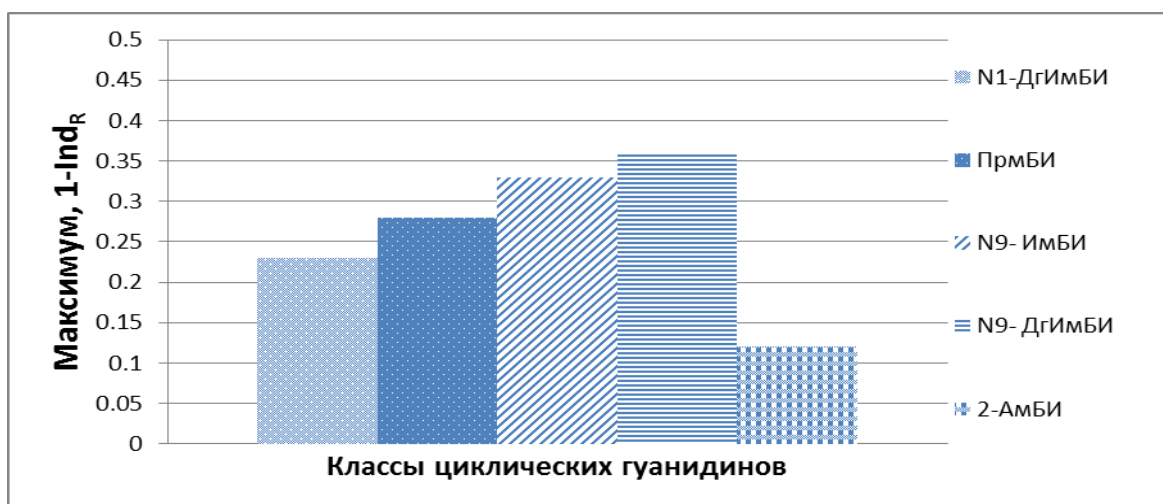


Рис. 8 – Супремальные оценки гипогликемической активности классов циклических гуанидинов

Наиболее лабильной структурой в отношении заместителей, повышающих уровень гипогликемической активности, является N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола (максимальный супремальный показатель 0,36). Также весьма восприимчивой к повышению гипогликемической активности, путем введения соответствующих заместителей, является структура N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола (максимальный супремальный показатель 0,33). Остальные базовые структуры имеют более низкие величины этого параметра. В результате проведенного анализа методом супремальных оценок установлено, что наиболее лабильной к введению заместителей, повышающих уровень гипогликемической активности, является структура производных N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола. В данной главе был проведен консенсусный анализ перспективности различных классов циклических полных гуанидинов. Данные консенсусного анализа перспективности циклических гуанидинов как источников веществ с гипогликемической активностью приведены на рис. 9.

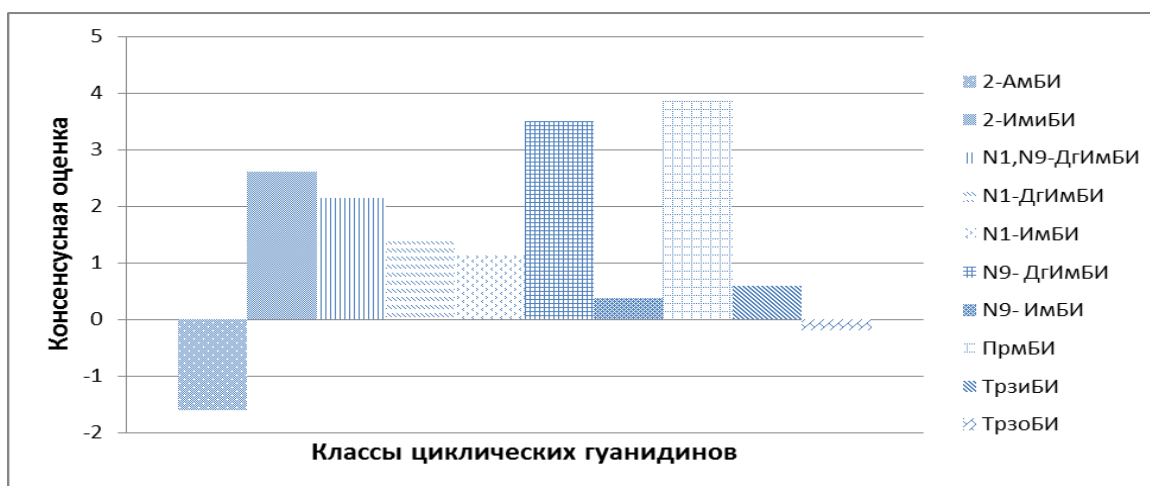


Рис. 9 – Перспективность классов циклических гуанидинов как источников веществ с гипогликемической активностью по результатам консенсусного анализа

Таким образом, использование консенсусного анализа для обобщения всех ранее полученных компьютерных прогнозных оценок позволяет выявить два наиболее перспективных класса циклических полных гуанидинов как источников веществ с высокой гипогликемической активностью: N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола.

После этого был проведен виртуальный скрининг среди производных циклических гуанидинов для дальнейшего углубленного изучения и были выбраны соединения следующих химических классов: 2-имино-бензимидазола; 2-амино-бензимидазола; N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]-бензимидазола; N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N¹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы; 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2а] бензимидазола.

По результатам анализа *in silico* перспективности производных циклических гуанидинов как источников веществ с высокой гипогликемической активностью, наиболее перспективными являются два класса: N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола.

Третья глава посвящена поиску соединений, оказывающих гипогликемическое действие среди новых производных циклических гуанидинов. Поиск соединений, оказывающих гипогликемическое действие среди новых производных 2-амино-бензимидазола (табл. 2), в ходе экспериментального скрининга показал, гипогликемические свойства были обнаружены у 50% соединений производных 2-амино-бензимидазола (по силе гипогликемического действия все соединения уступали препарату сравнения - метформин).

Гипергликемические свойства выявлены у 7 % изученных соединений. Гипогликемические свойства не выявлены у 43% соединений изученного химического класса.

Было установлено, что гипогликемическими свойствами обладают 65% соединений, производных 2-имино-бензимидазола (по силе гипогликемического действия не уступали метформину). Гипергликемические свойства выявлены у 26% соединений. Примерно 6% всех протестированных веществ вызывали гибель животных. 3% соединений исследуемого класса не оказывали влияние на уровень глюкозы в крови.

Экспериментальный скрининг производных N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола (табл. 2) на уровень глюкозы в плазме крови белых беспородных крыс выявил гипогликемические свойства у 71% соединений (по силе гипогликемического действия 46% не уступали метформину). Гипергликемические свойства не были выявлены у изученных соединений. Около 5,2% всех протестированных веществ вызывали гибель животных. Гипогликемически неактивными показали себя 23,8%. Таким образом, было показано достаточно выраженное гипогликемическое действие производных N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола на уровень глюкозы в плазме крови интактных животных.

Выраженные гипогликемические свойства обнаружены у 73,9% соединений производных 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола (по силе гипогликемического действия исследуемые вещества не уступали препарату сравнения метформину, либо превышали его гипогликемический эффект). Гипергликемические свойства были обнаружены у 21,7% изученных соединений. 4,4% всех протестированных веществ, в испытываемой дозе, вызывали гибель животных. Таким образом, было показано значительное влияние производных 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола на уровень глюкозы в плазме крови интактных животных.

Гипогликемические свойства не были обнаружены у класса производных N1-имидазо[1,2-а]бензимидазола. Было показано отсутствие гипогликемического действия производных N1-имидазо[1,2-а]бензимидазола на уровень глюкозы в плазме крови интактных животных. Производные N1-имидазо[1,2-

а]бензимидазола, исследованные в скрининге приведены в табл. 2. Выраженные гипогликемические свойства обнаружены у 71,4% соединений производных N1-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола (по силе гипогликемического действия исследуемые вещества не уступали препарату сравнения метформину – 28,5%, либо превышали его гипогликемический эффект – 42,8%). Гипергликемические свойства в ходе эксперимента обнаружены не были у изученных соединений (табл. 1).

Таблица 1 – Влияние новых производных циклических гуанидинов на уровень глюкозы в крови

Скаффолд	Изучено веществ	Активность		
		Высокая $\text{Ind}_R < 0.82$	Умеренная $0.82 \leq \text{Ind}_R < 0.90$	неактивные и гипергликемические $\text{Ind}_R \geq 1.00$
2-АмБИ	25	15	10	5
2-ИмиБИ	18	11	2	5
N ⁹ -ДГИмБИ	24	14	–	10
N ¹ -ИмБИ	3	–	–	3
N ¹ -ДГИмБИ	7	5	2	–
ПрмБИ	23	17	1	5

На основании полученных данных по направленному поиску новых производных циклических гуанидинов было решено изучить влияние некоторых наиболее активных соединений изученных химических классов.

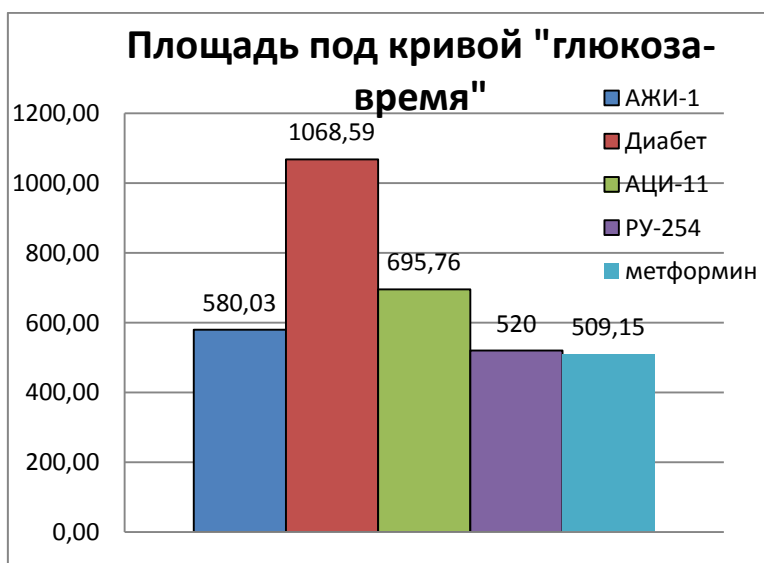


Рис.10 – Влияние субстанций наиболее активных веществ на площадь под кривой «глюкоза-время» у крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом

Субстанция РУ-254 снижала показатель площадь под кривой «концентрация глюкозы-время», в среднем на 51%; АЖИ-1 – на 46% и АЦИ-11 – на 35%. В ходе эксперимента на модели стрептозотоцинового диабета было определено, что наиболее сильный гипогликемический эффект наблюдался у препарата РУ-254 (практически равный по силе препарату сравнения метформину), относящегося к классу производных N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола.

На основании полученных данных по направленному поиску новых производных циклических гуанидинов и данных, полученных по виртуальному скринингу в дальнейшем можно выявить методами *in silico* соединения лидера для изучения на модели сахарного диабета, что будет изложено в главе 4.

В главе 4 изучена зависимость гипогликемической активности соединений от их химической структуры и физико-химических свойств.

Частотный анализ влияния физико-химических параметров на высокий уровень гипогликемической активности был выполнен для 56 производных 2,3-дигидро-N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола. В ходе анализа найден 41 физико-химический признак, влияющий на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов.

Положительное статистически достоверное влияние оказывают 8 признаков:

- 1) молекулярная рефракция для всей молекулы в целом ($K_{Pr} = +3$)
- 2) молекулярная рефракция третьего заместителя ($K_{Pr} = +3$)
- 3) средний заряд на атомах третьего заместителя ($K_{Pr} = +3$)
- 4) среднее значение абсолютных величин зарядов на атомах базовой структуры ($K_{Pr} = +3$)
- 5) минимальный положительный заряд на неводородных атомах конденсированной системы находится в диапазоне от 0,029 до 0,037
- 6) минимальный положительный заряд на неводородных атомах атомах конденсированной системы ($K_{Pr} = +3$)
- 7) заряд на азоте N₄ ($K_{Pr} = +3$)
- 8) суммарный заряд атомов на первом (внутреннем) имидазольном кольце ($K_{Pr} = +3$)

В результате частотного анализа выявлены физико-химические признаки, статистически достоверно влияющие на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов класса N¹,N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола. Подструктурный анализ выполняли по алгоритму, описанному выше, в главе 2. На основании проведенного подструктурного анализа установлено, что есть статистически достоверный заместитель R₃ – диэтиламиноэтил $-(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$, который обуславливает высокий уровень гипогликемической активности.

Для трех наиболее активных соединений с помощью программы FarmFor программного комплекса ИТ «Микрокосм» был проведен сравнительный фармакофорный анализ. Фармакофорные спектры трех соединений-лидеров формировались из присутствующих в структуре этих соединений статистически значимых QL-признаков 4-го ранга, полученных для всех пяти уровней значимости, по обеим обучающим выборкам и всем градациям активности.

Подструктурный анализ 56 производных 2,3-дигидро-N⁹-имидазо[1,2a]бензимидазола был выполнен по двум градациям гипогликемической активности: выраженная («высокая или умеренная», $Ind_R < 0.90$) и высокая ($Ind_R < 0.82$).

В ходе подструктурного анализа влияния заместителей на гипогликемическую активность производных циклических гуанидинов установлено, что есть статистически достоверный заместитель R₃ – диэтиламиноэтил $-(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$, который обуславливает высокий уровень гипогликемической активности.

Проанализировав все физико-химические признаки у трех наиболее значимых соединений-лидеров, влияющих на высокий уровень гипогликемической активности, установили, что индекс соединения RU-254 содержит признак $Q(Imid_1)_{CS} \geq -0.109$, достоверно влияющий на гипогликемические свойства соединения. У двух других соединений-лидеров (RU-663 и RU-1316) не найдено физико-химических признаков, оказывающих статистически достоверное влияние на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов.

Следовательно, в результате частотного анализа выявлены физико-химические признаки, статистически достоверно влияющие на высокий уровень

гипогликемической активности производных циклических гуанидинов класса N^1N^9 -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола.

На основании фармакофорного анализа можно полагать, что наиболее перспективным соединением, с точки зрения наличия в химической структуре фрагментов, ответственных за достаточно высокий уровень гипогликемической активности, является соединение производное циклических гуанидинов класса N^1N^9 -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола.

Оценка основных показателей ADME активных соединений-лидеров (RU-254, RU-663, RU-1316) позволяет утверждать, что они проходят все основные фильтры лекарственного подобия программы DruLiTo, за исключением соединения RU-1316, показатели которого не соответствуют CMC-50-like фильтру. Оценка специальных характеристик ADME, рассчитанных с помощью модуля QikProp системы Schödinge в общем показала соответствие соединений-лидеров всем основным референсным физико-химическим параметрам. Однако соединения RU-663 и RU-1316 характеризуются более низкими значениями расчетных фармакокинетических показателей, существенных для всасывания, транспортировки вещества и его биодоступности в целом. Кроме того, у соединения RU-663 более высокая экспериментально определенная токсичность и наименьшее значение расчетного условного терапевтического индекса, чем у соединений RU-663 и RU-1316.

Таким образом, на основе проведенных исследований выявлено соединение-лидер (RU-254), которое будет использовано для последующих фармакологических исследований.

Таблица 2 – Соответствие фармакологических показателей ADME соединений-лидеров

Показатель	RU-254	RU-663	RU-1316
MW(Молекулярный вес, Да)	+	+	+
D (Дипольный момент, D)	+	+	+
SASA _{tot} (Общая сольватационная поверхность, Å ²)	+	+	+

SASA _{phhob} (Гидрофобная сольватационная поверхность, Å ²)	+	+	+
SASA _{phhil} (Гидрофильная сольватационная поверхность, Å ²)	+	+	+
V _{PSA} (Ван-дер-ваальсовская полярная поверхность, Å ²)	+	+	+
L (Поляризуемость, Å ³)	+	+	+
LogP (Логарифм коэффициента распределения октанол/вода, отн.ед.)	+	+	+
LogS (Логарифм растворимости в воде, отн.ед.)	+	+	+
logK _{HSA} (Логарифм коэффициента связывания с сывороточным альбумином человека, отн.ед.)	+	+	+
Per _{Caco-2} (Кажущаяся проницаемость клеток адено-карциномы толстого кишечника человека Caco-2, нМ/сек)	++ (высокая)	++ (высокая)	– (невысокая)
Per _{MDCK} (Кажущаяся проницаемость клеток эпителия почек собаки, нМ/сек)	++ (высокая)	++ (высокая)	– (невысокая)
Absz _{НОГИ} (Степень всасывания в ЖКТ человека при пероральном введении, %)	++ (100%)	++ (100%)	– (76%)
LD50 (экспериментальное определение)	275,0	64,8	222,5

Примечание. Обозначение и физико-химический смысл показателей см. выше в описании метода.

В главе 5 были исследованы антидиабетогенные свойства соединения диабенол.

В ходе исследования на интактных животных установлено, что субстанция диабенола была активнее гранулята таблеток на 2 и 4 часу. Так, при введении субстанции диабенола, на 2 и 4 час эксперимента снижение содержания глюкозы в 4,75, 5,15 раза превышало данный показатель гранулята таблеток. На 6 час

произошло снижение содержания глюкозы в 1,62 раза в группе, получавших гранулят таблеток диабенола. Данная тенденция продолжилась на 20 и на 24 час эксперимента. Таким образом, было показано гипогликемическое действие (достоверное снижение уровня сахара в крови) и субстанции и гранулята таблеток на интактных кроликах.

Далее исследования проводили на крысах с моделированным стрептозотоциновым диабетом, при однократном введении субстанции диабенола. Субстанцию диабенола изучали в трех дозировках: 25, 50 и 100 мг/кг при пероральном введении.

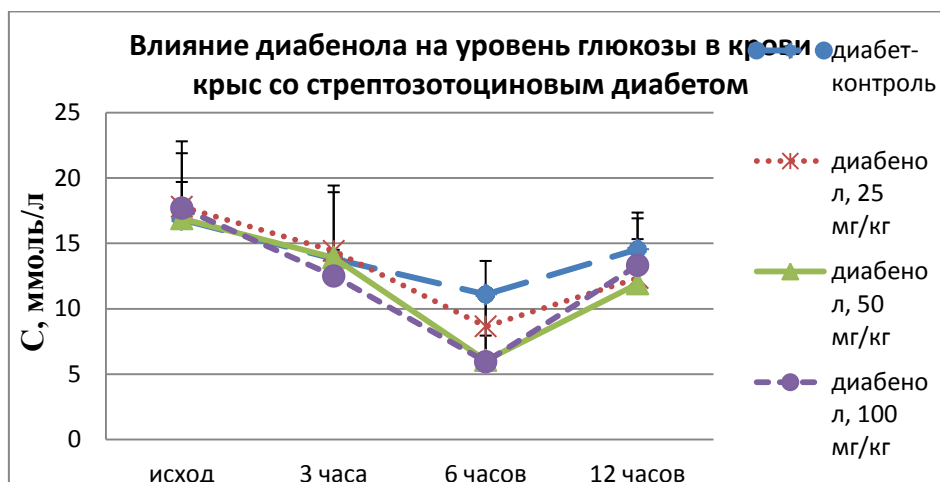


Рис.11 – Влияние диабенола (в дозе 25, 50 и 100 мг/кг при однократном введении внутрь) на уровень глюкозы в крови крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом, ($M \pm m$)

Из данных, представленных на рис.11, отмечается дозозависимое снижение уровня глюкозы с выравниванием эффекта в дозе 100мг/кг.

При курсовом введении были изучены колебания уровня сахара в крови на протяжении 28 дней введения диабенола в виде субстанции и гранулята таблеток (в дозе 50 мг/кг).

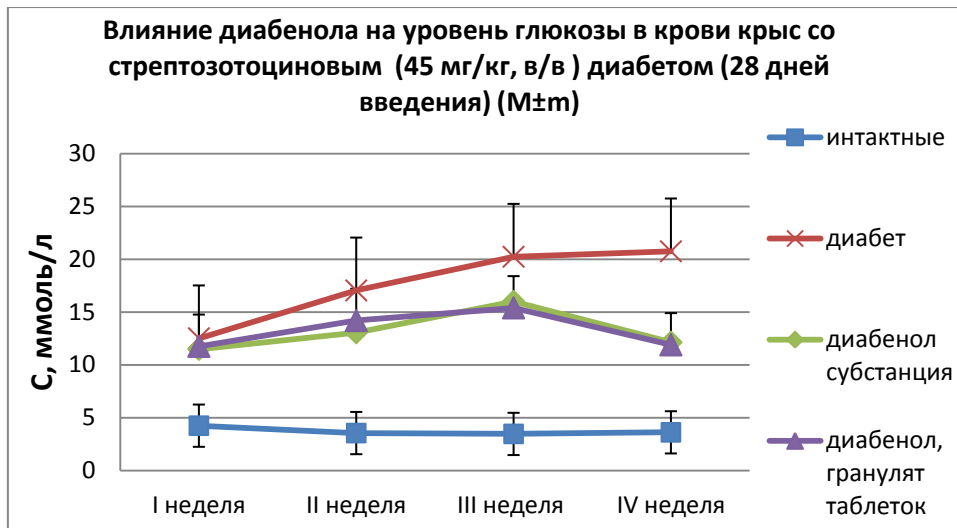


Рис. 12 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на уровень глюкозы в крови крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом, (28 дней введения) ($M \pm m$)

Из данных, представленных на рис. 12 следует, что эффект гранулята не отличается от эффекта субстанции диабенола.

Проанализировав данные рис. 12 можно сделать заключение, что под влиянием диабенола (субстанция и гранулят таблеток) происходит снижение уровня сахара в крови, по сравнению с группой диабета. Так, на 14, 21 и 28 день введения субстанция диабенола снижала уровень глюкозы в крови на 23,5%, 20,9% и 41,5 % по сравнению с группой диабета. Действие гранулята таблеток диабенола практически не отличалось от субстанции и составило 16,7%, 23,9% и 42,6% соответственно. При сопоставлении данных можно сделать вывод о том, что гранулят таблеток диабенола снижал уровень сахара в крови более планомерно, и по силе гипогликемического действия сопоставим с субстанцией диабенола.

При моделировании стрептозотоцинового диабета наблюдалось (на 28 день введения) увеличение гликозилированного гемоглобина HbA1c в 1,6 раз по сравнению с интактной группой. Однако, после курсовой терапии диабенолом (50 мг/кг, субстанция; 28 дней) была отмечена тенденция к снижению гликозилированного гемоглобина HbA1c на 31,3% ($p \geq 0,05$).

Учитывая тот факт, что снижение уровня гликозилированного гемоглобина происходило прямо пропорционально гипогликемическому эффекту, можно сделать вывод о нормализующем влиянии на углеводный обмен.

Тест толерантности к глюкозе проводился каждую неделю в течение 28 дней введения. Тест толерантности к глюкозе на 14 день показал статистически значимое ($p \leq 0,05$) снижение уровня глюкозы в крови у животных, получавших диабенол (субстанция и гранулят таблеток) в сравнении с контрольной группой со стрептозотоциновым диабетом. Данная тенденция подтверждалась достоверным уменьшением площади под кривой «глюкоза-время». Так, диабенол в виде субстанции и гранулята таблеток снижал показатель площадь под кривой «глюкоза-время» на 46,3% и 51,7% соответственно, что возможно связано с улучшением утилизации глюкозы периферическими тканями.

Проведенный ПГТТ на 21 день также показал снижение площади под кривой «концентрация глюкозы-время». Так как на 14 день данный показатель при введении субстанции и гранулята таблеток диабенола практически не отличался, то на 21 день была посчитана площадь под кривой субстанции диабенола. Величина площади под кривой «глюкоза-время» снижалась на 41 % на фоне введения субстанции диабенола (рис. 15).

На 28 день введения утилизация глюкозы периферическими тканями составила 40% и 52,9% соответственно. Можно сделать вывод о том, что гранулят таблеток оказался незначительно эффективнее, нежели субстанция и увеличивал утилизацию глюкозы периферическими тканями еженедельно, примерно на 52,3%. Субстанция диабенола снижала показатель площадь под кривой «концентрация глюкозы-время», в среднем на 40% , практически неизменно на протяжении 28 дней введения (рис. 13).

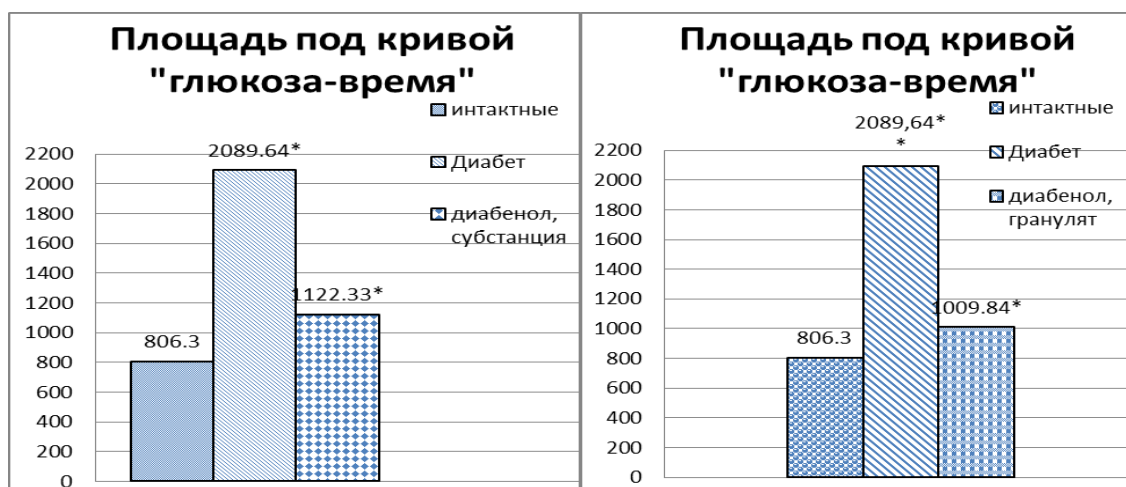


Рис.13 – Влияние субстанции и гранулята таблеток диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на площадь под кривой «глюкоза-время» у крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом (14 день введения)

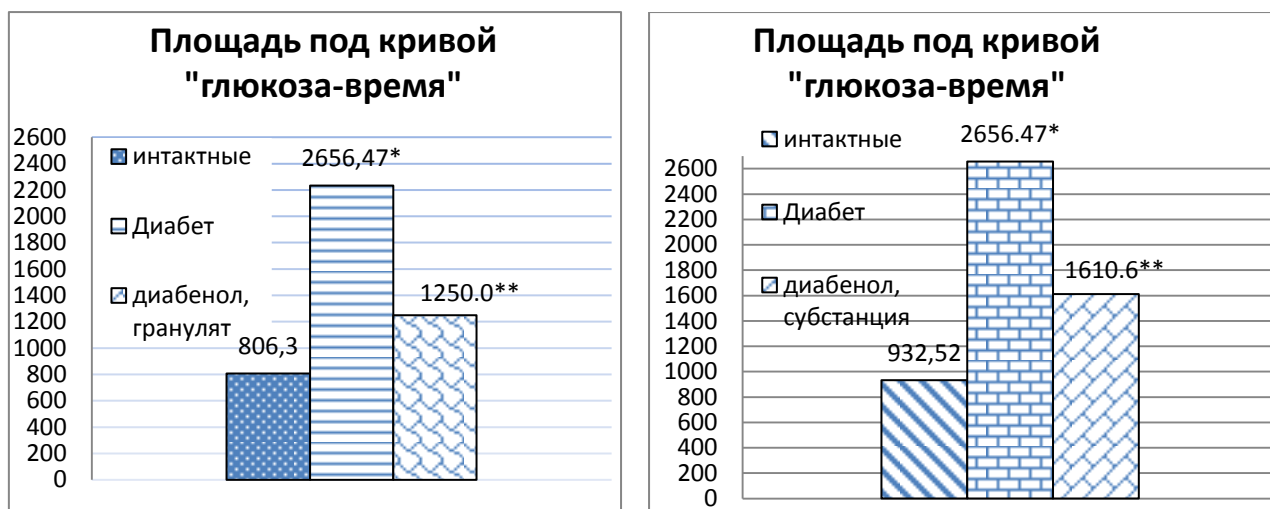


Рис.14 – Влияние субстанции и гранулята таблеток диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на площадь под кривой «глюкоза-время» у крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом (28 день введения)

Известно, что при дефиците инсулина происходит активация глюконеогенеза глюкагоном, что приводит к использованию аминокислот, в частности аланина, для синтеза глюкозы [Perritllo G., 1997]. Так, концентрация аланина снижалась в 1,5 раза в группе крыс с моделированным стрептозотоциновым диабетом по сравнению с группой интактных животных. На 28 день введения, субстанции и гранулята таблеток диабенола, концентрация аланина увеличилась в 1,33 раза и в 1,28 раз соответственно, по сравнению с контрольной группой диабета.

Таким образом, можно предполагать, что диабенол ингибировал глюконеогенез в печени и достоверно снижал концентрацию аланина при введении субстанции и гранулята таблеток.

Было показано, что субстанция и гранулят таблеток диабенола обладает антидиабетогенными свойствами, влияя на углеводный обмен и увеличивая утилизацию глюкозы.

Глава 6 посвящена изучению механизма антидиабетогенного действия диабенола.

Следующим этапом исследования явилось изучение механизма антидиабетического действия диабенола. В предыдущей главе описано, что при моделировании стрептозотоцинового диабета отмечалась гипергликемия и обильное потребление жидкости. При длительном введении диабенола

наблюдалось как гипогликемическое действие, так и снижение потребляемой жидкости.

На первом этапе изучение механизма действия диабенола включало в себя изучение содержания гликогена в печени, скорости гликогенолиза и гликолиза. После курсового введения диабенола (50 мг/кг, субстанция и гранулят таблеток), в течение 28 дней, уровень гликогена в печени повышался в 3 раза (субстанция) и в 1,25 раз (гранулят) соответственно в сравнении с группой с экспериментальным диабетом. Учитывая тот факт, что отмечается стабилизация гликогена в печени, весьма интересно представлялось изучение влияния диабенола на ферментативные процессы, регулирующие распад гликогена в печени, то есть процессы гликогенолиза и гликолиза.

После курсового введения диабенола в дозе 50 мг/кг скорость гликогенолиза в печени снижалась на 36% ($p \leq 0,05$) и 30,2% ($p \leq 0,05$) соответственно по сравнению с контрольной группой животных. Это возможно связано с устранением инсулинорезистентности, либо изменением активности ферментов синтеза гликогена, путем их активирования и распада гликогена, за счет ингибирования ферментов данного процесса.

Учитывая тот факт, что ключевым ферментом гликогенолиза является фермент гликогенфосфорилаза, изучили влияние соединения диабенол на него. Оказалось, что диабенол практически не влияет гликогенфосфорилазу (ингибирующая активность $9,83 \pm 8,73\%$ в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М), а препарат сравнения - кверцетин ингибирует ГФ ($72,30 \pm 4,95\%$ в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М).

Анализируя данные можно сделать вывод о том, что повышение гликогена в печени и снижение скорости гликогенолиза возможно опосредуется косвенно, через восстановление чувствительности к инсулину в печеночных клетках.

Скорость гликолиза в группе со стрептозотоциновым диабетом снижалась на 53,7% ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. После длительного введения диабенола скорость гликолиза в печени повышалась в 1,3 и в 1,2 раза соответственно.

При моделировании стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета в поджелудочной железе отмечалось незначительное полнокровие кровеносных капилляров, умеренная очаговая лимфогистиоцитарная инфильтрация островков –

«инсулит», некробиотические изменения эндокриноцитов островков Лангерганса и умеренная гипертрофия ядер функционирующих β -клеток. Панкреатические островки имели округлую, овальную или неправильную форму. Среднее количество островков Лангерганса достоверно уменьшалось ($p < 0,05$) в кишечном и селезеночном отделах по отношению к группе интактного контроля. В желудочном и селезеночном отделах уменьшение удельного количества β -эндокриноцитов носило статистически достоверный характер по отношению к группе интактного контроля и составляло $46,5 \pm 8,2\%$ и $22,9 \pm 6,1\%$ соответственно.

При введении субстанции животным с моделью стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета в поджелудочной железе отмечалась мозаичная морфологическая картина. Часть островков Лангерганса сохраняли округлую форму, часть были неправильной формы. В островках выявлялись явления умеренного полнокровия кровеносных капилляров с очаговой инфильтрацией островков лимфоцитами и гистиоцитами. Отмечалась выраженная гипертрофия ядер β -эндокриноцитов. Визуализировались некробиотические изменения инсулиноцитов (в отдельных островках вплоть до полного отсутствия). В некоторых островках сохранялись единичных разрозненных инсулин-позитивные клетки. Среднее количество островков Лангерганса увеличивалось только в селезеночном отделе по отношению к группе животных с моделью стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета. Удельное количество β -эндокриноцитов было ниже интактного контроля в селезеночном отделе железы и составляло - $10,3 \pm 4,7\%$. В кишечном и желудочном отделах удельное количество соответствовало группе животных с моделью стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать следующие выводы о морфологических изменениях эндокринного аппарата поджелудочной железы под воздействием диабенола.

Изучение действия диабенола на всасывание углеводов в кишечнике проводили путем пероральной нагрузки крахмалом и сахарозой. Так при введении акарбозы (5 мг/кг) одновременно с крахмалом (3 г/кг) в течение первого часа эксперимента наблюдались статистически значимые изменения в содержании глюкозы опытных животных по сравнению с крысами контрольной группы, получавшими только

полисахарид. На 90 и 120-ю минуты эксперимента, достоверных различий между показателями контрольной и опытной групп не наблюдалось. В группе крыс, получавших диабенол в комплексе с крахмалом, достоверных изменений относительно контроля отмечено не было. При введении сахарозы (3 г/кг) нами было установлено полное отсутствие влияния диабенола на всасывание сахарозы в кишечнике крыс.

Известно, что скорость всасывания углеводов в кишечнике определяется активностью α -глюкозидазы. Существует ряд препаратов, которые ингибируют всасывание углеводов в кишечнике, поэтому нами была проведена оценка влияния диабенола на активность α глюкозидазы.

In vitro установлено, что диабенол незначительно снижает активность α -глюкозидазы в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$, в то время как препарат сравнения (акарбоза) в той же концентрации подавляет ее на 50%. Таким образом, было установлено, что соединение диабенол не влияет на процессы ферментативного распада сложных углеводов и их всасывания в кишечнике.

Таким образом, на основании ранее проведенных исследований установлено, что диабенол снижает уровень сахара в крови, снижает инсулинорезистентность и образование глюкозы в печени.

На втором этапе изучения механизма действия диабенола было исследовано влияние соединения на активность регуляторных гормонов (инсулин) и ферментов (ДПП-4; PYGLcat inh; PPAR γ agon; НК-4 activ; JAK2 inh; FBP1; PARP1; PTP1B; PDK4; AMPK).

Известно, что во время секреции инсулина происходит превращение проинсулина в инсулин и С-пептид посредством β -клеток. С-пептид является показателем синтеза эндогенного инсулина и обмена углеводов, поэтому позволяет оценивать функцию β -клеток поджелудочной железы. В наших исследованиях, на 28 день введения наблюдалось снижение уровня С-пептида на 19,48% в группе крыс со стрептозотоциновым диабетом. В группе, получавших диабенол в дозе 50 мг/кг, содержание С-пептида повышалось на 16,68% по отношению к животным с экспериментальным диабетом.

При изучении активности ферментов, регулирующих углеводный обмен, были проведены исследования *in silico*, *in vitro* и *in vivo*.

В настоящее время поиск механизма действия *in silico* является неотъемлемой частью экспериментального изучения новых соединений и базовых структур, ответственных за наличие той или иной активности, в том числе, ее высокого уровня (Поройков В.В., 2015).

После анализа четырьмя методами *in silico* уровня активности гипогликемического соединения в отношении девяти белков-мишеней (PYGLcat inh; PPARg agon; НК-4 activ; JAK2 inh; FBP1; PARP1; PTP1B; PDK4; AMPK), релевантных антидиабетической активности, хотелось бы отметить несколько мишеней – PYGL_{cat}inh; PARP1, в отношении которых изучаемое вещество по прогнозу может проявлять слабую активность. Что касается остальных мишеней, то их активность не была выражена.

На основании исследования с использованием методов *in silico*, вероятно, диабенол обладает антидиабетогенной активностью, в основе его механизма действия присутствует инсулинсекреторная активность и предполагается его влияние на ДПП-4.

В экспериментах *in vitro* была обнаружена ДПП-4 ингибирующая активность диабенола $IC_{50}=46,96\text{мкМ}$.

Исходя из этого, была спланирована экспериментальная часть (*in vivo*), которая заключалась в изучении влияния на секрецию инсулина и активность основных ферментов углеводного обмена.

При экспериментальном стрептозотоциновом диабете активность ДПП-4 увеличивалась на 48%, а курсовое введение диабенола в дозе 50 мг/кг приводила к изменениям данного показателя между 6 и 9 часом. Несмотря на то, что по данным *in silico* диабенол не должен оказывать влияние на ключевые ферменты метаболизма углеводов, было изучено *in vivo* влияние диабенола на данные энзимы. Неферментативная реакция между восстановленными сахарами и аминокетонами белков является многостадийным процессом и приводит к образованию конечных продуктов гликирования (КПГ). Гликирование (неферментативное гликозилирование) белков очень медленный процесс, который играет важную роль в патогенезе осложнений сахарного диабета, что делает актуальным поиск ингибиторов гликирования белков.

Известно, что одним из путей профилактики поздних осложнений является блокирование гликирования белков. Исходя из этого, был изучен данный вид активности для уточнения возможных механизмов действия диабенола. В результате проведенных исследований было установлено отсутствие антигликирующей активности у диабенола ($9,63 \pm 3,88^{**}\%$ в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М), в отличие от препарата сравнения - аминугуанидина ($57,83 \pm 0,58\%$ в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М).

Обобщая цикл исследований, по механизму действия диабенола, следует отметить инсулиногенный эффект, который приводит к снижению сахара в крови, а также снижение скорости гликогенолиза и гликолиза в печени. Вероятнее всего, что изученное соединение, в условиях экспериментального сахарного диабета, не оказывает прямого влияния на ключевые ферменты углеводного обмена, но косвенно изменяет метаболические процессы, ингибируя ДПП-4.

Глава 7 посвящена изучению влияния диабенола на свертываемость крови и гемореологические свойства у крыс со стрептозотоциновым диабетом

Нарушение ключевых звеньев углеводного обмена, даже на ранних стадиях, сопровождается высоким риском нарушения гемостаза и развития поражения сосудов, прежде всего, на уровне микроциркуляции. Наличие сосудистых осложнений для СД типа 2 настолько характерно, что послужило основанием отнести его к заболеваниям сердечно-сосудистой системы [Donnelly, 2000]. Следствием диабетической микроангиопатии является нейропатия [Котов С.В., 2000]. Ранее было доказано влияние, как прямое, так и косвенное, различных гемореологических факторов в развитии атеросклеротических осложнений и микрососудистых нарушений [Singh, 2010].

Изучение влияния диабенола на показатели вязкости крови выявила следующие характерные закономерности: достоверное увеличение вязкости (при всех охваченных скоростях сдвига) в группе крыс со стрептозотоциновым диабетом и увеличение индекса агрегации эритроцитов в данной группе по отношению к интактным животным.

Так при скоростях сдвига 300 с^{-1} и 200 с^{-1} показатель вязкости в 1,3 раза достоверно превышал данные величины контрольной группы. При скоростях сдвига 100 с^{-1} и 50 с^{-1} данный показатель достоверно превышал значения контрольной группы в 1,4

и 1,5 раз соответственно. Данная тенденция также была отмечена при небольших скоростях сдвига (10 с^{-1}), о чем свидетельствует достоверное увеличение вязкостных характеристик в группе с СД (в 2 раза) по отношению к интактной группе. Полученные результаты говорят о нарушениях в структуре и функции эритроцитарных мембран и активации процессов агрегатообразования.

Диабенол при курсовом введении, в течение 28 дней, снижал вязкость крови на всем диапазоне скоростей сдвига у крыс со стрептозотоциновым диабетом. Так субстанция диабенола в дозе 50 мг/кг снижала вязкость крови в 1,3 раза при скоростях сдвига 300 с^{-1} и 200 с^{-1} ; в 1,4 раза при скоростях сдвига 100 с^{-1} , 50 с^{-1} и 30 с^{-1} ; а при скорости сдвига 10 с^{-1} в 1,6 раз соответственно, по отношению к группе крыс с СД. Соединение диабенол в виде гранулята таблеток (50 мг/кг) также снижал вязкостный показатель крови по отношению к группе крыс со стрептозотоциновым диабетом, но данные значения были ниже, чем в группе крыс, получавших субстанцию диабенола. Так на всем диапазоне скоростей сдвига у крыс, получавших гранулят таблеток диабенола, наблюдалось снижение показателя вязкости крови не более чем в 1,3 раза.

Величина индекса агрегации эритроцитов у крыс с СД была самая высокая и превышала в 1,35 раз данный показатель контрольной группы. В группе крыс, получавших диабенол (субстанция и гранулят таблеток) показатель агрегации эритроцитов был ниже и практически не отличался от показателя контрольной группы.

В результате исследований, проведенных на животных со стрептозотоциновым диабетом, было показано, что диабенол ингибирует функциональную активность тромбоцитов. Ему присуще, как выраженная антиагрегантная активность, так и нормализующее действие на параметры вязкости крови (как гранулята таблеток, так и субстанции), учитывая гипервязкость, характерную для данной патологии.

В заключении хотелось бы отметить, что установленная способность диабенола улучшать состояние тромбогенного потенциала крови при СД второго типа имеет значение для разработки препаратов, предназначенных для лечения и снижения частоты развития осложнений при сахарном диабете второго типа.

Заключение

Таким образом, на основании консенсусного анализа было выявлено два

наиболее перспективных класса циклических полных гуанидинов как источников веществ с высокой гипогликемической активностью: N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола. Виртуальный скрининг среди производных циклических гуанидинов выявил для дальнейшего углубленного изучения соединения следующих химических классов: 2-имино-бензимидазола; 2-амино-бензимидазола; N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]-бензимидазола; N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N¹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы; 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2а]бензимидазола.

Оценка основных показателей ADME активных соединений-лидеров (RU-254, RU-663, RU-1316) показала, что они соответствуют всем основным показателям программы DruLiTo, за исключением соединения RU-1316, показатели которого не соответствуют фильтру CMC-50-like. Оценка специальных характеристик ADME, рассчитанных с помощью модуля QikProp системы Schödinge в общем показала соответствие соединений-лидеров всем основным референсным физико-химическим параметрам.

Однако соединения RU-663 и RU-1316 характеризуются более низкими значениями расчетных фармакокинетических показателей, существенных для всасывания, транспортировки вещества и его биодоступности в целом. Кроме того, у соединения RU-663 более высокая токсичность и наименьшее значение условного терапевтического индекса, чем у соединений RU-663 и RU-1316. Следовательно, по основным показателям ADME соединений-лидеров соединение RU-254 предпочтительнее, чем два других (глава 4).

На основании проведенных исследований по изучению механизма антидиабетогенного действия диабенола установлено, что в условиях экспериментального сахарного диабета и терапии диабенолом (50 мг/кг, субстанция и гранулят таблеток) уровень гликогена в печени субстанции и гранулята стабилизировался в сравнении с группой с экспериментальным диабетом, за счет снижения интенсивности процесса гликогенолиза. Скорость гликогенолиза в печени снижалась на 36% ($p \leq 0,05$) и 30,2% ($p \leq 0,05$). Эти данные свидетельствуют о возможном снижении инсулинорезистентности, либо изменении

активности ферментов синтеза гликогена. Интенсивность гликолиза повышалась в 1,3 и в 1,2 раза соответственно, вероятно из-за усиления анаэробного процесса.

На основании морфологического исследования можно сделать заключение, что развитие стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета сопровождается характерными патогистологическими изменениями островкового аппарата поджелудочной железы в виде воспаления (инсулита), некробиоза инсулиноцитов и уменьшения количества β -эндокриноцитов. Показано, что диабенол препятствовал развитию воспалительных и деструктивных изменений островкового аппарата поджелудочной железы.

При курсовом введении субстанции диабенола, при экспериментальном стрептозотоциновом диабете, наблюдался эффект позднего ингибирования активности фермента, что предположительно связано с активностью его метаболитов, так как *in vitro* эффективность диабенола не высокая, но при пероральном введении, к 6 часу исследований развивается существенное подавление активности ДПП-4.

Таким образом, по результатам исследований установлено панкреотропное и экстрапанкреатическое действие диабенола. Влияние изучаемых веществ на поджелудочную железу возможно связано с усилением секреции инсулина. Принимая во внимание все вышеизложенное, предположительный механизм антидиабетического действия диабенола (субстанция и гранулят) представляется следующим образом: предположительно гипогликемический эффект диабенола, обнаруженный на животных со стрептозотоциновым диабетом, связан с его поливалентным механизмом действия и усилением секреции инсулина, увеличением утилизации глюкозы периферическими тканями и пролонгацией гипогликемического эффекта инсулина. На основании приведенных фактов можно заключить, что производное циклических гуанидинов диабенол является новым противодиабетическим соединением, влияющим одновременно на несколько патогенетических звеньев сахарного диабета типа II.

Выводы

1. Циклические гуанидины являются перспективным скаффолдом для поиска веществ, проявляющих гипогликемическую активность.
2. Система направленного поиска *in silico*, основанная на консенсусе прогнозных оценок, полученных несколькими методами (система PASS, ИТ «Микрокосм»,

подструктурный анализ, частотный анализ физико-химических свойств, ADME) позволяет провести ретроспективный и проспективный анализ гипогликемических структур в широких гомологичных рядах циклических гуанидинов.

3. По выраженности и частоте встречаемости соединений с гипогликемической активностью производные циклических гуанидинов расположились в следующей последовательности: N^9 -ДгИмБИ=ПрмБИ > 2-ИмИмБИ > N^1N^9 -ДгИмБИ > N^9 -ИмБИ > N^1 -ИмБИ > ТрзиБИ > ТрзоБИ > 2-АмБИ.

4. Производное 9-диэтиламиноэтил-2-(3-дигидро)имидазо[1,2-а]бензимидазол-диабенол в виде субстанции и твердой лекарственной формы (в дозе 50 мг/кг), при длительном введении (28 дней) животным с экспериментальным сахарным диабетом, оказывает существенное антидиабетогенное действие: достоверное сокращение суммарной площади под кривой остаточного содержания глюкозы в крови (тест толерантности к глюкозе); стабилизирование содержания С-пептида и гликозилированного гемоглобина (HbA1c).

5. Субстанция и гранулят диабенола оказывает антидиабетогенное действие за счет стабилизации содержания гликогена в печени (1,2 мг/г ткани и 0,9 мг/г ткани - субстанция и гранулят соответственно), которое носило статистически достоверный характер ($p < 0,05$) в печени крыс, снижения скорости гликогенолиза (112,35 мкмоль/л; 93,93 мкмоль/л - субстанция и гранулят соответственно) ($p < 0,05$) и повышении интенсивности гликолиза (11,09 мкмоль/л; 10,24 мкмоль/л - субстанция и гранулят соответственно) ($p < 0,05$), а также повышения уровня аланина в плазме крови (58,86 ммоль/л; 56,64 ммоль/л - субстанция и гранулят соответственно) ($p < 0,05$).

6. На основании результатов анализа *in silico* механизма действия диабенола было установлено, что диабенол может проявлять влияние на активность следующих белков мишеней, регулирующих углеводный обмен: DPP-4; PYGL_{Cat}; JAK2 inh; PARP1 и PDK4. Влияние на мишени: MGAM_{AGlu}; HK-4; AMPK; PPAR_g agon; HK-4 activ; FBP1; PTP1B и AMPK маловероятно.

7. В экспериментах *in vitro* установлено, что диабенол ингибирует активность ДПП-4 ($IC_{50}=1,67$ нМ). При однократном пероральном введении отмечается выраженный отсроченный ингибирующий эффект, который сохраняется при длительном введении изучаемого соединения.

8. При курсовом введении диабенола (в дозе 50 мг/кг) в желудочном и селезеночном отделах отмечалось увеличение удельного количества β -

эндокриноцитов, которое носило статистически достоверный характер ($p < 0,05$) по отношению к группе интактного контроля и составляло 46,5% и 22,9% соответственно.

9. Исследования, проведенные на животных со стрептозотоциновым диабетом, выявили, что диабенол (как гранулят таблеток, так и субстанция) снижает тромбогенный потенциал крови за счет ингибирования функциональной активности АДФ (агрегация тромбоцитов в группе диабета увеличивалась на 58%, а диабенол снижал агрегацию на 44,1%) и адреналин-индуцированных тромбоцитов (агрегация тромбоцитов в группе диабета увеличивалась на 78,9%, а диабенол снижал агрегацию на 20,3%) ($p < 0,05$); нормализует гемореологические показатели за счет выраженной антиагрегантной активности эритроцитов (ИАЭ-в группе диабенола повышался на 35%, а в группе диабенола снижался на 10%) ($p < 0,05$) и нормализующего действия на параметры вязкости крови (на всем диапазоне скоростей сдвига наблюдалось снижение показателя вязкости крови не более чем в 1,3 раза).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Hypoglycemic potential of cyclic guanidine derivatives Spasov, A. A., Vassiliev, P. M., Lenskaya, K. V., et all //Pure and Applied Chemistry. – 2017.
2. Влияние лимиглидола на дпп-4 и морфологические особенности островкового аппарата поджелудочной железы при стрептозотоциновом сахарном диабете. Спасов А.А., Чепляева Н.И., Ленская К.В., Снигур Г.Л. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т. 78. № 5. С. 8-12.
3. Влияние лимиглидола на морфологические особенности островкового аппарата поджелудочной железы у животных со стрептозотоциновым сахарным диабетом. Спасов А.А., Ленская К.В., Снигур Г.Л. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2015. № 1 (53). С. 62-65
4. Анализ перспективности химических классов производных циклических гуанидинов методом супремального оценивания. Ленская К.В., Васильев П.М., Спасов А.А., Анисимова В.А. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2015. № 2 (54). С. 98-100.
5. Гипогликемический потенциал производных бензимидазола. Спасов А.А., Ленская К.В., Васильев П.М. Химико-фармацевтический журнал. 2015. Т. 49. № 8. С. 3-7.
6. Анализ перспективности химических классов производных циклических гуанидинов методом медианных оценок. Ленская К.В., Васильев П.М., Спасов А.А., Анисимова В.А. Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2015. Т. 9. № 3. С. 16.
7. Подструктурный анализ гипогликемической активности производных циклических гуанидинов. Васильев П.М., Спасов А.А., Ленская К.В., Анисимова

В.А. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2014. № 3 (51). С. 28-30.

8. Планирование *in silico* скрининга и экспериментальное изучение гипогликемических производных циклических гуанидинов. Васильев П.М., Спасов А.А., Ленская К.В., Поройков В.В., Филимонов Д.А., Анисимова В.А. Кубанский научный медицинский вестник. 2014. № 6 (148). С. 11-15.

9. Фундаментальные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа / Спасов А.А., Петров В.И., Чепляева Н.И., Ленская К.В. // Вестник Российской академии медицинских наук. 2013. № 2. С. 43-49.

10. Синтез и фармакологическая активность амидов 2,3-дигидроимидазола 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]-бензимидазолил-п-уксусных кислот / Анисимова В.А., Спасов А.А., Косолапов В.А., Толпыгин И.Е., Тибирькова Е.В., Салазникова О.А., Кузнецова В.А., Гурова Н.А., Ленская К.В., Яковлев Д.С., Мальцев Д.В., Колобродова Н.А., Митина Т.М., Гречко О.Ю. // Химико-фармацевтический журнал. 2012. Т. 46. № 11. С. 15-20.

11. Синтез и фармакологическая активность 10-алкиламиноэтил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолов / Анисимова В.А., Толпыгин И.Е., Спасов А.А., Яковлев Д.С., Колобродова Н.А., Гурова Н.А., Салазникова О.А., Науменко Л.В., Косолапов В.А., Ельцова Л.В., Митина Т.М., Воронкова М.П., Ленская К.В. // Химико-фармацевтический журнал. 2012. Т. 46. № 6. С. 3-8.

12. Синтез и фармакологическая активность хлоридов 3-(п,п-дизамещенных)ацетамидов-1-г-2-аминобензимидазолия / Анисимова В.А., Спасов А.А., Косолапов В.А., Толпыгин И.Е., Ельцова Л.В., Кучерявенко А.Ф., Науменко Л.В., Гурова Н.А., Ленская К.В., Яковлев Д.С., Мальцев Д.В., Митина Т.М., Гречко О.Ю. // Химико-фармацевтический журнал. 2012. Т. 46. № 9. С. 6-10.

13. Инновационные направления поиска лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета типа 2 / Ленская К.В., Спасов А.А., Чепляева Н.И. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2011. № 4. С. 10-18.

14. Антитромботическая активность гипогликемических средств / Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Чепурнова М.В., Ленская К.В. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2011. Т. 10. № 2. С. 95-98.

Монографии

1. Петров В.И. Фундаментальные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа / Петров В. И., Спасов А. А., Чепляева Н. И., Ленская К. В. // Антидиабетогенный потенциал бензимидазолов / под ред. А.А.Спасова, В.И.Петрова, В.И.Минкина. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2016. – 548 с. – Гл. 1. – С. 30-45.

2. Спасов А.А. Антидиабетогенный потенциал производных бензимидазола / Спасов А.А., Ленская К.В., Васильев П.М., Анисимова В.А. // Антидиабетогенный потенциал бензимидазолов / под ред. А.А.Спасова, В.И.Петрова, В.И.Минкина. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2016. – 548 с. – Гл. 2. – С. 45-55.

3. Васильев П.М. Направленный поиск соединений, снижающих содержание сахара в крови / Васильев П.М., Спасов А.А., Дудченко Г.П., Ленская К.В., Анисимова В.А. // Антидиабетогенный потенциал бензимидазолов / под ред. А.А.Спасова, В.И.Петрова, В.И.Минкина. – Волгоград, 2016. – 548 с. – Гл. 4. – С. 106-150.

4. Спасов А. А. Изучение механизма антидиабетогенного действия диабенола / Спасов А. А., Дудченко Г. П., Чепляева Н. И., Ленская К. В. // Антидиабетогенный

потенциал бензимидазолов / под ред. А.А.Спасова, В.И.Петрова, В.И.Минкина. – Волгоград, 2016. – 548 с. – Гл. 6. – С. 166-190.

5. Снигур Г. Л. Антидиабетогенное действие диабенола при стрептозотоцини-
никотинамидной интоксикации крыс / Снигур Г. Л., Спасов А. А., Чепляева Н. И.,
Ленская К. В. // Антидиабетогенный потенциал бензимидазолов / под ред.
А.А.Спасова, В.И.Петрова, В.И.Минкина. – Волгоград, 2016. – 548 с. – Гл. 7. – С.
190-205.

6. Спасов А. А. Антитромбогенное действие диабенола / Спасов А. А.,
Кучерявенко А. Ф., Ленская К. В. // Антидиабетогенный потенциал
бензимидазолов / под ред. А.А.Спасова, В.И.Петрова, В.И.Минкина. – Волгоград,
2016. – 548 с. – Гл. 10. – С. 274-307.

7. А.А. Спасов Научные основы поиска лекарственных средств для терапии
сахарного диабета / А.А. Спасов, К.В. Ленская, Н.И. Чепляева // Мишень-
ориентированный поиск антидиабетических средств / под ред. В.И. Петров, А.А.
Спасов. - Волгоград, 2016. - 230 с - Гл. 3. - С. 40-58.

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций

1. Влияние диабенола на ферменты, участвующие в процессе расщепления
углеводов в кишечнике / Дудченко Г.П., Ленская К.В., Чепляева Н.И.//
Волгоградский научно-медицинский журнал. 2015. № 3 (47). С. 32-33.

2. Изучение гипогликемических свойств замещенных
Бензимидазола / Ленская К.В., Воронкова М.П., Спасов А.А., Анисимова А.А. //
Публикация тезисов в сборнике материалов XVIII Росс. нац. конгресса «Человек и
лекарство» (11–15 апреля 2011г).

3. Изучение гипогликемических, гемореологических и антиагрегантных свойств
аминобензимидазолов / Ленская К.В., Кучерявенко А.Ф., Кузнецова В.А.,
Науменко Л.В., Анисина В.А., Толпыгин И.Е. // Вестник ВолгГМУ: приложение
(Материалы III Всероссийского научно-практического семинара для молодых
ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической
фармакологии») – стр. 11, 2011.

4. Гиполипидемические эффекты диабенола в комбинации с натриевой солью
липоевой кислоты при экспериментальном диабете типа 2. / Чепляева Н.И.,
Чепурнова М.В., Анисимова В.А., Ленская К.В. // Вестник ВолгГМУ: приложение
(Материалы III Всероссийского научно-практического семинара для молодых
ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической
фармакологии») – стр. 80, 2011.

5. Влияние комбинации диабенола и липоевой кислоты на процессы перекисного
окисления липидов и антиоксидантный статус при интоксикации
стрептозотоцином / Чепляева Н.И., Чепурнова М.В., Ленская К.В., Анисимова В.А.
// ж-л Вестник ВолгГМУ: приложение (Материалы III Всероссийского научно-
практического семинара для молодых ученых «Методологические аспекты
экспериментальной и клинической фармакологии») – стр. 81, 2011.

6. Антидиабетическое действие диабенола в комбинации с метформином при
экспериментальном диабете типа 2. / Чепурнова М.В., Чепляева Н.И., Ленская
К.В., Анисимова В.А. // Вестник ВолгГМУ: приложение (Материалы III

Всероссийского научно-практического семинара для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии») – стр. 83, 2011.

7. Влияние нового антидиабетического средства производного гуанидина в комбинации с метформином на реологические свойства крови при экспериментальном сд типа 2. / Чепурнова М.В., Чепляева Н.И., Ленская К.В., Анисимова В.А. // Вестник ВолгГМУ: приложение (Материалы III Всероссийского научно-практического семинара для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии») – стр. 84, 2011.

8. Виртуальный поиск ингибиторов дипептидилпептидазы-4 среди производных циклических гуанидинов с высокой гипогликемической активностью / Ленская К.В., Загребельная О.В., Чепляева Н.И., Литвинов Р.А. // Публикация тезисов в сборнике IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств».

9. Статистический анализ базы данных по липофильным параметрам производных 2,3-дигидро-п9-имидазо[1,2-а]бензимидазола / Кардаш Е.В., Бригадирова А.А., Ленская К.В., Чепляева Н.И. // Публикация тезисов в сборнике IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств».

10. Кластерный анализ стерических характеристик производных 2,3-дигидро-п9-имидазо[1,2-а]бензимидазола / Айгунов М.Ш., Криволапов С.В., Ленская К.В., Чепляева Н.И. // Публикация тезисов в сборнике IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств».

11. Кластерный анализ физико-химических параметров производных циклических гуанидинов с высокой гипогликемической активностью / Криволапов С.В., Айгунов М.Ш., Ленская К.В., Чепляева Н.И. // Публикация тезисов в сборнике IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств».

12. Информационный анализ перспективности различных классов циклических гуанидинов как источников веществ с гипогликемической активностью / Ленская К.В., Васильев П.М., Анисимова В.А. // Инновации в современной Фармакологии: Матер. IV съезда фармакологов России (Казань, 18-21 сентября 2012 г.) / Изд-во «Фолиум». – М., 2012. – С. 117.

13. Частотный анализ зависимости гипогликемической активности от физико-химических параметров производных циклических гуанидинов / Ленская К.В., Чепляева Н.И., Васильев П.М., Спасов А.А., Анисимова В.А. // Тез. докл.

Юбилейного XX Российского Национального конгресса «Человек и лекарство» (М., 15-19 апр. 2013 г.). – М., 2013. – С. 372.

14. Анализ *in silico* механизма действия нового гипогликемического соединения / Ленская К.В., Васильев П.М., Спасов А.А., Анисимова В.А. // Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia-2013) с междунар. участием: Сб. тезисов (М., 8-12 сентября 2013 г.). – М., 2013. – С. 228.

15. Частотный анализ зависимости гипогликемической активности от физико-химических параметров производных циклических гуанидинов / Ленская К.В., Чепляева Н.И., Васильев П.М., Спасов А.А., Анисимова В.А. // В книге: Юбилейный XX Российский национальный конгресс "Человек и лекарство" Сборник материалов конгресса. Тезисы докладов. ЗАО РИЦ «Человек и лекарство». 2013. С. 372.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

2-АмБИ – 2-амино-бензимидазолы

2-ИмБИ – 2-имино-бензимидазолы

N⁹-ИмБИ – N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы

N⁹-ДгИмБИ – N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы

N¹-ИмБИ – N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы

N¹-ДгИмБИ – N¹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы

N¹,N⁹-ДгИмБИ – N¹,N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы

ПрмБИ – 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолы

ТрзиБИ – триазино[2,3-а]бензимидазолы

ТрзоБИ – триазоло[1,5-а]бензимидазолы

Ленская Карина Владимировна

**ЦИКЛИЧЕСКИЕ ГУАНИДИНЫ - НОВЫЙ КЛАСС
ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИХ СРЕДСТВ**

АВТОРЕФЕРАТ

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология