

БРИГАДИРОВА АНАСТАСИЯ АНДРЕЕВНА

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
БИФЕНИЛА**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Волгоград – 2017

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр»

Научный руководитель: Заслуженный деятель науки Российской Федерации, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор
Спасов Александр Алексеевич

Научный консультант: Доктор биологических наук, старший научный сотрудник
Васильев Павел Михайлович

Официальные оппоненты:

Воронина Татьяна Александровна, заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В. В. Закусова», заведующая лабораторией психофармакологии.

Оковитый Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии.

Ведущее учреждение:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Защита состоится «___» _____ 2017 г. в _____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации»

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Внедрение и широкое использование технологии высокопроизводительного скрининга в современной фармакологии позволило интенсифицировать процесс изучения соединений на разнообразные виды биологической активности. Однако данный подход не привел к массовому увеличению числа соединений-кандидатов, успешно прошедших доклинические и клинические исследования (Ward D.J. et al. *BMJ Open*. 2013. № 2. P. e002088; Scannell J.W. et al. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2012. № 3. P. 191-200). В связи с этим в медицинской химии продолжают развиваться рациональные подходы к разработке перспективных фармакологических агентов, позволяющие на ранних исследовательских этапах снизить риски и материальные затраты. Одним из таких направлений является концепция привилегированных структур или подструктур (*privileged structures*) (DeSimone R.W. et al. *Comb. Chem. High Throughput Screen*. 2004. № 5. P. 473-494; Bywater R.P. *Ernst Schering Found Symp Proc*. 2006. № 2. P. 75-91; Duarte C.D. et al. *Mini Rev. Med. Chem*. 2007. № 11. P. 1108-1119). Сочетание привилегированных структур при разработке соединений-лидеров позволяет увеличить вероятность нахождения новых высокоактивных молекул, влияющих на разные биомишени.

В связи с этим многие производные бифенила и бензимидазола, как одни из представителей привилегированных структур (Horton D. A. et al. *Chem. Rev*. 2003. № 3. P. 893-930; Bondensgaard K. et al. *J. Med. Chem*. 2004. № 4. P. 888-899; DeSimone R.W. et al. *Comb. Chem. High Throughput Screen*. 2004. № 5. P. 473-494; Costantino L. et al. *Curr. Med. Chem*. 2006. № 1. P. 65-85; Duarte C.D. et al. *Mini Rev. Med. Chem*. 2007. № 11. P. 1108-1119; Kamal A. et al. *Mini Rev. Med. Chem*. 2006. № 1. P. 53-69; Kamal A. et al. *Mini Rev. Med. Chem*. 2006. № 1. P. 71-89), могут представлять интерес как важные синтетические объекты и потенциальные биологически активные вещества, для которых характерен спектр различных фармакологических свойств (Severinsen R. et al. *J. Comb. Chem*. 2008. № 4. P. 557-566; Bansal Y. et al. *Bioorg. Med. Chem*. 2012. № 21. P. 6208-6236; Jain Z.J. et al. *Arab. J. Chem*. 2017. Suppl. 2. P. S2051-S2066).

На основании изложенного выше актуальным и целесообразным является изучение фармакологической активности соединений, содержащих структурную комбинацию следующих привилегированных фрагментов – бифенила и конденсированных (неконденсированных) азолов.

Степень научной разработанности проблемы

В настоящее время одной из привилегированных подструктур является бифенил для которого характерны такие виды фармакологической активности, как антигипертензивная, антимикробная, блокирующая активность в отношении кальциевых каналов, противовоспалительная, антидиабетическая, диуретическая, антиагрегантная, а также ряд психотропных эффектов (Severinsen R. et al. *J. Comb. Chem.* 2008. № 4. P. 557-566; Jain Z.J. et al. *Arab. J. Chem.* 2017. Suppl. 2. P. S2051-S2066).

В то же время для производных бензимидазола также отмечается широкий спектр фармакологических эффектов. Так, на кафедре фармакологии ВолгГМУ длительное время проводится изучение биологической активности производных бензимидазола. Получены значительное количество данных о гемореологической, антиагрегантной, антиаритмической, антиоксидантной (Анисимова В.А. и др. *Хим.-фарм. журн.* 2010. № 7. С. 7-13), антагонистической в отношении серотониновых рецепторов второго А (5-НТ_{2А}) (Анисимова В.А. и др. *Хим.-фарм. журн.* 2012. № 6. С. 54-59) и третьего (5-НТ₃) типов (Спасов А.А. и др. *Хим.-фарм. журн.* 2013. № 8. С. 3-8) активности. Также для них характерны иные виды свойств, такие как антидиабетические, противовоспалительные, антимикробные, противовирусные, противоопухолевые, психотропные и другие (Bansal Y. et al. *Bioorg. Med. Chem.* 2012. № 21. P. 6208-6236; Narasimhan V. et al. *Med. Chem. Res.* 2012. № 3. P. 269-283; Keri R. S. et al. *Chem. Biol. Drug Des.* 2015. № 1. P. 19-65).

На сегодняшний день разработаны и успешно применяются соединения, содержащие комбинацию указанных привилегированных подструктур, при этом наиболее востребованными являются лекарственные средства с выраженным антагонистическим действием по отношению к ангиотензиновым АТ₁-рецепторам (кандесартан, валсартан и телмисартан) (Фомин В.В. и др. *Клиническая нефрология.* 2009. № 4. С. 63-70).

В ряде работ подтверждается возможность АТ₁-антагонистов оказывать положительное влияние на метаболические процессы, кроме того, отмечаются их нейрозащитные и противовоспалительные свойства в дополнение к основному антигипертензивному эффекту (Saavedra J.M. et al. *Psychoneuroendocrinology.* 2011. № 1. P. 1-18.; Wright J.W. et al. *Pflugers. Arch.* 2013. № 1. P. 133-151; Wang J. et al. *Neuropharmacology.* 2014. Vol. 79. P. 249-261).

Для ряда из них также описано средство к PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), стимуляция которых играет немаловажную роль в регуляции метаболизма глюкозы и способствует повышению чувствительности периферических тканей к инсулину (Taguchi I. et al. *Hypertens. Res.* 2013. № 7. P. 608-613; Zidek V. et al. *Am. J. Hypertens.* 2013. № 6. P. 829-835).

Исследование влияния соединений на патогенетически важные мишени при сахарном диабете выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-25-00139).

Целью исследования является изучение фармакологических свойств новых гибридных линкерных соединений, содержащих комбинацию бифенильного и азольных фрагментов.

Задачи исследования

1. Изучить влияние новых гибридных линкерных соединений, содержащих комбинацию бифенильного и азольных фрагментов, на следующие виды фармакологической активности в опытах *in vitro*: АТ₁-антагонистическая, антиагрегантная, антигликирующая, регликирующая, антиоксидантная, влияние на активность ДПП-4, гликогенфосфорилазы, АМРК, РТР1В и глюкокиназы.
2. Провести анализ зависимости между химической структурой исследованных веществ и их биологической активностью.
3. Определить острую токсичность наиболее активных соединений.
4. Исследовать вариабельность в отношении различных видов биологической активности гибридных линкерных структур, содержащих следующие привилегированные фрагменты – бифенил и азолы.
5. Для наиболее активных соединений изучить их углубленные фармакологические свойства на экспериментальных моделях *in vivo* и сравнить с действием известных препаратов.

Научная новизна

Впервые были проведены скрининговые исследования по 10 видам фармакологической активности для 35 веществ, из которых 6 относятся к производным бифенила, связанных с бензимидазолом через метиленовую или оксоэтильную группу, 8 соединений – к производным замещенного бифенила, связанного с имидазо[1,2-*a*]бензимидазолом через метиленовую группу, или непосредственно связанного с гетероциклическим кольцом имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, 7 соединений – к производным бифенила, связанным с имидазолом или тиазолом через оксоэтильную группу, и 14 соединений – к производным дифенилоксида.

Показано преимущество гибридных линкерных структур, содержащих два фрагмента – бифенил и бензимидазол, несколькими статистическими методами. Впервые создана и опробована системная сетевая фармакологическая модель оценки антидиабетического действия с учетом взаимозависимости активностей для прогнозирования и отбора наиболее перспективных веществ для исследований *in vivo*.

В результате проведенных исследований установлено, что соединение DF-5 (9-бензил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол) по уровням регулирующей активности и способности разрывать сшивки гликированных белков превосходит вещество сравнения ALT-711. Установлено нефрозащитное действие вещества DF-5 на модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета с диабетической нефропатией, сопоставимое с эффективностью ALT-711.

Среди гибридных линкерных структур были найдены две молекулы – 9-метил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол (DF-1) и 9-диметиламиноэтил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол (DF-6) – с высокими антиоксидантными и антирадикальными свойствами, впервые изучен их механизм действия *in vitro*.

Установлено, что соединение AZH-141 (гидробромид 1-(2,2-диметиламиноэтил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин) обладает высокой РТP1В-ингибирующей активностью и умеренной способностью активировать АМРК, что соответствует эффективности веществ сравнения NSC-87877 и АICAR. Впервые показаны антигипергликемический эффект соединения AZH-141 и его способность снижать массу жировой ткани на модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс, находящихся на высокожировой диете, сопоставимые с аналогичными эффектами препарата сравнения метформина.

Теоретическая и практическая значимость работы

Выявленная в ходе проведенного исследования большая вариабельность в аспекте проявления различных видов фармакологической активности гибридных линкерных структур, содержащих бифенил и конденсированные азолы, может быть использована при целенаправленном поиске и синтезе новых высокоактивных веществ. Данный подход построения сетевой фармакологической модели может быть рекомендован для прогнозирования и отбора перспективных соединений для исследования *in vivo* с другими видами биологической активности.

Методология и методы исследования

Согласно поставленным задачам выбраны современные высокоинформативные методические подходы, доступные в ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ и ГБУ ВМНЦ.

Методология исследования включала использование валидированных методов тестирования активности соединений *in vitro* (Спасов А.А. и др. Бюл. эксперим. биол. и мед. 2014. № 7. С. 128-130; Спасов А.А. и др. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2016. № 2. С. 167-175; Born G.V.R. Nature. 1962. Vol. 194. P. 927-929; Габбасов З.А. и др. Лаб. дело. 1989. № 10. С. 15-18; Jedsadayamata A. Naresuan University Journal. 2005. № 2. P. 35-41;

Кузнецова В.А. и др. ВНМЖ. 2014. № 3. С. 50-51; Ratnasooriya W. D. et al. Trop. J. Pharm. Res. 2014. № 4. P. 567-571; Спасов А.А. и др. Вестник ВолгГМУ. 2016. № 1. С. 30-32; Ли С. и др. Пат. RU 2444517 С2, МПК А61, опубл. 10.03.2012. Бюл. № 7; Ланкин В.З. и др. Труды московского общества испытателей природы. 1975. Т. 52. С. 73-78; Matheussen V. et al. Clin. Chim. Acta. 2012. № 3-4. P. 456-462; Hess H.H. et al. Analytical biochemistry. 1975. № 2. P. 607-613; Lubben T. et al. Curr. Protoc. Pharmacol. 2001. Unit 3.8. P. 3.8.1-3.8.18; Hsiao K. et al. Promega Corp., 2015. URL: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/kinase-enzyme-appnotes/ampk-a2b1g1-kinase-assay.pdf?la=en> (дата обращения 06.06.2016); Lu M. et al. PLoS One. 2014. № 2. P. e88431), а также современные методы *in silico* для обработки и визуализации полученных данных (Зиновьев А.Ю. Визуализация многомерных данных ... 2000; Глотов Н.В. Биометрия ... 1982; Голендер, В. Е. Вычислительные методы конструирования лекарств ... 1978; Chen S. et al. Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 24245; Katsila T. et al. Comput. Struct. Biotechnol. J. 2016. Vol. 14. P. 177-184; Zhang W.J. et al. Network Pharmacology. 2016. № 1. P. 1-14; McDonald J.H. Handbook of biological statistics ... 2014).

Экспериментальные исследования выполнены с использованием достаточного количества лабораторных животных и в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с антидиабетической активностью (Спасов А.А. и др. // Руководство по проведению доклинических исследований ... 2012. С. 670-684; там же, Макаров В.Г. и др. С. 685-699), а также в соответствии с общепринятыми и используемыми в современной фармакологии подходами к изучению механизмов действия, специфических и токсикологических свойств (там же, Арзамасцев Е.В. и др. С. 13-24; Теселкин Ю.О. и др. Вопросы медицинской химии. 1997. № 2. С. 87-93; Rice-Evans C. et al. Methods Enzymol. 1994. Vol. 234. P. 278-293; Glavind J. Acta chemica scand. 1963. № 6. P. 1635-1640).

Использованы рекомендованные для проведения доклинических исследований методы статистического анализа полученных результатов (Сергиенко В.И. и др. // Руководство по проведению доклинических исследований ... 2012. С. 889-940).

Все исследования были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (OHRP), протокол № 2016-2015 от 5 июня 2015 года.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У производных, содержащих комбинацию бифенильного и конденсированных азольных компонентов, а именно 1-диалкиламиноалкил-3-бифенил-2-иминобензимидазолинов, 9-замещенных 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов и 9-замещенных 2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов выявлены высокая

антиоксидантная, регликирующая, антиагрегантная, РТP1В-ингибирующая и АМРК-активирующая активность.

2. Гибридные линкерные структуры, содержащие бифенил и конденсированные азолы, характеризуются более широким спектром фармакологической активности и большим числом соединений, активность которых превышает аналогичный эффект препарата сравнения, чем дифенилоксиды и молекулы, содержащие бифенильный и неконденсированные азольные компоненты.
3. Соединение DF-5 (9-бензил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол) обладает свойствами высокоактивного разрывателя поперечных сшивок гликированных белков и оказывает выраженное нефрозащитное действие на модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета.
4. Вещество AZH-141 (гидробромид 1-(2,2-диметиламиноэтил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин) проявляет свойства ингибитора РТP1В и активатора АМРК, оказывает антигипергликемический эффект на модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у животных, находящихся на высокожировой диете.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и методических подходов, соответствующих поставленным задачам. Сформулированные в диссертации выводы были подтверждены экспериментальным материалом, анализом литературы, точностью статистической обработки полученных результатов.

Основные положения диссертационной работы докладывались, обсуждались и представлялись на 71-, 73-, 74- и 75-й открытых научно-практических конференциях молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 2013-2017 гг.; XIX и XX Региональных конференциях молодых исследователей Волгоградской области, Волгоград, 2014-2015 гг.; IV Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 2014 г.; Международной научно-практической конференции «Белорусские лекарства», Республика Беларусь, Минск, 2014 г.; VII международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», Санкт-Петербург, 2014 г.; I научно-практической конференции с международным участием «Дезадаптация различного генеза и пути ее фармакологической

коррекции», Пятигорск, 2015 г.; XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии, Екатеринбург, 2016 г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 22 печатные работы, из них 8 в ведущих научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, и 1 патент на изобретение.

Личный вклад автора

Приведенные в работе данные получены лично автором или при личном участии автора во всех этапах работы: определение цели и задач, построение плана работы, выбор методов, организация и воспроизведение экспериментов, статистическая обработка и анализ полученных данных, написание публикаций по теме исследования и оформление их в печать. Выводы и положения, выносимые на защиту, сформулированы лично автором.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 173 страницах машинописного текста и состоит из введения, восьми глав, выводов, практических рекомендаций, перечня сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 46 рисунками (а также 4 рисунками в приложении) и 35 таблицами (а также 5 таблицами в приложении). Библиографический указатель включает 235 источника, из них 36 отечественных, 199 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **главе 1** представлен **обзор литературы**, обосновывающий перспективность поиска и разработки новых биологически активных соединений среди производных бифенила, бензимидазола и дифенилоксида. В первой части обзора рассматривается концепция привилегированных структур как один из подходов в медицинской химии к созданию новых высокоактивных соединений и подтверждается, что молекула бифенила является привилегированной подструктурой, то есть базовой структурой со способностью эффективно связываться с более чем одним семейством биологических мишеней, и может служить основой для создания высокоселективных лигандов с разнообразными видами активности. Приведены данные о лекарственных препаратах, содержащих в своей химической структуре бифенильный фрагмент. В последующих подглавах содержится информация о фармакологических свойствах и потенциале комбинации бифенила с конденсированными азолами (бензимидазолом), а также о перспективности поиска новых активных веществ среди биоизостерных аналогов бифенила – производных дифенилоксида. В заключительной части обзора литературы обосновывается перспективность изучения фармакологических свойств гибридных соединений, содержащих комбинацию азолов и бифенила в базовой структуре.

Во **второй главе** представлено описание материалов и методов исследования, которые были использованы при выполнении поставленных в диссертации задач.

Материалы. В работе было изучено 35 веществ, из которых 6 относятся к производным бифенила, связанным с бензимидазолом через метиленовую/оксоэтильную группу, 8 соединений – к производным замещенного бифенила, связанного с 2,3-дигидро-9*H*-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолом через метиленовую группу, и непосредственно связанного с гетероциклическим кольцом имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, 7 соединений – к производным бифенила, связанным с имидазолом/тиазолом через оксоэтильную группу, и 14 соединений – к производным дифенилоксида. Вещества синтезированы в лаборатории органического синтеза НИИ физической и органической химии Южного федерального университета и в лаборатории кафедры технологии органического и нефтехимического синтеза Волгоградского государственного технического университета¹.

Фармакологические исследования проводились на лабораторных животных: 75 нелинейных крысах-самцах массой 200-350 г (ООО «НИЦ БМТ», ветеринарное

¹ Выражаем искреннюю благодарность в.н.с., к.х.н. В.А. Анисимовой, н.с., к.х.н. О.Н. Жуковской, проф., д.х.н. Ю.В. Попову, к.х.н. В.С. Лобасенко и к.х.н. Т.К. Корчагиной за синтез и предоставление субстанций веществ для данного исследования.

свидетельство № 0604106 от 20.09.15 г., ветеринарное свидетельство № 0645111 от 06.06.16 г.); 50 крысах-самцах линии Sprague-Dawley массой 200-230 г (ООО «НИЦ БМТ», ветеринарное свидетельство № 0697200 от 06.11.16 г., ветеринарное свидетельство № 0643327 от 26.02.16 г.); 132 нелинейных мышах обоего пола массой 20-30 г (ООО «НИЦ БМТ», ветеринарное свидетельство № 0643044 от 20.12.15 г.); 12 кроликах-самцах породы Шиншилла массой 3-3,5 кг (ИП Бабичева Т.М., ветеринарное свидетельство № 0132840 от 09.06.2016 г.)

Содержание животных и экспериментальные манипуляции отвечали международным рекомендациям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (1986), а также правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ в соответствии с «Принципами надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ Р 33044-2014) и «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (Минздрав РФ, приказ № 199н от 1 апреля 2016 г.).

Методы. Антагонистическая активность по отношению к ангиотензиновым АТ₁-рецепторам изучалась на модели АТ II – индуцированного спазма изолированной портальной вены крыс *in vitro* по методу (Спасов А.А. и др. Бюл. эксперим. биол. и мед. 2014. № 7. С. 128-130) в модификации (Спасов А.А. и др. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2016. № 2. С. 167-175) с помощью однокамерной установки для изолированных органов 4000 (Ugo Basile, S.R.L., Италия). Влияние на агрегацию тромбоцитов изучаемых веществ исследовали по методу (Born G.V.R. Nature. 1962. Vol. 194. P. 927-929) в модификации (Габбасов З.А. и др. Лаб. дело. 1989. № 10. С. 15-18). Агрегацию индуцировали АДФ (5 мкМ). Антигликирующее действие оценивали по степени подавления веществами неферментативного гликозилирования бычьего сывороточного альбумина (БСА) *in vitro* по методу (Jedsadayamata A. Naresuan University Journal. 2005. № 2. P. 35-41) в модификации (Кузнецова В.А. и др. ВНМЖ. 2014. № 3. С. 50-51). Регликирующую активность соединений оценивали по их способности регликовать гликированный БСА *in vitro* по методу (Ratnasooriya W. D. et al. Trop. J. Pharm. Res. 2014. № 4. P. 567-571) в модификации (Спасов А.А. и др. Вестник ВолГМУ. 2016. № 1. С. 30-32). Способность наиболее активных соединений разрывать поперечные сшивки гликированных белков *in vitro* оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа по разрушению сшивок гликированного БСА с коллагеном (Ли С. и др. Пат. RU 2444517 С2, МПК А61, опубл. 10.03.2012. Бюл. № 7)². Скрининг антиоксидантных свойств новых веществ проводили на

² Выражаем благодарность к.фарм.н. А. И. Ращенко за помощь в проведении исследования.

модели аскорбат-индуцируемого перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Ланкин В.З. и др. Труды московского общества испытателей природы. 1975. Т. 52. С. 73-78).

Исследование влияния веществ на активность ферментов ДПП-4 (Matheeußen V. et al. Clin. Chim. Acta. 2012. № 3-4. P. 456-462), РТР1В (Lubben T. et al. Curr. Protoc. Pharmacol. 2001. Unit 3.8. P. 3.8.1-3.8.18), глюкокиназы (Lu M. et al. PLoS One. 2014. № 2. P. e88431), гликогенфосфоорилазы (Hess H.H. et al. Analytical biochemistry. 1975. № 2. P. 607-613) и АМПК (Hsiao K. et al. Promega Corp., 2015. URL: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/kinase-enzyme-appnotes/ampk-a2b1g1-kinase-assay.pdf?la=en> (дата обращения 06.06.2016)) проводилось в соответствии с экспериментальными протоколами производителя при помощи соответствующих коммерческих наборов реактивов.

Для изучения зависимости между структурой исследуемых соединений и их биологической активностью использовался эмпирический метод, основанный на описании структуры соединения с помощью набора структурных фрагментов или физико-химических параметров и последующем анализе соотношений между величиной активности и их значениями (Baskin I.I. et al. J. Chem. Inf. Comput. Sci. 1997. № 4. P. 715-721; Zefirov N.S. et al. J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2002. № 5. P. 1112-1122).

При проведении исследований *in silico* использованы методы: ландшафтнй подход к визуализации многомерных данных (Зиновьев А.Ю. Визуализация многомерных данных ... 2000), медианное и супремальное оценивание перспективности классов изучаемых соединений (Глотов Н.В. Биометрия ... 1982; Голендер, В. Е. Вычислительные методы конструирования лекарств ... 1978), многомерный дисперсионный анализ и методы множественных сравнений для сравнительной оценки привилегированности подструктур (McDonald J.H. Handbook of biological statistics ... 2014), построение корреляционной биологической сети (Chen S. et al. Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 24245; Katsila T. et al. Comput. Struct. Biotechnol. J. 2016. Vol. 14. P. 177-184; Zhang W.J. et al. Network Pharmacology. 2016. № 1. P. 1-14) и расчет антидиабетического функционала сетевого профиля новых соединений.

Исследование острой токсичности соединений проводили на нелинейных мышах обоего пола при в/б введении (Арзамасцев Е.В. и др. // Руководство по проведению доклинических исследований ... 2012. С. 13-24). Для расчета величины токсикологического показателя LD₅₀ использовали пробит-анализ по методу Финни (Finney D. J. Probit analysis ... 1971), уровень токсичности соединений определялся согласно (ГОСТ 12.1.007-76).

Изучение механизмов антиоксидантного действия наиболее активных веществ проводилось на модели инактивации свободного стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ•) (Glavind J. Acta chemica scand. 1963. № 6. P. 1635-1640), модели

окисления 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS•) (Rice-Evans C. et al. *Methods Enzymol.* 1994. Vol. 234. P. 278-293) и модели гемоглобин-Н₂О₂-люминол-зависимой хемилюминесценции *in vitro* (Теселкин Ю.О. и др. *Вопросы медицинской химии.* 1997. № 2. С. 87-93).

Исследование антидиабетогенного эффекта соединений проводилось на модели оценки гипогликемического действия при однократном введении интактным животным (Holland G. F. et al. *J. Med. Pharm. Chem.* 1961. № 1. P. 99-110) и на экспериментальной модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета в комбинации с высокожировой диетой при хроническом введении (Srinivasan K. et al. *Pharmacol. Res.* 2005. № 4. P. 313-320)³. Изучение нефрозащитного действия наиболее активных соединений проводилось при хроническом введении на экспериментальной модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета с формированием диабетической нефропатии (Wei M. et al. // *Heart, Lung and Circulation.* 2003. Vol. 12. P. 44-50)⁴.

Для статистической обработки данных в качестве параметрических критериев использованы непарный t-тест; для множественного сравнения – однофакторный дисперсионный анализ с посттестом Даннета; для зависимых измерений – парный t-тест. В случае ненормального распределения данных использованы U-критерий Манна-Уитни либо критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна – для множественного сравнения; для зависимых измерений – критерий Вилкоксона. Расчеты концентрационных зависимостей выполнены с использованием линейного и нелинейного регрессионного анализов.

В третьей главе «поиск новых биологически активных соединений среди линкерных производных бифенила и неконденсированных азолов» проведено изучение 7 соединений, содержащих подструктуру бифенила, из которых 2 вещества относятся к бромидам 4-метил- и 4,5-диметил-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазола, 5 соединений – бромиды 1-R₁-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]имидазолия.

По результатам скринингового этапа исследованные имидазолиевые и тиазолиевые производные бифенила проявили высокие антиагрегантные свойства и активирующее действие в отношении АМРК.

Для бромида 4,5-диметил-3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазол-3-ил было установлено выраженное антиагрегантное действие, а также выявлены статистически значимые АМРК-активирующая, антигликирующая, регликирующая и РТР1В-ингибирующая активность. Данное соединение под лабораторным шифром AZHT-9

³ Выражаем благодарность к.х.н. Д. А. Бабкову за помощь в проведении исследования.

⁴ Морфологические исследования были проведены совместно с сотрудником кафедры патологической анатомии к.м.н. Н. Г. Паньшиным под руководством заведующего кафедрой д.м.н., профессора А. В. Смирнова, за что выражаем благодарность и глубокую признательность.

превосходило антиагрегантное действие референтного препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты по показателю EC_{50} в 350 раз.

Глава 4. Поиск новых биологически активных соединений среди линкерных производных бифенила, сопряженных с конденсированными азолами. В результате изучения биологической активности новых линкерных производных, содержащих две привилегированные подструктуры – бифенил и неконденсированный или конденсированный бензимидазол, было обнаружено, что данные гибридные комплексы характеризуются выраженными антиагрегантными, антиоксидантными, активирующими АМПК и ингибирующими РТР1В эффектами, а также способностью разрывать сшивки гликированных белков.

Среди изученных веществ из ряда производных бифенила, сопряженных с бензимидазолом, не было обнаружено соединений с выраженными АТ₁-ингибирующими свойствами. Это может свидетельствовать в пользу теории о том, что для проявления АТ₁-антагонистической активности привилегированными структурами в составе соединений являются бифенил-тетразольный или бифенил-карбоксийный фрагменты (Duarte C.D. et al. *Mini Rev. Med. Chem.* 2007. № 11. P. 1108-1119; Welsch M.E. et al. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2010. № 3. P. 1-15).

По результатам скринингового исследования были выбраны соединения с наиболее высокими уровнями активности, которые изучались в широком диапазоне концентраций с последующим расчетом их показателей IC_{50} и LD_{50} .

При дозозависимом исследовании антиоксидантных свойств наименьшие значения IC_{50} были выявлены у соединений DF-1 (0,19 мкмоль/л) и DF-6 (0,36 мкмоль/л). Так, соединения DF-1 и DF-6 по показателю IC_{50} превосходили тролокс (18,1 мкмоль/л) в 95,3 и 50,3 раза, соответственно. Вещество DF-1 по показателю IC_{50} превосходило дибунол (0,27 мкмоль/л) в 1,4 раза, а вещество DF-6 незначительно уступало ему.

Соединение DF-5 (0,31 ммоль/л) превосходило показатель IC_{50} вещества сравнения ALT-711 (1,89 ммоль/л) в 6,1 раза по способности разрывать поперечные сшивки гликированных белков.

Оба соединения с наиболее выраженной РТР1В-ингибирующей активностью AZH-141 и AZH-137 по величине IC_{50} в несколько раз уступали веществу сравнения NSC-87877. Однако, с учетом выявленных у AZH-141 высоких антиагрегантных, РТР1В-ингибирующих и АМПК-активирующих свойств и умеренного ингибирующего гликогенфосфорилазу действия, данное соединение можно отнести к полифункциональным. Оно являлось лидером в нашем исследовании по числу выявленных эффектов у одного соединения.

В итоге для дальнейшего углубленного фармакологического изучения механизмов антиоксидантного действия были выбраны соединения DF-1 и DF-6.

При изучении механизмов их антиоксидантного действия было выявлено, что соединения оказывают различную антиоксидантную и антирадикальную активность на моделях с отличающимся генезом свободно-радикальных реакций. Так, соединение DF-1 оказалось более активным в методе окисления радикала ABTS•, тогда как в отношении радикалов люминола и активных форм кислорода в системе люминол-зависимой хемилюминесценции оба вещества оказались в равной степени высокоактивными (рис. 1).

При этом показано, что активность обоих соединений в тесте окисления радикалаДФПГ• оказалась невысокой (рис. 1), что можно объяснить затрудненностью взаимодействия изучаемых соединений с данным радикалом из-за стерических характеристик строения молекулы вещества.

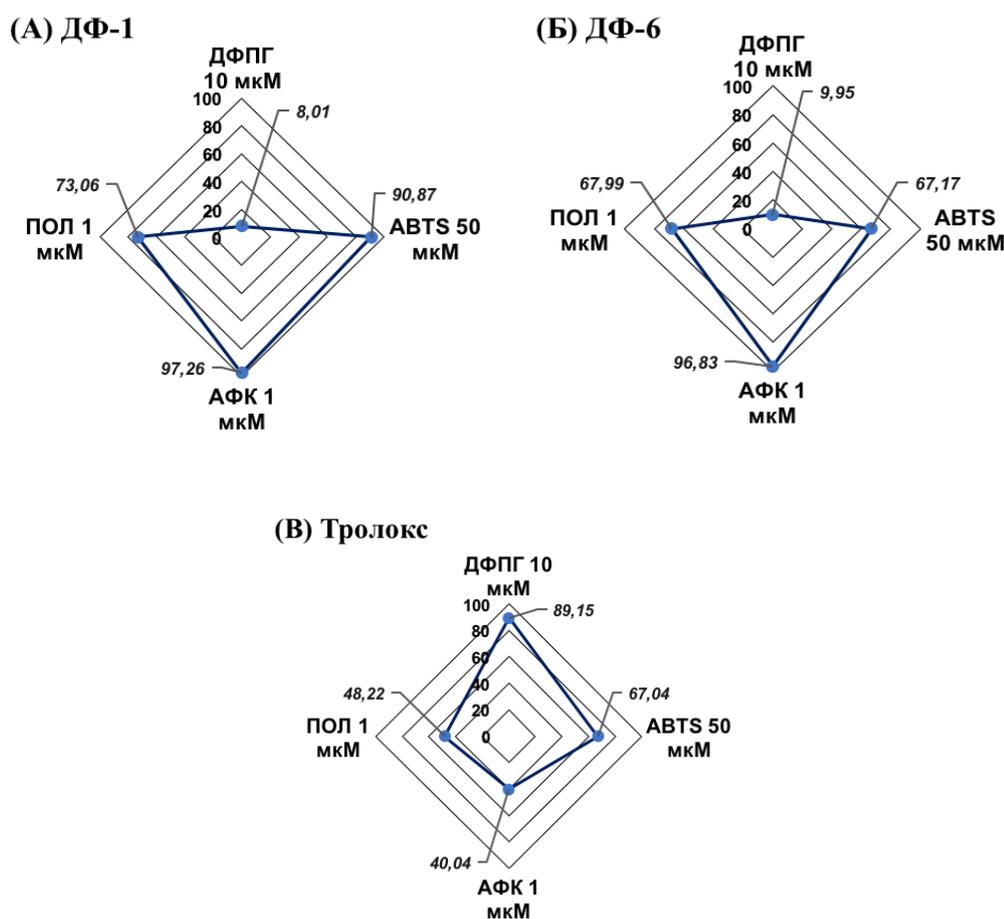


Рисунок 1. Активности соединений DF-1 (А), DF-6 (Б) и вещества сравнения тролокса (В) (% ингибирования) на моделях изучения антиоксидантных и антирадикальных свойств.

С учетом полученных данных экспериментальных исследований, сведений о водорастворимости и рассчитанном значении LD₅₀ при в/б введении соединения DF-6 (122

мг/кг), оно было рекомендовано к углубленному изучению его антиоксидантных свойств на моделях *in vivo*.

Глава 5. Поиск новых биологически активных соединений среди производных дифенилоксида. В ряду новых производных дифенилоксида обнаружены соединения с антиагрегантными, антиоксидантными и антигликирующими свойствами, а также выявлены производные, способные изменять активность следующих ферментов: ДПП-4, РТР1В и АМРК. Хотя данные производные и не показали значительной активности, отдельные выявленные эффекты соединений делает их перспективными для дальнейших модификаций. Полученные результаты показывают, что некоторые производные дифенилоксида (TONS-281, TONS-495, TONS-241, TONS-513, TONS-508) могут быть использованы как базовые молекулы для направленного синтеза и разработки высокоактивных полифункциональных соединений, сочетающих в себе два и более видов активности.

Шестая глава. Анализ *in silico* результатов скрининговых исследований. оценка перспективности классов изученных соединений. На данном этапе был проведен сравнительный анализ спектров 10 видов фармакологической активности, который выполнялся при помощи построения ландшафтов изученных биологических активностей на основе данных нормированных показателей.

По результатам анализа ландшафтов биологической активности четырех химических классов изучаемых соединений: производных дифенилоксида (DPO), производных дифенила, сопряженных с неконденсированными азолами (DP), производных дифенила, сопряженных с бензимидазолом (DP+BI), производных дифенила, сопряженных с имидазобензимидазолом (DP+ImBI), показано, что классы производных бифенила с бензимидазолом и с имидазобензимидазолом являются наиболее разнообразными по спектру проявленных фармакологических эффектов. Дифенилы, сопряженные с неконденсированными азолами, являются привилегированными по следующим видам активности: антигликирующей, антиагрегантной и АМРК-активирующей. Базовые структуры бифенила с неконденсированным (конденсированным) бензимидазолом являются более перспективными для проведения экспериментального поиска высокоактивных соединений с антидиабетогенным потенциалом, обладающих регулирующим действием, РТР1В-ингибирующим или АМРК-активирующим эффектами.

Далее была проведена оценка перспективности базовых структур с использованием средних и супремальных значений уровня активности.

В результате проведенного анализа медианных и супремальных оценок было показано, что из четырех представленных химических классов две гибридные линкерные структуры, полученные в результате соединения единичной связью двух привилегированных

структур – бифенила и неконденсированного (конденсированного) бензимидазола, являются достаточно перспективными для поиска высокоактивных соединений: DP+BI в большей степени за счет вклада базовой структуры, менее за счет варибельности заместителей; DP+ImBI, наоборот, в большей степени за введения заместителей, повышающих активность, а менее – за счет базовой структуры.

По результатам проведенных дисперсионного анализа и множественных сравнений было показано, что гибридные линкерные структуры, содержащие два привилегированных фрагмента (DP+BI и DP+ImBI), характеризуются большим числом и уровнем проявленной активности, чем две другие химические группы (DP и DPO). Выявлено, что изученные виды активности по-разному реагируют на изменение привилегированности соединений – от полного отсутствия реакции в случае АМПК-активирующего эффекта до очень высокой чувствительности в случае РТР1В-ингибирующего действия, что может быть связано с различными механизмами реализации этих активностей.

Можно предполагать, что сочетание двух привилегированных фрагментов – бифенила и неконденсированного (конденсированного) бензимидазола – приводит к тому, что расширяются возможности связывания конечной базовой структуры с различными белками. Возможно, этот механизм осуществляется через связывание молекулы с каким-либо «особым» карманом сайта белка, например, ответственным за фиксацию так называемых «привилегированных» структур (Bywater R.P. Ernst Schering Found Symp Proc. 2006. № 2. P. 75-91). Взаимодействие производных бифенила, сопряженных с неконденсированным (конденсированным) бензимидазолом, с сайтом белка вероятно происходит в два этапа: связывание с «привилегированным» карманом сайта основной части молекулы (регулируется размерами лиганда) и связывание со «специфическим» карманом сайта (определяется введенными заместителями).

По результатам проведенных скрининговых испытаний четырех химических классов изучаемых соединений также была построена корреляционная сеть, которая отражала взаимное влияние изученных видов фармакологической активности друг на друга. С помощью методов системной биологии и сетевой фармакологии разработана модель оценки антидиабетического действия с учетом взаимозависимости активностей с последующим отбором соединения-лидера для изучения на моделях *in vivo*. Значение антидиабетического сетевого функционала отражает способность соединения проявлять антидиабетическое действие в экспериментах *in vivo*.

Использование системной сетевой фармакологической модели антидиабетического действия производных бифенила и дифенилоксида позволяет отбирать соединения для изучения *in vivo* с учетом уровня каждого вида активности и их взаимозависимости.

Согласно данным полученных расчетов нами отобраны для дальнейших экспериментальных исследований *in vivo* соединения AZH-141 с наиболее высоким значением антидиабетического функционала и DF-5 с аналогичным высоким показателем и уникальным механизмом действия для изучения – способностью разрывать сшивки гликированных белков.

Глава 7. Изучение фармакологической активности наиболее активных соединений в исследованиях *in vivo*. В первой части главы приводятся результаты исследования соединения DF-5 с показанной способностью разрушать сшивки гликированных белков *in vitro* и вещества сравнения ALT-711 (алагебриума) при курсовом 30-дневном введении в дозе 12,5 мг/кг в/ж на модели стрептозотоцин-индуцированного СД.

В первую очередь, продемонстрировано, что данная экспериментальная модель соответствовала изучаемой патологии – сахарному диабету 1 типа. Выбранная нами модельная патология позволила воспроизвести хроническое повреждение почек при СД за счет формирования стойкой гипергликемии при длительном периоде моделирования диабета в течение двух месяцев. На протяжении всего исследования животные с диабетом оказались менее склонны к набору массы тела, чем интактные; у них были зафиксированы повышенные значения уровней глюкозы в крови и HbA_{1c} по сравнению с интактной группой ($p < 0,05$). При этом в группе, получавшей изучаемое соединение DF-5 в течение 30 дней в дозе 12,5 мг/кг (в/ж), наблюдали увеличение массы тела животных по сравнению с контрольной. Также в группе животных, получавших DF-5, содержание HbA_{1c} в цельной крови статистически значимо снизилось в 1,7 раза ($p < 0,05$) без достоверного снижения уровня глюкозы в крови по сравнению с группой контроля, что является характерным для действия разрывателей сшивок гликированных белков.

Используемая экспериментальная модель сахарного диабета являлась адекватной и в отношении сформировавшейся диабетической нефропатии, так как по результатам исследования у контрольной группы животных были зафиксированы массивная протеинурия и повышенный диурез по сравнению с интактной группой, а также отмечены специфические морфологические признаки нефропатии: утолщение базальной мембраны капилляров клубочков, расширение мезангия и снижение просвета полости капсулы клубочков.

Соединение DF-5 в дозе 12,5 мг/кг в/ж способствовало нормализации основных показателей, характеризующих снижение экскреторной функции почек при сахарном диабете. Изучаемое вещество достоверно снижало количество белка в моче и уровень суточной экскреции белка практически в 2-2,5 раза ($p < 0,05$) в сравнении с группой контроля после 30-дневного введения веществ, не уступая при этом алагебриуму.

Гистоморфологическая картина почек также свидетельствовала о эффективном нефрозащитном эффекте вещества DF-5. Была сохранена нормальная структура почечных клубочков, также выявлено количественное снижение признаков ранних изменений в стенках капилляров и мезангии клубочков.

При проведении морфометрического исследования с окраской по Массону срезов почек животных выявлено, что относительная площадь соединительной ткани клубочков в контрольной группе с сахарным диабетом увеличилась в 5,8 раза по сравнению с интактной группой, а относительная площадь соединительной ткани клубочков в группе, получавшей вещество DF-5, снизилась в 1,6 раза по сравнению с группой контроля.

Кроме того, оценивали содержание компонентов межклеточного матрикса, таких как коллаген типа I и фибронектин, количество которых увеличивается при фиброзных изменениях тканей почек при диабетической нефропатии (Forbes J.M. et al. FASEB J. 2003. № 12. P. 1762-1764), а также накопление конечных продуктов гликирования (AGEs) и рецепторов к ним (RAGE), которые также вовлекаются в прогрессирование фиброзных изменений при гломерулосклерозе.

По результатам иммуногистохимического исследования при использовании антител к AGEs, RAGE и фибронектину относительная площадь позитивного материала в контрольной группе с СД увеличилась от 2,9 до 4,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с интактной. В группе, получавшей соединение DF-5, относительная площадь AGEs-, RAGE- и фибронектин-позитивного материала уменьшилась в 1,6-1,7 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Данные полученные *in vivo* эффекты свидетельствуют, что активность данного 9-бензил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола под шифром DF-5 сопоставима с таковой у известного экспериментального соединения ALT-711 (алагебриум) с доказанным нефропротективным действием. Изучаемое вещество способствовало не только улучшению функциональных параметров, таких как протеинурия и суточный диурез, но и маркеров структурных нарушений, включающих гломерулосклероз и тубулоинтерстициальное повреждение. Все это свидетельствует о целесообразности проведения дальнейших доклинических исследований данного разрывателя сшивок гликированных белков на других экспериментальных моделях с формированием сердечно-сосудистых и нейротропных осложнений сахарного диабета.

Во второй части главы представлены результаты изучения антидиабетической активности соединения AZH-141 при однократном введении интактным животным и при 21-дневном введении животным со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом, находящимся на высокожировой диете, с учетом ранее выявленных у него ингибирующей РТР1В активности и способности активировать АМПК *in vitro*.

Изучаемое вещество AZH-141 при однократном введении в дозе 300 мг/кг в/ж оказывало выраженное гипогликемическое действие сопоставимое с эффектом референтного препарата метформина.

При 21-дневном введении AZH-141 в дозе 30 мг/кг в/ж крысам-самцам со стрептозотоцин-индуцированным диабетом, находящимся на высокожировой диете, мы оценивали изменения следующих показателей: массы тела животных, содержания глюкозы в крови и морфометрических параметров жировой ткани.

Данная экспериментальная модель со смешанным рационом на основе высокожировой диеты и последующей индукцией СД с помощью инъекции стрептозотоцина приводит к увеличению массы тела животных, увеличению площади адипоцитов и постепенному развитию гипергликемии и инсулинорезистентности по рецепторному механизму. За счет увеличения площади адипоцитов происходит уменьшение количества инсулиновых рецепторов на единицу площади (Olefsky J.M. et al. Am. J. Med. 1981. № 1. P. 151-168).

У животных, получавших соединение AZH-141, показана тенденция к снижению массы тела.

При назначении изучаемого вещества AZH-141 наблюдали незначимое снижение общей массы жировой ткани, преимущественно за счет снижения количества эпидидимального жира в 1,8 раза ($p < 0,05$) в сравнении с контролем, а в остальных областях наблюдалась только тенденция к уменьшению количества жировой ткани.

В результате введения исследуемым крысам соединения AZH-141, начиная с 15-го дня и вплоть до окончания исследования, у животных наблюдалось значимое снижение показателей гликемии крови по сравнению с исходными значениями ($p < 0,05$).

На основании полученных данных перорального теста толерантности к глюкозе можно сделать вывод, что для соединения AZH-141 был характерен краткосрочный эффект, отражающийся в статистически значимом понижении уровня глюкозы в крови на 15 минуте. Впоследствии этот эффект нивелировался.

Таким образом, показанные для AZH-141 выраженное антигипергликемическое действие и положительное влияние на параметры жировой ткани крыс оказались сопоставимыми с соответствующим действием препарата сравнения метформина, поэтому перспективным является дальнейшее доклиническое исследование его антидиабетических свойств.

В главе 8 приводится обобщение и обсуждение результатов, полученных в ходе исследования. Проводится интерпретация полученных данных с позиций концепции

привилегированных структур, сравнительной эффективности, а также статистической доказательности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного фармакологического поиска *in vitro* по 10 видам активности были определены наиболее характерные эффекты для изученных четырех классов химических соединений. Так, антиоксидантные, регликирующие, антиагрегантные, РТР1В-ингибирующие и АМПК-активирующие свойства являлись наиболее часто встречаемыми и преобладали над выраженностью других биологических эффектов.

Среди 7 новых линкерных имидазольных и тиазольных производных бифенила наиболее выраженными эффектами, а именно высоким антиагрегантным и умеренным АМПК-активирующим, характеризуется бромид 4,5-диметил-3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазол-3-ил (AZHT-9).

При изучении биологической активности 14 новых линкерных производных, содержащих 2 привилегированные подструктуры – бифенил и неконденсированный (конденсированный) бензимидазол, было выявлено соединения с высоким антиагрегантным действием: гидробромид 1-(2,2-диметиламиноэтил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин (AZH-141) и гидробромид 1-(2-пирролидин-4-ил-этил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин (AZH-136).

Также среди данных гибридных линкерных структур были найдены две молекулы – 9-метил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол (DF-1) и 9-диметиламиноэтил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол (DF-6) – с высокими антиоксидантными свойствами. При последующем изучении механизмов действия данных соединений выявлена их высокая антирадикальная активность на моделях окисления радикала ABTS• и люминол-зависимой хемилюминесценции.

В результате изучения регликирующей активности и способности разрывать сшивки гликированных белков было обнаружено бензильное производное 2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола (DF-5), превосходившее по эффективности вещество сравнения ALT-711. Данное соединение было выбрано к последующему изучению его антидиабетических свойств на модели стрептозотоцин-индуцированного СД *in vivo*. В ходе исследования *in vivo* было отмечено высокое нефрозащитное действие DF-5, сопоставимое с эффектом ALT-711.

В качестве соединений с потенциальной антидиабетической активностью из гибридных производных бифенила и неконденсированного (конденсированного) бензимидазола были выделены 4'-(2,3-дигидро-9*H*-имидазо[1,2-*a*]бензимидазол-9-ил-метил)бифенил-2-карбонитрил (AZH-143) с выраженным активирующим АМПК действием, гидробромид 1-(2,2-диметиламиноэтил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-

илиден-амин (AZH-141) с высокой РТР1В-ингибирующей активностью и умеренной способностью активировать АМПК и бромид 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия (AZH-137) с наибольшим уровнем ингибирования активности РТР1В.

С учетом позитивных характеристик по показателям изменения активности ферментов РТР1В и АМПК, умеренной острой токсичности, а также рассчитанному наиболее высокому значению антидиабетического функционала вещество AZH-141 было выбрано для исследования его антидиабетического эффекта на модели стрептозотоцин-индуцированного СД у крыс, находящихся на высокожировой диете. При этом антигипергликемический эффект и способность снижать массу жировой ткани *in vivo* AZH-141 оказались сопоставимыми с соответствующими эффектами референтного препарата сравнения метформина.

Что касается производных дифенилоксида, как структур, не обладающих свойствами привилегированности, то выявленные для них фармакологические эффекты не отличались значительной выраженностью по сравнению с другими химическими группами.

Полученные результаты позволяют считать создание гибридных молекул на основе производных бифенила и неконденсированного и конденсированного бензимидазола перспективным. Рекомендуется проведение дальнейшего поиска соединений со следующими фармакологическими эффектами: антиагрегантным, регулирующим, антиоксидантным, РТР1В-ингибирующим и АМПК-активирующим среди производных, содержащих комбинацию бифенильной и бензимидазольной подструктур. Для создания гибридных соединений с АТ₁-антагонистической активностью структуры изученных веществ являются недостаточными, и для них требуется введение дополнительных заместителей в бифенильный и азольные фрагменты. Рекомендуется проведение расширенных доклинических исследований антидиабетогенного потенциала соединений под лабораторными шифрами AZH-141 и DF-5.

ВЫВОДЫ

1. Гибридные линкерные производные, содержащие комбинацию бифенильного и азольных фрагментов, а именно 1-диалкиламиноалкил-3-бифенил-2-иминобензимидазолины, 9-замещенные 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы и 9-замещенные 2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы обладают высокой антиоксидантной, регулирующей, антиагрегантной, РТР1В-ингибирующей и АМПК-активирующей активностью.

2. Уровень фармакологической активности зависит от химической структуры изученных соединений:

- в случае антиагрегантной активности от наличия N¹-диметиламиноэтила либо N¹-пирролидиноэтила в структуре 1-диалкиламиноалкил-3-бифенил-2-иминобензимидазолина или метильного радикала в составе C⁴/C⁵-заместителя и атома в C⁴-положении бифенила в C⁴,C⁵-дизамещенной-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазольной основе;

- в случае РТР1В-ингибирующего эффекта от наличия N¹-диметиламиноэтила в структуре 1-диалкиламиноалкил-3-бифенил-2-иминобензимидазолина, или N⁹-диметиламиноэтила либо N⁹-диэтиламиноэтила в N⁹-замещенной 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазольной структуре, или структуры 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия;

- в случае АМРК-активирующей активности от наличия N¹-метила и атома брома в C⁴-положении бифенила либо N¹-винила и атома водорода в C⁴-положении бифенила в структуре N¹-замещенного-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]имидазолия, или N⁹-морфолиноэтила либо N⁹-бутила в структуре N⁹-замещенной 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазольной основы, или базовой структуры в виде 4'-(2,3-дигидро-9*H*-имидазо[1,2-*a*]бензимидазол-9-ил-метил)бифенил-2-карбонитрила;

- в случае регликирующей активности от наличия N⁹-бензила либо N⁹-бутила в N⁹-замещенной 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазольной структуре;

- в случае антиоксидантной активности от наличия N⁹-диметиламиноэтила либо N⁹-метила в структуре N⁹-замещенной 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазольной основы.

3. Комбинация двух привилегированных структур – бифенила и конденсированных азолов – в изученных линкерных гибридных соединениях приводит к повышению частоты встречаемости таких видов активности, как антиоксидантная, регликирующая, антиагрегантная, РТР1В-ингибирующая и АМРК-активирующая.

4. Наиболее активным соединением среди изученных, проявившим свойства разрывателей поперечных сшивок гликированных белков, является 9-бензил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол – DF-5 – с уровнем IC₅₀ превосходящим эффект вещества сравнения ALT-711. Наиболее выраженные антиоксидантные и антирадикальные свойства выявлены для вещества DF-1 (9-метил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол) и соединения DF-6 (9-диметиламиноэтил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол), влияющих преимущественно на активность радикалов люминола, супероксида и ABTS•.

Максимальная антиагрегантная активность показана у вещества AZH-141 (1-(2,2-диметиламиноэтил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин гидробромида) с величиной EC₅₀ достоверно превосходящей ацетилсалициловую кислоту. Наиболее активным соединением среди изученных, проявившим РТР1В-ингибирующий эффект, является AZH-137 – 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия

бромид с уровнем EC_{50} соответствующим веществу сравнения NSC-87877. Уровни активирующего действия в отношении АМПК наиболее активных соединений AZH-143 (4'-(2,3-дигидро-9H-имидазо[1,2-a]бензимидазол-9-ил-метил)бифенил-2-карбонитрил) и DF-4 (9-бутил-2-бифенилимидазо[1,2-a]бензимидазол) соответствуют веществу сравнения AICAR.

5. Величина LD_{50} при в/б введении вещества AZH-137 составила 56,8 мг/кг, AZH-141 – 163,8 мг/кг, DF-6 – 122,3 мг/кг. Соединения в соответствии с классификацией токсичности можно отнести к 3 классу умеренно токсичных соединений.

6. В условиях стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета соединение DF-5 в дозе 12,5 мг/кг при 30-дневном введении оказывает нефрозащитный эффект, по сравнению с контрольной группой снижая количество белка в моче в 2 раза и уровень суточной экскреции белка в 2,5 раза, а также уменьшая выраженность фиброзных изменений в тканях почек и стенках капилляров.

7. На модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета в комбинации с высокожировой диетой соединение AZH-141 в дозе 30 мг/кг при 21-дневном введении оказывает антигипергликемическое действие, снижая показатели гликемии крови с 15-го дня после начала введения по сравнению с исходными значениями, и уменьшает массу эпидидимальной жировой ткани в 1,8 раза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Выявленную в ходе проведенного исследования большую вариабельность в проявлении таких видов фармакологической активности, как антиоксидантная, регулирующая, антиагрегантная, РТР1В-ингибирующая и АМПК-активирующая, гибридных линкерных структур, содержащих два фрагмента, – бифенил и конденсированные азолы, рекомендуется использовать при целенаправленном поиске и синтезе новых высокоактивных веществ.

Задействованный в данной работе подход построения сетевой фармакологической модели рекомендуется применять при прогнозировании и отборе перспективных соединений с иными видами биологической активности для их дальнейших исследований *in vivo*.

Рекомендуется проведение расширенных доклинических исследований антидиабетогенного потенциала соединений под лабораторными шифрами DF-5 и AZH-141.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Spasov, A. A. In vitro method of studying the angiotensin activity of chemical compounds [Текст] / A. A. Spasov, D. S. Yakovlev, T. M. Bukatina, A. A. Brigadirova // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2014. – Vol. 158. – Issue 1. – P. 115–117.

2. Горбунов, Е. А. Перспективные фармакологические мишени для лечения заболеваний, сопряженных с дефектом сигнального пути рецептора инсулина [Текст] / Е. А. Горбунов, **А. А. Бригадирова** [и др.] // Проблемы эндокринологии. – 2015. – Т. 61. – № 6. – С. 44–54.
3. Спасов, А. А. Механизмы подавления ангиотензин II-индуцированного сосудистого спазма изолированной портальной вены крыс *in vitro* [Текст] / А. А. Спасов, Д. С. Яковлев, **А. А. Бригадирова** // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2016. – Т. 102. – № 2. – С. 167–175.
4. Anisimova, V. A. Synthesis and pharmacological activity of 2,9-disubstituted imidazo[1,2-a]benzimidazole phenyl- and alkylthiocarbamides [Текст] / V. A. Anisimova, O. N. Zhukovskaya, A. A. Spasov, V. A. Kuznetsova, V. A. Kosolapov, D. S. Yakovlev, O. A. Solov'eva, D. V. Sorotskii, **A. A. Brigadirova** [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2016. – Vol. 49. – Issue 10. – P. 653–656.
5. Спасов, А. А. Оптимизация методики для изучения регликирующей активности химических соединений *in vitro* [Текст] / А. А. Спасов, А. И. Ращенко, **А. А. Бригадирова** // Вестник ВолгГМУ. – 2016. – Т. 57. – № 1. – С. 30–32.
6. Спасов, А. А. Ангиотензиновые AT₁-рецепторы и их лиганды (обзор) [Текст] / А. А. Спасов, Д. С. Яковлев, **А. А. Бригадирова** // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 51. – № 1. – С. 3–10.
7. Спасов, А. А. Синтез и фармакологическая активность производных 3-феноксibenзойной кислоты [Текст] / А. А. Спасов, Ю. В. Попов, В. С. Лобасенко, Т. К. Корчагина, П. М. Васильев, В. А. Кузнецова, **А. А. Бригадирова** [и др.] // Биоорганическая химия. – 2017. – Т. 43. – № 2. – С. 189–196.
8. Жуковская, О. Н. Поиск фармакологически активных соединений 2-диалкиламинобензимидазолов [Текст] / О. Н. Жуковская, В. А. Анисимова, А. А. Спасов, Д. С. Яковлев, Н. А. Гурова, А. Ф. Кучерявенко, О. А. Салазникова, В. А. Кузнецова, Д. В. Мальцев, **А. А. Бригадирова** [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 51. – № 3. – С. 20–24.

Патенты

1. 9-Бензил-2-бифенилимидазо[1,2-a]бензимидазол и его фармацевтически приемлемые соли, проявляющие свойства разрушителей поперечных сшивок гликированных белков [Текст] : пат. 2627769 Рос. Федерация : С07D487/04, А61К31/4188, А61Р9/00, А61Р43/00 / О. Н. Жуковская, В. А. Анисимова, А. С. Морковник, В. И. Петров, А. А. Спасов, А. И. Ращенко, **А. А. Бригадирова**, Аббас Хайдер Сабри Аббас; заявители и патентообладатели: Фед. гос. авт. образ-ное уч-е. высш. образ-ния «Юж. фед. унив.», фед.

гос. бюджет. образ-ное уч-е. высш. образ-ния «Волгогр. гос. мед. унив.» Минздрава РФ – № 2016142566; заявл. 28.10.2016; опубл. 11.08.2017, Бюл. – № 23. – 9 с.

Статьи в иных журналах и сборниках материалов конференций

1. Бригадирова, А. А. Метод изучения АТ₁-антагонистической активности *in vitro* [Текст] / **А. А. Бригадирова** // Мат. 71-й откр. науч-практ. конф. молод. ученых и студ-в ВолгГМУ с межд. уч-ем. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2013. – С. 261.

2. Бригадирова, А. А. Оптимизация методики для изучения ангиотензиновой активности химических соединений *in vitro* [Текст] / **А. А. Бригадирова** // Сб. мат. IV Всеросс. науч. конф. студ-в и аспи-в с межд. уч-ем. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2014. – С. 412–415.

3. Бригадирова, А. А. Изучение АТ₁-антагонистической активности новых производных азола и индола [Текст] / **А. А. Бригадирова**, Д. С. Яковлев, А. А. Спасов, В. А. Анисимова // «Белорусские лекарства» : мат. Междунар. науч.-практ. конф. – Минск, Изд-во: Белорусский дом печати, 2014. – С. 31–32.

4. Бригадирова, А. А. Роль кальциевых каналов и потенциал-зависимых натриевых каналов в индукции АТ II-опосредованного ответа изолированной портальной вены крыс *in vitro* [Текст] / **А. А. Бригадирова** // XIX Рег. конф. мол. исс-лей Волгог. обл.: тез. докл. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2014. – С. 17–19.

5. Спасов, А. А. Механизмы подавления ангиотензин II-индуцированного сосудистого спазма [Текст] / А. А. Спасов, Д. С. Яковлев, **А. А. Бригадирова**, Д. В. Мальцев // Сб. статей VII межд. науч-практ. конф. – СПб.: Изд-во Политехнического университета, 2014. – С. 95–97.

6. Бригадирова, А. А. Влияние кальциевого тока на выраженность ангиотензинового спазма изолированной портальной вены крыс *in vitro* [Текст] / **А. А. Бригадирова** // Мат. 73-й откр. науч-практ. конф. молод. ученых и студ-в ВолгГМУ с межд. уч-ем, посв. 80-летию ВолгГМУ. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2015. – С. 315–316.

7. Бригадирова, А. А. Изучение вазоактивных свойств нового производного бифенила [Текст] / **А. А. Бригадирова** // XX Рег. конф. мол. исс-лей Волгог. обл.: тез. докл. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2016. – С. 10–12.

8. Спасов, А. А. АТ₁-блокирующая активность в ряду бифенилсодержащих бензимидазолов [Текст] / А. А. Спасов, **А. А. Бригадирова**, Д. С. Яковлев // Фармация и фармакология. – 2015. – № 5s. – С. 102–103.

9. Бригадирова, А. А. Антиоксидантная и антиагрегантная активность ряда производных дифенилимидазо[1,2-а]бензимидазола [Текст] / **А. А. Бригадирова** // Мат. 74-й

откр. науч-практ. конф. молод. ученых и студ-в ВолгГМУ с межд. уч-ем. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2016. – С. 254.

10. Яналиева, Л. Р. Консенсусный поиск разрывателей поперечных сшивок гликированных белков в ряду производных азотсодержащих гетероциклов [Текст] / Л. Р. Яналиева, В. В. Ворфоломеева, **А. А. Бригадирова** // Мат. 74-й откр. науч-практ. конф. молод. ученых и студ-в ВолгГМУ с межд. уч-ем. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2016. – С. 258–259.

11. Джимбеева, Д. А. Антиагрегантные свойства новых производных бифенила [Текст] / Д. А. Джимбеева, **А. А. Бригадирова**, А. С. Нагих // Мат. 74-й откр. науч-практ. конф. молод. ученых и студ-в ВолгГМУ с межд. уч-ем. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2016. – С. 263.

12. Жуковская, О. Н. Фармакологические свойства соединений, содержащих две привилегированные подструктуры – дифенил и бензимидазол [Текст] / О. Н. Жуковская, Д. С. Яковлев, **А. А. Бригадирова** // XX Менд. съезд по общ. и прикл. химии. В 5 т. Т. 4: тез. докл. – Екатеринбург: Уральское отделение Российской академии наук, 2016. – С. 495.

13. Яналиева, Л. Р. Консенсусный поиск разрывателей поперечных сшивок гликированных белков [Текст] / Л. Р. Яналиева, П. М. Васильев, **А. А. Бригадирова** [и др.] // XX Менд. съезд по общ. и прикл. химии. В 5 т. Т. 4: тез. докл. – Екатеринбург: Уральское отделение Российской академии наук, 2016. – С. 580.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

5-НТ – 5-гидрокситриптамин (серотонин)

5-НТ_{2A/3} – 2A/3 типы серотонинового рецептора

АДФ – натриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты

АТ – ангиотензин

АТ₁ – ангиотензиновый рецептор 1-го типа

БСА – бычий сывороточный альбумин

в/б – внутрибрюшинно

в/ж – внутривентрикулярно

ДПП-4 – дипептидилпептидаза-4

ДФПГ – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СД – сахарный диабет

ABTS – 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота)

AGEs – конечные продукты гликирования

AICAR – 5-аминоимидазол-4-карбоксамида 1-β-D-рибофуранозид

АМРК – АМФ-активируемая протеинкиназа

EC₅₀ – полумаксимальная эффективная концентрация

HbA_{1c} – гликированный гемоглобин

IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования

LD₅₀ – доза, вызывающая гибель 50% животных

PPARγ – Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PTP1B – протеинтирозинфосфатаза 1B

RAGE – рецепторы конечных продуктов гликирования

БРИГАДИРОВА АНАСТАСИЯ АНДРЕЕВНА

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
БИФЕНИЛА**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук