

ФГБОУ ВО ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Ленская Карина Владимировна

**ЦИКЛИЧЕСКИЕ ГУАНИДИНЫ - НОВЫЙ КЛАСС
ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИХ СРЕДСТВ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научные консультанты:
академик РАН, З.Д.Н. РФ,
профессор, доктор медицинских наук,
А.А. Спасов
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
П.М. Васильев

Волгоград, 2017

Введение.....	7
Глава 1. Гипогликемический потенциал циклических гуанидинов (Обзор литературы).....	15
1.1. Современные фармакотерапевтические подходы к лечению сахарного диабета второго типа.....	16
1.2. Новые подходы к поиску и созданию антидиабетических средств.....	24
1.3. Циклические гуанидины - новый класс гипогликемических средств.....	26
1.4. Разработка лекарственных веществ методами <i>in silico</i>	34
1.5. Заключение.....	40
Глава 2. Виртуальный скрининг гипогликемической активности среди новых производных циклических гуанидинов.....	41
2.1. Материалы и методы исследования.....	48
2.2. Перспективность производных циклических гуанидинов как источников веществ с гипогликемической активностью (анализ <i>in silico</i>).....	59
2.2.1. Прогноз в системе PASS наличия противодиабетической активности производных циклических полных гуанидинов.....	59
2.2.2. Прогноз в ИТ «Микрокосм» наличия гипогликемической активности производных циклических гуанидинов.....	60
2.2.3. Прогноз в ИТ «Микрокосм» уровня гипогликемической активности производных циклических гуанидинов.....	62
2.2.4. Подструктурный анализ перспективности различных классов циклических полных гуанидинов.....	68
2.2.5. Оценка перспективности различных классов циклических полных гуанидинов методами медианного и супремально оценивания.....	71
2.2.6. Консенсусный анализ перспективности различных классов циклических полных гуанидинов.....	74
2.2.7. Анализ перспективности различных классов циклических гуанидинов.....	77

2.3. Планирование экспериментального скрининга гипогликемических производных циклических гуанидинов различных классов.....	80
2.4. Заключение.....	87

Глава 3. Поиск соединений, оказывающих гипогликемическое действие среди новых производных циклических гуанидинов.....	90
---	----

3.1. Материалы и методы исследования.....	91
3.2. Влияние новых производных циклических гуанидинов на уровень глюкозы в крови интактных животных.....	93
3.2.1. Влияние производных 2-аминобензимидазола на уровень сахара в крови белых беспородных крыс.....	94
3.2.2. Влияние производных 2-иминобензимидазола на уровень сахара в крови белых беспородных крыс.....	96
3.2.3. Влияние производных N ⁹ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-a] бензимидазола на уровень сахара в крови интактных животных.....	99
3.2.4. Влияние производных пиримидобензимидазолов на уровень сахара в крови на интактных животных.....	102
3.2.5. Влияние производных N ⁹ -имидазобензимидазолов на уровень сахара в крови на интактных животных.....	105
3.2.6. Влияние производных N ¹ -дигидроимидазобензимидазолов на уровень сахара в крови на интактных животных.....	107
3.3. Влияние новых производных циклических гуанидинов на уровень глюкозы в крови животных со стрептозотоциновым диабетом.....	109
3.4. Заключение.....	111

Глава 4. Зависимость гипогликемической активности от химической структуры физико-химических свойств.....	113
--	-----

4.1. Материалы и методы исследования.....	113
---	-----

4.2. Выявление методами <i>in silico</i> соединения-лидера – нового производного циклических гуанидинов с высокой гипогликемической активностью.....	124
4.2.1. Подструктурный анализ влияния заместителей на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов.....	124
4.2.2. Частотный анализ влияния физико-химических параметров на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов.....	126
4.2.3. Фармакофорный анализ в ИТ «Микрокосм» производных циклических гуанидинов с высокой гипогликемической активностью.....	128
4.2.4. Анализ показателей ADME новых производных циклических гуанидинов с высокой гипогликемической активностью.....	130
4.3. Заключение.....	136
Глава 5. Антидиабетогенные свойства соединения диабенол.....	138
5.1. Материалы и методы исследования.....	138
5.2. Изучение антидиабетогенных свойств субстанции и гранулята таблеток диабенола при однократном введении.....	140
5.3. Изучение антидиабетогенных свойств субстанции и гранулята таблеток диабенола при курсовом введении.....	142
5.4. Воздействие диабенола на толерантность к глюкозной нагрузке.....	143
5.5. Влияние диабенола на содержание аланина в крови крыс при введении субстанции и гранулята таблеток диабенола.....	146
5.6. Влияние диабенола на содержание гликозилированного гемоглобина.....	147
5.7. Заключение.....	149

Глава 6. Изучение механизма антидиабетогенного действия диабенола у крыс со стрептозотоциновым диабетом.....	151
6.1 Материалы и методы исследования.....	153
6.2. Компьютерный прогноз <i>in silico</i> механизма действия диабенола.....	159
6.3. Влияние субстанции на С-пептид при экспериментальном сахарном диабете.....	164
6.4. Влияние диабенола на активность дипептидилпептидазы 4.....	165
6.5. Морфологические изменения эндокринного аппарата поджелудочной железы под воздействием диабенола.....	168
6.6. Влияние субстанции и гранулята таблеток на показатели углеводного обмена при экспериментальном сахарном диабете.....	170
6.6.1. Влияние диабенола на содержание гликогена в печени.....	170
6.6.2. Влияние диабенола на скорость гликогенолиза.....	172
6.6.3. Влияние диабенола на скорость гликолиза.....	174
6.6.4. Действие диабенола на всасывание углеводов в кишечнике.....	177
6.6.5. Влияние диабенола на активность гликогенфосфорилазы.....	179
6.6.6. Влияние диабенола на ингибирование α -глюкозидазы.....	180
6.6.7. Влияние диабенола на антигликирующую активность.....	180
6.6.8. Влияние диабенола на антигликирующую активность.....	181
6.7. Заключение.....	183
Глава 7. Изучение влияния диабенола на свертываемость крови и гемореологические свойства у крыс со стрептозотоциновым диабетом.....	185
7.1. Материалы и методы исследования.....	185
7.2. Влияние диабенола на агрегацию тромбоцитов.....	187
7.3. Действие диабенола на вязкость крови.....	189
7.4. Действие диабенола на осмотическую резистентность эритроцитов.....	191
7.5. Заключение.....	192
Обсуждение результатов.....	193

Выводы.....	220
Список литературы.....	222
Список сокращений.....	259
Приложение.....	260

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 плейотропность 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.

ГЛАВА 1. ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЦИКЛИЧЕСКИХ ГУАНИДИНОВ

Распространенность сахарного диабета (СД) как в мире, так и в России носит характер эпидемии. Создание регистра больных СД, проведение контрольно-эпидемиологических исследований (Сабанов В. И., 2012) позволяют получать объективную информацию об эпидемиологической ситуации в отношении СД и его осложнений, прогнозировать его распространенность. Сахарный диабет типа 2 (СД 2) представляет собой серьезную медико - социальную проблему, значимость которой обусловлена его высокой распространенностью, сохраняющейся тенденцией к росту числа больных, хроническим течением (Manna R., 1991), высоким уровнем инвалидизации (Li F., 2005) и смертности больных (Хиллсон Р., 2000) в результате развития поздних сосудистых осложнений (микро-, макроангиопатии) (Подачаина С. В., 2015; Li J., 2012; Lorenzi M., 2007; Благосклонная Я. В., 2001), а также необходимостью создания системы специализированной помощи больным (Дедов И.И., 2008; Ray К.К., 2009). Не менее тревожным является и тот факт, что СД 2 занимает третье место среди непосредственных причин смерти после сердечно – сосудистых и онкологических заболеваний (Аметов А.С., 2006; Niskanen L, 1998). По статистическим данным, каждые 6–7 пациентов из 10 погибают от макроангиопатических осложнений диабета (Дедов И.И., 2008; Stratton JM, 2000). Причем, наряду с распространенностью СД 2 нарастают и социально– экономические потери, связанные с развитием тяжелых осложнений (Manson JE, 1991; Stratton JM, 2000; Дедов И.И., 2003; Capasso G., 2006; Lue L. F., 2009). Как известно, причиной развития и прогрессирования осложнений заболевания является именно хроническая гипергликемия (Niskanen L, 1998). В отношении эффективного контроля СД 2 существуют убедительные доказательства, свидетельствующие, что улучшение гликемического контроля может значительно уменьшить риск развития как микро– , так и макроангиопатии [Дедов И.И., 2003]. Исходя из этого, основной целью лечения болезни является как можно более полная компенсация нарушений углеводного обмена (Аметов А.С., 2006). Следует отметить, что за прошедшие 10

лет цели лечения СД кардинально изменились. До недавнего времени доминирующая цель терапии диабета заключалась лишь в устранении симптомов гипергликемии, таких как жажда, полиурия, слабость. В настоящее время эффективное ведение больных с СД направлено на предохранение β -клеток поджелудочной железы от истощения, создание оптимального баланса глюкозы в организме, предотвращение и/или замедление прогрессирования как микро-, так и макрососудистых осложнений (Аметов А.С., 2006).

1.1. Современные фармакотерапевтические подходы к лечению сахарного диабета второго типа.

В основе развития сахарного диабета типа 2 лежат три основных эндокринных дефекта: нарушение секреции инсулина, инсулинорезистентность жировой и мышечной тканей и инсулинорезистентность печени (Дедов И.И., 2003). Резистентность к инсулину может уменьшаться в результате снижения процента жира в организме и/или фармакотерапии гипергликемии, однако она редко восстанавливается до нормальной. Секреция инсулина у этих больных неполноценна и недостаточна для того, чтобы компенсировать инсулинорезистентность (Аметов А.С., 2006; Дедов И.И., 2008).

Развитие сахарного диабета второго типа по И.И. Дедову и М.И. Балаболкину (2006) можно представить в виде процесса, который протекает в следующие фазы:

1 фаза – наличие первичной инсулинрезистентности (снижение чувствительности тканей к инсулину) и других генетически обусловленных нарушений, способствующих снижению действия инсулина;

2 фаза – адаптация аппарата поджелудочной железы к повышенной потребности в инсулине, позволяющая обеспечить образование инсулина в таком количестве, которое необходимо для преодоления имеющейся инсулиновой резистентности. Это сопровождается нормализацией состояния углеводного обмена и увеличением (гиперплазией) β – клеток островкового аппарата, в которых синтезируется инсулин;

3 фаза – умеренная декомпенсация островкового аппарата поджелудочной железы, проявляющаяся в изменении уровня глюкозы в крови натощак и /или нарушении толерантности к глюкозе. Это состояние обозначают как преддиабет;

4 фаза – выраженная декомпенсация β – клеток островкового аппарата поджелудочной железы, сопровождающаяся клинической манифестацией (симптомами) сахарного диабета. При этом существует возможность компенсации диабета при помощи диеты и сахароснижающих лекарственных препаратов;

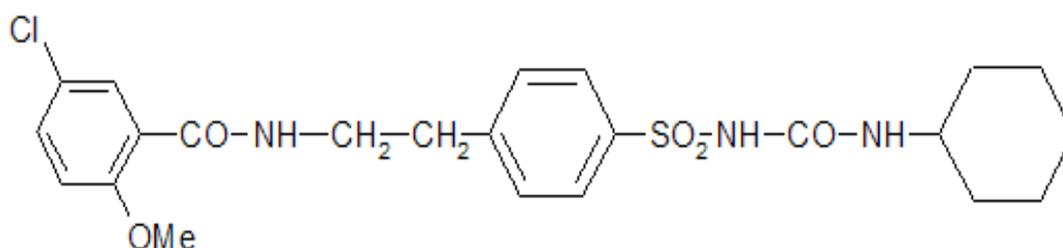
5 фаза – декомпенсация, сопровождающаяся структурными изменениями β – клеток и недостаточностью секреции инсулина. При этом за счет лечения пероральными глюкозоснижающими препаратами невозможно добиться компенсации сахарного диабета, что диктует необходимость введения инсулина. В результате возникает инсулинпотребный диабет второго типа.

Препараты для фармакологической коррекции сахарного диабета типа 2, используемые в клинике в настоящее время, представлены следующими группами: секретогены инсулина (производные сульфонилмочевины), ингибиторы α -глюкозидаз (акарбоза), постпрандиальные регуляторы секреции инсулина, бигуаниды (метформин) (Бернштейн Л. М., 2010), сенситайзеры инсулина (Minoura Н., 2004) (розиглитазон, пиоглитазон) (Rahbar S.,2000; Rahbar S., 2003), инкретиномиметики, ингибиторы ДПП-4 (Дедов И.И., 2008)

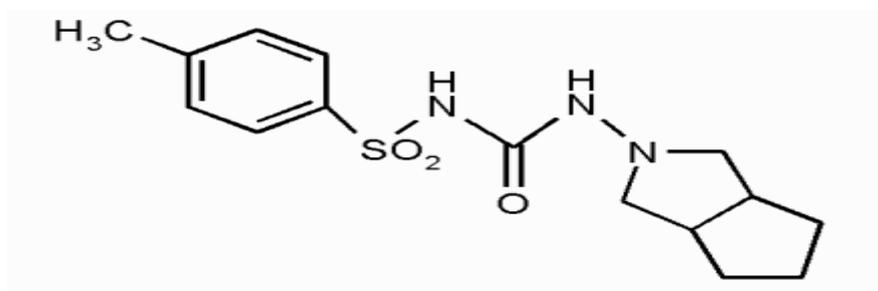
Пероральные сахароснижающие препараты — применяются для стимуляции секреции β - клетками поджелудочной железы дополнительного инсулина, с целью восстановление нормальной концентрации глюкозы в крови. Существует несколько групп, различающихся как по химической структуре, так и по механизмам действия и побочным эффектам (Аметов А.С., 2006).

Гипогликемические свойства у производных сульфонилмочевины были найдены случайно. Способность соединений этой группы оказывать гипогликемическое действие была обнаружена в 50-х годах, когда у больных, получавших антибактериальные сульфаниламидные препараты для лечения инфекционных заболеваний, было отмечено понижение содержания глюкозы в крови. В связи с этим начался поиск производных сульфаниламидов с выраженным

гипогликемическим эффектом и в 50-е гг. был осуществлен синтез первых производных сульфонилмочевины, которые можно было применять для лечения сахарного диабета. Первыми такими препаратами были карбутамид (Германия, 1955 г.) и толбутамид (США, 1956 г.). В начале 50-х гг. эти производные сульфонилмочевины начали применяться в клинической практике. В 60–70-х гг. появились препараты сульфонилмочевины II поколения. Первый представитель препаратов сульфонилмочевины второй генерации — глибенкламид — начал применяться для лечения сахарного диабета в 1969 г., в 1970 г. начали использовать глиборнурид, с 1972 г. — глипизид. Почти одновременно появились гликлазид и гликвидон.



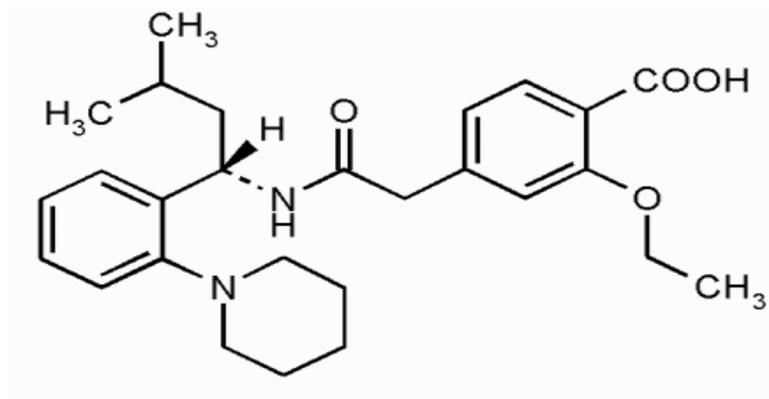
Глибенкламид



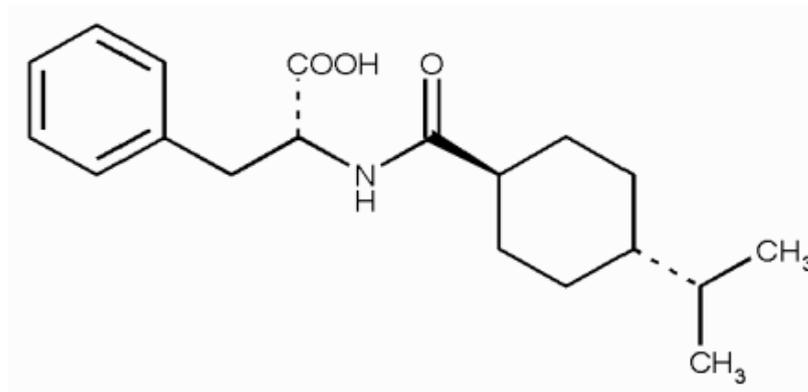
Гликлазид

По механизму действия они представляют собой секретогены инсулина. За счет того, что эти препараты усиливают секрецию инсулина, при их передозировке усиливают аппетит, что приводит к увеличению массы тела (Riddle M. C., 2004; Cheng A. Y., 2005). Препараты этой группы могут вызывать гипогликемию. Возможны проявления со стороны желудочно–кишечного тракта в виде тошноты, редко рвоты, диареи или запоров. Иногда встречаются аллергические реакции в виде крапивницы и зуда. Возможно развитие анемии обратимого характера (Корпачева-Зиных О.В., 2014)

В 1997 г. для лечения сахарного диабета был разрешен репаглинид (группа меглитинидов) (Abrahamson С., 2013). Несульфонилмочевинные препараты по механизму действия относят к секретогенам инсулина. По химической структуре их подразделяют на производные бензойной кислоты – репаглинид и производные фенилаланина – метиглитинид и натеглинид (Cristina Mega, 2014).



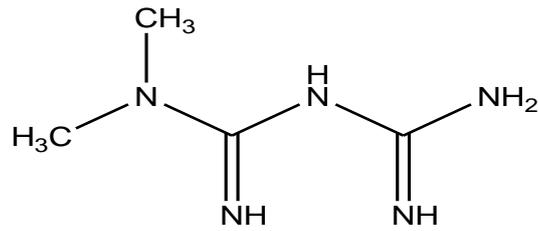
Репаглинид



Натеглинид

Из побочных эффектов наиболее выражены проявления со стороны желудочно-кишечного тракта в виде тошноты, редко рвоты, диареи или запоров. Иногда отмечаются аллергические реакции в виде крапивницы и зуда. Редко препараты этой группы могут вызывать гипогликемию. Возможно увеличение массы тела на фоне приема препаратов и развитие привыкания к меглитинидам (Cristina Mega, 2014).

Метформин – один из представителей пероральных сахароснижающих средств, относящийся к группе бигуанидов.



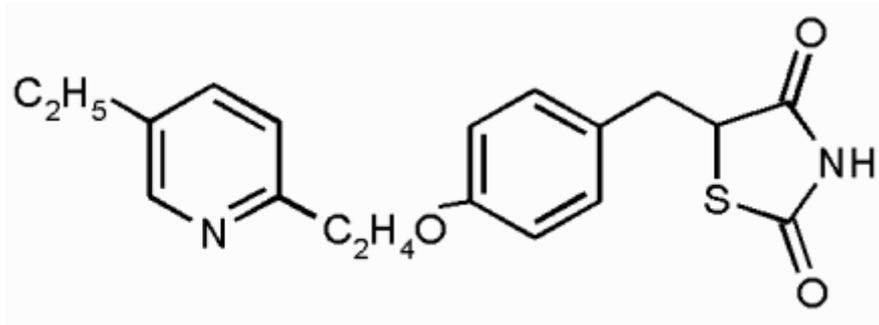
Французский врач и фармаколог Жан Стерне (Jean Sterne) были ключевой фигурой в создании метформина - диметилбигуанидина в 1950-х годах. Его результаты были опубликованы в 1957 г. и были основаны на исследованиях сахароснижающей способности бигуанидов. Несмотря на то, что клинически применялось несколько бигуанидов, испытание временем выдержал только один и он расценивается как оплот терапии сахарного диабета 2 типа. С 2005 года метформин является препаратом первой линии фармакологического вмешательства при сахарном диабете 2 типа (СД 2) в рекомендациях Международной диабетической федерации (International Diabetes Federation — IDF), с 2006 — препаратом первой линии совместно с нефармакологическим лечением СД 2 в рамках рекомендаций Американской и Европейской ассоциаций диабетологов (ADA и EASD). С 2007 года метформин — единственный препарат в медикаментозной профилактике развития СД 2 в рекомендациях ADA.

Основным в механизме действия метформина является уменьшение продукции глюкозы печенью, что, по данным многочисленных исследований, коррелирует со снижением уровня гликемии (Widen E.I., 1992). Метформин играет роль в улучшении периферических эффектов инсулина (Riccio A., 1991), снижении глюконеогенеза (Johnson A.V., 1993) и окислении свободных жирных кислот в печени, повышении активности анаэробного пути метаболизма глюкозы с образованием лактата, подавлении липолиза (Widen E.I., 1992). В ряде исследований, проводимых *in vivo* и *in vitro* выявлено активирующее влияние метформина на клеточный фермент АМФ-киназу (Steinberg G.R., 2009), которая играет роль в переносе глюкозы через мембрану посредством GLUT4 и окислении свободных жирных кислот. Вероятно, улучшение гликемического профиля на фоне

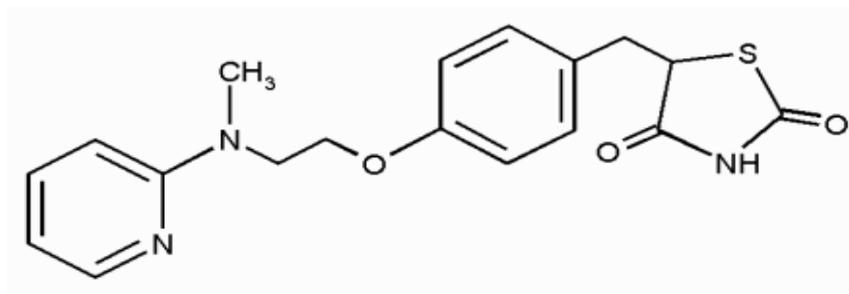
терапии данным препаратом также связано с подобными клеточными аспектами механизма его действия. Кроме того, диметил- бигуанид продемонстрировал способность уменьшать жесткость клеточных мембран, которая часто наблюдается у пациентов с сахарным диабетом и может вносить вклад в развитие его осложнений. Метформин выдержал испытание временем.

С момента открытия метформина прошло 50 лет, но в последнем десятилетии получено множество доказательств и разработаны рекомендации по применению метформина в качестве первой линии терапии лиц с впервые диагностированным сахарным диабетом 2 типа, либо имеющих высокий риск развития этого заболевания.

К производным тиазолидиндионов относят пиоглитазон и розиглитазон.



Пиоглитазон

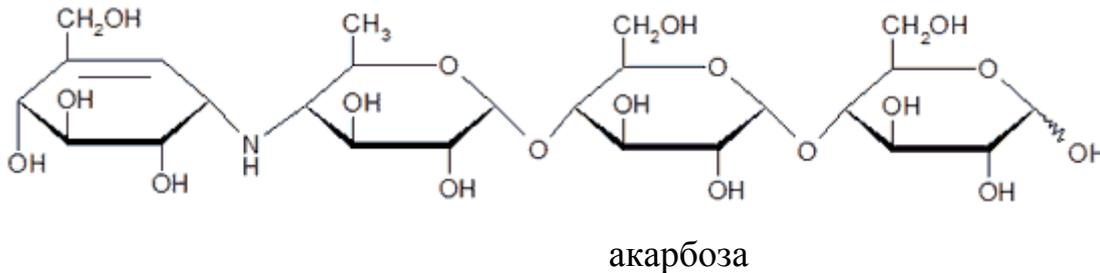


Росиглитазон

По механизму действия они представляют собой сенситайзеры инсулина (Лукьянчиков В. С., 2009). Прием тиазолидиндионов может способствовать увеличению массы тела. Сердечная недостаточность чаще развивается при сочетании тиазолидиндионов с другими сахаропонижающими препаратами, в том числе и с инсулином (Лукьянчиков В. С., 2009). При монотерапии тиазолидиндионами или инсулином риск возникновения сердечной

недостаточности очень мал – менее 1%, а при их сочетании риск возрастает до 3%. Возможно развитие анемии в 1– 2% случаев (Ikeda H., 2000).

Следующий представитель пероральных гипогликемических средств - акарбоза, которых по химической структуре относят к псевдотетрасахаридам.



Механизм действия связан с ингибированием α - глюкозидазы.

Возможны различные нарушения со стороны желудочно– кишечного тракта – тошнота, рвота, вздутие живота. При употреблении углеводов есть вероятность развития метеоризма на фоне приема препарата. Возможны аллергические реакции – крапивница, зуд, а также появление отеков (Демидова И.Ю., 2003).

Инкретиномиметики – гормоны, вызывающие стимуляцию секреции инсулина после перорального приема глюкозы (Аметов А.С., 2010). Наиболее важным и хорошо изученным представителем инкретинов является глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) (Thompson A., 2013; Madsen P., 2009; Шестакова М. В., 2007; Chen D., 2007; Qureshi S. A., 2004). В настоящее время в клинической практике для лечения сахарного диабета 2 типа используется инкретиномиметик - эксенатид, в стадии заключительной фазы клинических исследований - аналог GLP-1- лираглутид (Саприна Т. В., 2011). Терапия такими препаратами является патогенетической, так как направлена на восстановление естественных физиологических механизмов регуляции уровня глюкозы (Holst J.J., 2004; Su H., 2008). В ряде исследований было показано, что аналог GLP-1 вызывал снижение уровня глюкагона в циркулирующей крови, увеличение массы β -клеток поджелудочной железы, улучшение секреции инсулина, уменьшение аппетита - наряду с достижением хорошего гликемического контроля. Достаточно частым

побочным эффектом применения некоторых препаратов является тошнота (Barker H. A., 1960) .

Следующая группа – ингибиторы ДПП-4 (глиптины) (Ghatak, S.B.,2011; Grzeszczak W., 2011).

Эти препараты способствуют замедлению деградации эндогенного GLP-1, что позволяет преодолеть некоторые проблемы, связанные с клиническим применением аналогов GLP-1, прежде всего, отсутствие пероральных форм (DPUcken D.J., 2006). Кроме того, защита эндогенного GLP-1 от деградации сможет увеличить его способность снижать постпрандиальную гипергликемию. Такие препараты показаны к применению у пациентов с сахарным диабетом типа 2 в качестве монотерапии, в комбинации с метформином или тиазолидиндионами. У них отмечен существенный гипогликемизирующий эффект в сочетании с низкой частотой развития гипогликемий; на фоне лечения наблюдается также уменьшение массы тела.

Учитывая, что патология сахарного диабета второго типа носит мозаичный характер, очень часто применяют комбинированную терапию. Ни один современный препарат не дает полного, 100%, выздоровления или снижения симптоматики СД типа 2 (Сунцов Ю. И., 2012). Кроме того, каждый из них обладает большим количеством побочных эффектов, которые негативно сказываются на здоровье пациентов. Поэтому в настоящее время ведется поиск новых мишеней для создания препарата с оригинальным механизмом действия и минимальным количеством побочных явлений. Широкая распространенность сахарного диабета и многообразие патогенетических вариантов данного заболевания, обуславливает актуальность поиска и разработки новых пероральных противодиабетических препаратов (Brownlee M., 2001; Brownlee M., 2005). В последнее время при терапии инсулиннезависимого СД предпочтение отдается средствам, способным не только компенсировать диабет, но и задерживать развитие и прогрессирование его осложнений (Robertson R. P., 2004). В комплексной терапии с этой целью используют реокорректоры, антиоксиданты и другие группы лекарственных средств. Тем не менее, для ряда препаратов выбора

имеются существенные ограничения в использовании, из-за риска развития побочных эффектов. В связи с этим, в настоящее время, поиск новых веществ, способных не только регулировать гомеостаз глюкозы, но и предупреждать риск возникновения осложнений СД, является актуальным и имеет перспективность (Сунцов Ю. И., 2012).

1.2. Новые подходы к поиску и созданию антидиабетических средств.

Современные течения поиска гипогликемических средств включают в себя несколько направлений:

Нормализация механизмов биологического действия инсулина и снижение инсулиновой резистентности (Мкртумян А.М., 2008).

Восстановление нормальной функции механизмов, регулирующих секрецию инсулина (Аметов А.С., 2010).

Угнетение скорости образования глюкозы печенью (Балаболкин М. И., 2002).

Разработка соединений, применяемых для терапии и профилактики поздних осложнений (Дедов И. И., 2010).

Ингибирование апоптоза и стимулирование регенерации поджелудочной железы (Bredesen N., 1994; Yonemura Y., 1984).

Нормализация механизмов биологического действия инсулина и снижение инсулиновой резистентности.

К основным мишеням для нормализации биологического действия инсулина и снижения инсулиновой резистентности относят: ИВК-киназу; ингибиторы фосфодиэстеразы (Senzaki H., 2001; Rybalkin S. D., 2003); ингибиторы протеинкиназы С; белковые тирозин-фосфатазы (PTPS); δ диаглицеролкиназу – (DAG); агонисты β_3 -адренорецепторов; антагонист α_2 -адренорецепторов; высокоселективные PPAR γ -агонисты (Levien T.L., 2010).

Восстановление нормальной функции механизмов, регулирующих секрецию инсулина.

Для восстановления нормальной функции механизмов, регулирующих секрецию инсулина можно использовать каннабиноидные рецепторы (CB1) и ингибиторы глюкозы-6-фосфатазы (Ranganath L.R., 2008).

Соединения, снижающие продукцию глюкозы печенью.

Перспективными направлениями создания новых лекарственных препаратов для терапии сахарного диабета является регуляция ключевых ферментов углеводного обмена, активация ферментов гликолиза и синтеза гликогена (гликогенсинтазы, гексокиназы, фосфофруктокиназы, пируваткиназы) и ингибирование ферментов глюконеогенеза и гликогенолиза (гликогенфосфорилазы, фруктозобифосфатазы, фосфоенолпируваткарбоксилазы) (Martin W. H., 1998; Somsak L., 2003; Wu C., 2005).

Соединения, применяемые для терапии и профилактики поздних осложнений

Создание препаратов для терапии и профилактики сахарного диабета (Молитвослова Н. А., 2009) должно быть направлено на коррекцию следующих четырех метаболических путей, активируемых при гипергликемии: ингибирование полиолового метаболизма глюкозы, снижение формирования конечных продуктов гликозилирования (КПГ) и их патологической роли, блокирование протеинкиназы С и гексозаминового пути (Балаболкин, М.И., 2002).

На различных этапах клинических испытаний находятся два новых ингибитора альдозоредуктазы, фидаретраст и раниретраст (Cumbie B.C., 2007; Fleming A., 2007).

Соединения, ингибирующие апоптоз и стимулирующие регенерацию поджелудочной железы.

Токсическое действие высоких концентраций глюкозы связано с десенситизацией β -клеток, снижением высвобождения, а затем синтеза и депонирования инсулина. Данные изменения связаны со снижением экспрессии гена инсулина и связаны с дефектом посттранскрипционного созревания мРНК PDX-1. Ингибирование сигнального пути инсулина/инсулиноподобного ростового фактора следующее за снижением экспрессии транскрипционного фактора PDX-1 основной механизм индукции апоптоза β -клеток (Fujimoto K., 2009).

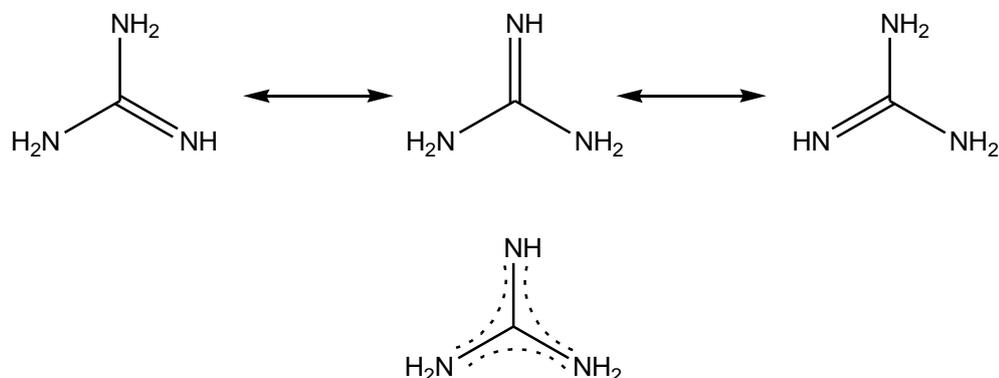
Группа новых мишеней противодиабетических средств

Существует группа перспективных мишеней, которую начали изучать совсем недавно, поэтому экспериментальных данных практически нет (антагонист меланокортина, агонист соматостатина, модулятор цитокина, ингибитор реакции Мэйлорда, ингибитор Na^+ /глюкозного котранспортера, ингибитор карнитин-пальмитил-трансферазы (Jabbour S.A., 2009; Norton L., 2010; Chao E.A., 2010).

1.3. Циклические гуанидины – новый класс гипогликемических веществ

Открытие ряда новых патофизиологических звеньев сахарного диабета создает благоприятную возможность в создании высокоэффективных и безопасных антидиабетических средств, поскольку обнаружение препарата с несколькими механизмами действия на каскад метаболических нарушений (Huijberts M. S. P., 2008; Верткин А. Л., 2008) позволит обеспечить максимальную компенсацию сахарного диабета.

Производные гуанидина были одними из первых базовых структур лекарственных веществ, для производных которых были обнаружены сахаропонижающие свойства. Химическая структура гуанидина отличается тем, что в нее входит три атома азота, каждый из которых поставляет в общую электронную систему гуанидина два электрона, в целом гуанидиновая молекула является сопряженной и имеет очень лабильное общее электронное облако. Эти свойства гуанидина придают ему способность связываться с различными видами биологически релевантных биомишеней и вызывать различные фармакологические эффекты.



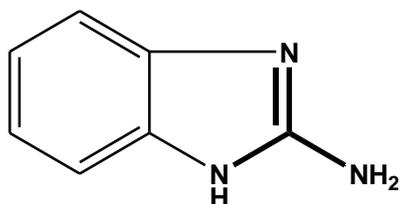
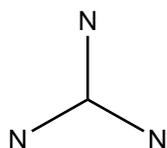
Нециклические производные гуанидина обладают достаточной конформационной подвижностью, что приводит к тому, что незначительное изменение химической

структуры может вызвать изменение фармакологических свойств, вплоть до полного его исчезновения. С другой стороны, фрагмент гуанидина можно жестко зафиксировать в пространстве, если встроить его в циклическую систему. Подбирая те или иные заместители для циклических гуанидинов, можно регулировать распределение электронной плотности в гуанидиновом фрагменте и тем самым избирательно регулировать наличие и уровень фармакологической активности, в том числе и антидиабетической.

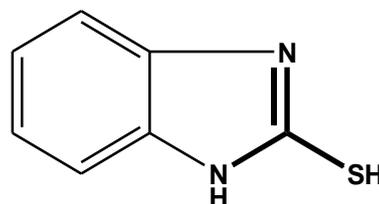
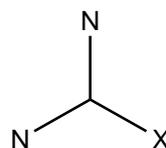
Таким образом, на сегодняшний день одним из современных направлений поиска гипогликемических средств являются циклические гуанидины (Valerie A., 2000; Scott D. Larsen., 2001; Fumiyoshi Ishikawa., 1978). По данным литературы (Brotner A. et al., 1977; Howell S.L. et al., 1982; Owen O. E. , 1985; Caprio S. et al., 1984; Amstutz I. et al., 1997; Suzuki T. et al., 2000) и результатам проведенных ранее исследований (Спасов А.А., 1983; Островский О.В., 1995), соединения этого химического ряда проявляют гипогликемические, антиоксидантные (Bottino R., 2004) антиагрегантные свойства и стимулируют фибринолиз. Поэтому поиск потенциальных противодиабетических препаратов с комбинированным механизмом действия среди производных циклических гуанидинов является достаточно обоснованным и целесообразным. Направленный поиск позволит найти активные вещества среди новых производных циклических гуанидинов, которые в дальнейшем могут войти в состав нового лекарственного препарата для лечения сахарного диабета типа II.

В зависимости от числа атомов азота, находящихся в гуанидиновом фрагменте, производные гуанидина можно разделить на две группы: полные гуанидины – в гуанидиновом фрагменте присутствует все три атома азота, и неполные гуанидины – один из атомов азота гуанидинового фрагмента заменен другим гетероатомом, например, кислородом или серой. Такие изоэлектронные аналоги гуанидина, как известно, являются его биоизостерами (Зефилов Н.С., 2010).

Полные гуанидины

1*H*-бензо[*d*]имидазол-2-амин

Неполные гуанидины

1*H*-бензо[*d*]имидазол-2-тиол

Полные и неполные гуанидины

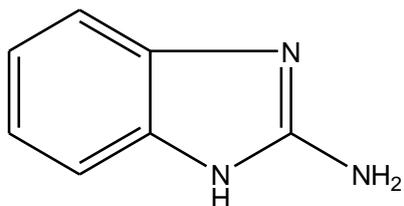
Если две связи гуанидинового фрагмента входят в циклическую систему, то такой гуанидин называется циклическим. В зависимости от того, как гуанидиновый фрагмент встроен в циклическую систему, циклические гуанидины подразделяются на 2 группы - полностью встроенные и частично встроенные. У полностью встроенных гуанидинов все четыре атома гуанидинового фрагмента входят в состав циклической системы. Частично встроенные гуанидины отличаются тем, что гуанидиновый фрагмент не полностью встроен в циклическую систему и один из гетероатомов вводится вне цикла. Таким образом, все циклические гуанидины можно сгруппировать в четыре класса:

частично встроенные полные циклические гуанидины, например, аминобензимидазолы (рис. 1-а);

частично встроенные неполные циклические гуанидины – тиоло-бензимидазолы (рис.1 - b);

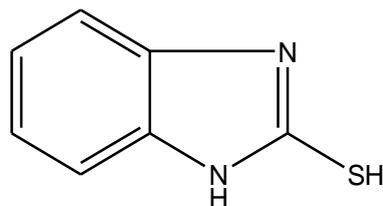
полностью встроенные полные циклические гуанидины – имидазобензимидазолы (рис.1 - c);

полностью встроенные неполные циклические гуанидины – оксазобензимидазолы (рис.1 - d).



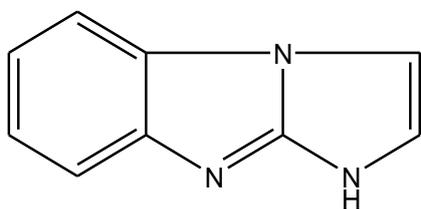
1H-бензо[*d*]имидазол-2-амин
тиол

a



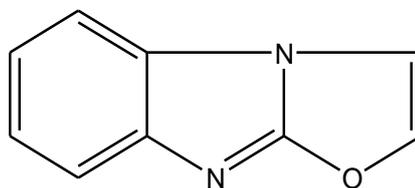
1H-бензо[*d*]имидазол-2-

b



1H-имидазо[1,2-*a*]бензо[*d*]имидазол

c



оксазоло[3,2-*a*]бензо[*d*]имидазол

d

В отличие от нециклических гуанидинов, все циклические производные характеризуются тем, что гуанидиновый фрагмент жестко закреплен в циклической системе и не может вращаться вокруг остальной части молекулы. Это обеспечивает постоянство стерических параметров производных циклических гуанидинов и обуславливает их пространственно детерминированную фиксацию в сайте соответствующей биомишени. Напротив, гуанидиновый фрагмент, соединенный с основной частью молекулы подвижной связью, может занимать в пространстве самые различные положения, что порождает высокую конформационную вариабельность таких химических структур.

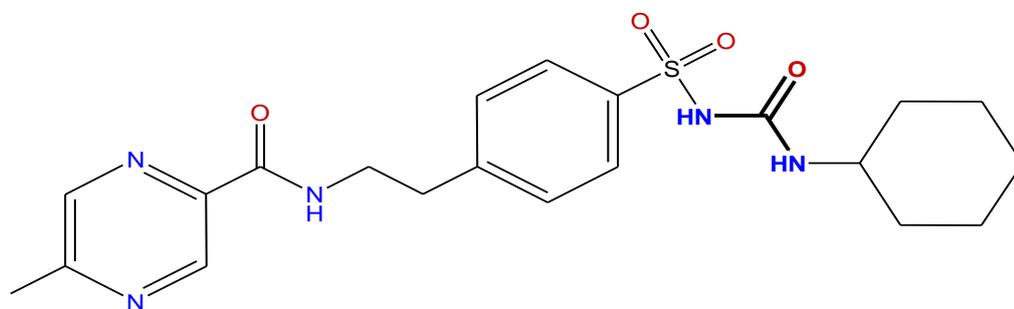
Поиск новых лекарственных веществ среди конформационно ограниченных молекул является одним из перспективных направлений современной фармакологии и медицинской химии (Баскин И.И., 2009). Например показано, что

конформационно жесткие производные аминокиндола проявляют высокую антимиотическую и ингибирующую тубулин активность (Romagnoli R., 2008). В работах (García-Villalón AL, 2008) показана гипогликемическая активность другого ряда производных аминокиндола. Кроме того, производные имидазобензимидазола, которые принадлежат к конформационно жестким структурам, проявляют гипогликемические, антиагрегантные и антиоксидантные свойства (Spasov AA, 2010).

Все четыре описанных класса циклических гуанидинов относятся к конформационно жестким структурам, поэтому являются перспективными для поиска соединений, обладающих гипогликемической активностью и другими фармакологическими эффектами.

Из современных препаратов, производных гуанидинов, применяющихся в клинике, можно отметить метформин (Spada A., 2008). В настоящее время метформин - единственный бигуанид, рекомендованный к применению Европейской Группой по разработке тактики ведения СД 2 типа (European NIDDM Policy Group, 1993). Международная федерация диабета (IDF) в своем настольном руководстве по сахарному диабету в 1999 году называет метформин первым в списке рекомендованных к применению пероральных сахароснижающих препаратов.

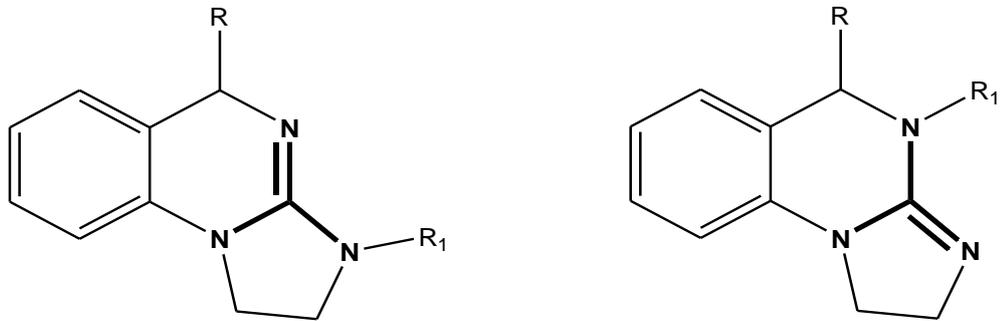
Глипизид, являющийся производным мочевины (изоэлектронный аналог гуанидина), также широко применяется в клинической практике.



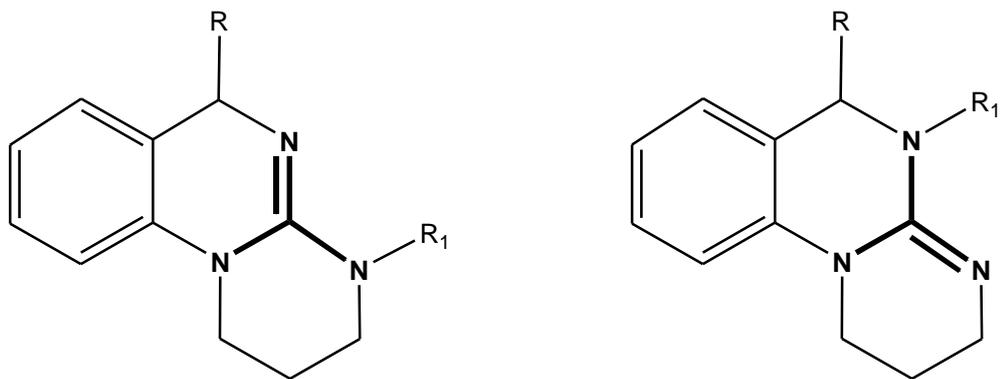
глипизид

Многочисленные исследования отечественных и зарубежных авторов подтверждают наличие гипогликемических свойств среди производных как нециклических, так и циклических гуанидинов.

Многие соединения, содержащие гуанидиновую группировку, обладают различными видами биологической активности. Так, антидиабетическая активность трициклических гуанидинов – производных имидазо[1,2-а]хиназолинов и пиримидо[1,2-а]хиназолинов, была отражена в работах (Kosabayama A., 1979; Jagtap P. G., 2005).

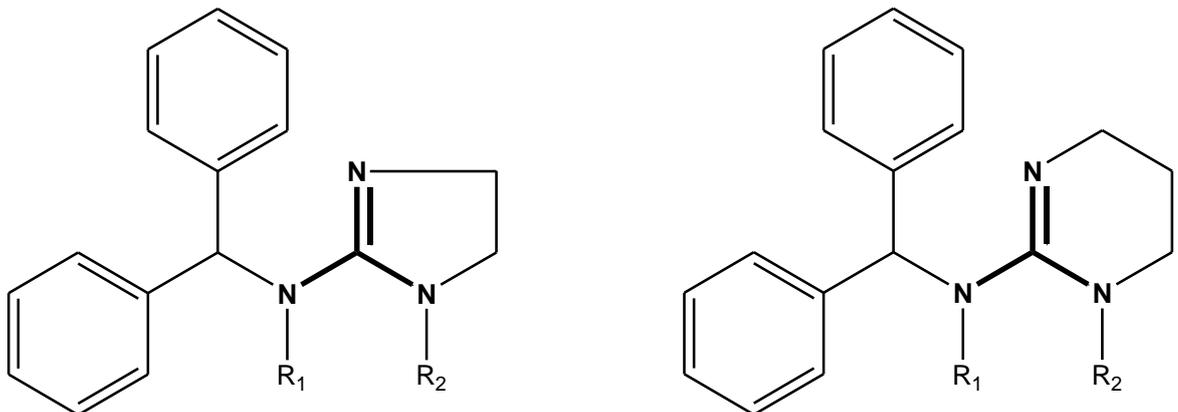


имидазо[1,2-а]хиназолины

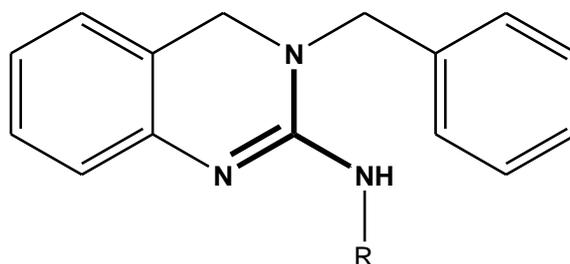


пиримидо[1,2-а]хиназолины

В 1979 году была синтезирована еще одна серия соединений и изучена их гипогликемическая активность: производные *N*-бензгидрил-4,5-дигидро-1*H*-имидазол-2-амин и *N*-бензгидрил-1,4,5,6-тетрагидро-пиримидин-2-амин (Kosabayama A., 1979).

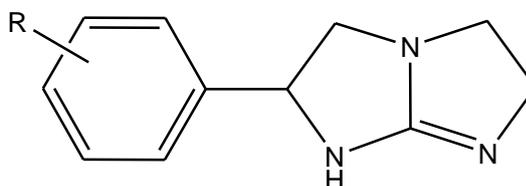


Показано (Ishikawa F., 1980), что хиназолины ингибируют агрегацию тромбоцитов. Кроме того, была доказана гипогликемическая активность данного класса соединений.



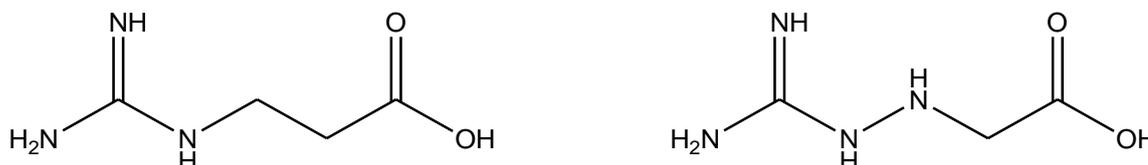
3-бензил-3,4-дигидрохиназолин-2-амин

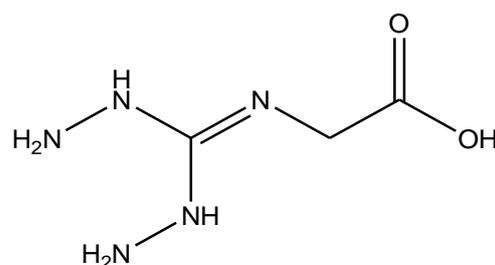
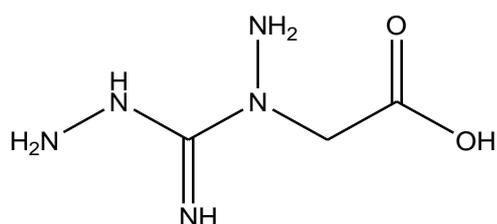
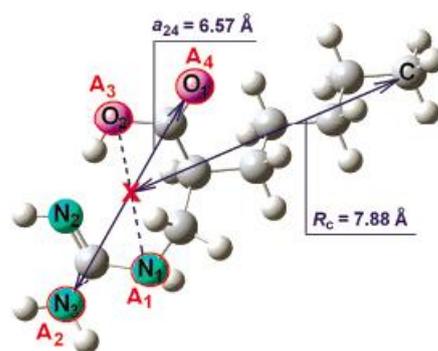
В продолжение работ по поиску биологически активных веществ среди производных циклических гуанидинов и определения их фармакологической активности был синтезирован и исследован ряд замещенных имидазо[1,2-а]имидазолов (Шаймарданова Г. С., 1992) (бициклических гуанидинов), у которых выявили гипогликемическую, антигипертензивную, диуретическую и антиагрегантную активность (Ishikawa F., 1985).



имидазо[1,2-а]имидазолы

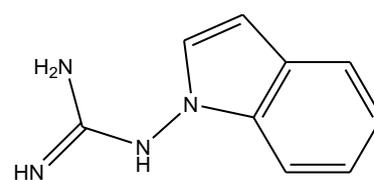
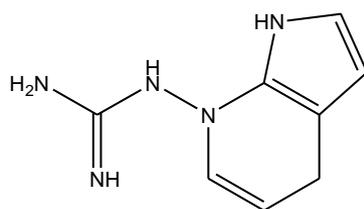
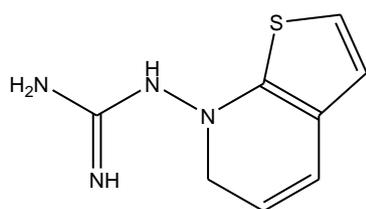
В более поздних исследованиях показана гипогликемическая активность различных аналогов гуанидино- и аминогуанидино-пропионовой кислоты и методами квантовой химии выявлен ее 3D-фармакофор (Wilkinson-Berka J. L. , 2002; Marenich A.V, 2008).





Кроме того, в работах (Larsen S.D., 2001) были продемонстрированы два механизма действия гуанидин-пропионовой кислоты. С одной стороны, данное соединение у животных с сахарным диабетом типа 2 повышало чувствительность периферических тканей к инсулину. С другой стороны, снижало количество жировой ткани.

В работах ученых из Индии была описана способность стимулировать секрецию инсулина у производных следующих соединений: *N*-1*H*-тиено[2,3-*b*]пиридинил-гуанидина, *N*-1*H*-пирроло[2,3-*b*]пиридинил-гуанидина и *N*-1*H*-индолил-гуанидина (Инчина В. И., 2011; Takahashi К., 2009; Bahekar R.H., 2007).



Таким образом, на основании результатов проведенных исследований можно говорить о том, что циклические гуанидины проявляют гипогликемическую активность, обладают антиагрегантными свойствами и низкой токсичностью. Рассмотренные соединения при более глубоком изучении можно позиционировать как новый класс гипогликемических средств.

1.4. Разработка лекарственных веществ методами *in silico*.

Традиционный путь поиска лекарственных веществ в XX в. заключался в синтезе самых разнообразных органических соединений и их тестировании на различные виды активности. Были синтезированы и протестированы сотни тысяч веществ. Трудоемкость и длительность этого процесса заставляла ученых задумываться над разработкой теоретических основ поиска лекарств, и главным образом – над проблемой ограничения количества синтезируемых соединений (Зефилов Н.С., 2010; Лунин В.В., 2001).

Постепенно возникали вычислительные подходы к выявлению взаимосвязи биологических свойств веществ с их структурой и к количественному описанию этой взаимосвязи. Подобные исследования привели к рождению научного направления, называемого в современной химии лекарств QSAR («Quantitative Structure – Activity Relationships»), или «количественные соотношения структура–активность»). В сочетании с методами молекулярного моделирования это направление получило общее название методов *in silico* (в кремнии), что подразумевает доэкспериментальный поиск лекарственных веществ только компьютерным способом, до проведения экспериментального скрининга.

История развития методов *in silico* совпадает по времени с развитием методов статистического анализа эмпирических закономерностей. Корвин Хэнч (Hansch, 1964) установил, что регрессионное уравнение, описывающее зависимость между биологической активностью и липофильными, электронными и стерическими параметрами соединений, является весьма удобным инструментом для исследователя. Уравнение регрессии представляет собой статистический аналог точной функциональной зависимости, включающей нескольких независимых переменных X_1, X_2, \dots, X_n .

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + \dots + a_iX_i$$

В качестве математического аппарата в QSAR в основном используется множественный регрессионный анализ, а регрессионное уравнение в форме многочлена наиболее часто употребляется на практике (Голендер В.Е., 1978)

Начало 70-х прошлого столетия характеризуется развитием теории распознавания образов (ТРО) (Партик, 1980). В этом случае прогноз заключается в отнесении неисследованного соединения к одному из двух классов веществ – активных или неактивных (высокоактивных/малоактивных). Основой методики прогноза являются полученные методами ТРО закономерности, связывающие между собой факт наличия или отсутствия активности и структуру соединений, представленную в виде вектора (матрицы) дескрипторов (Васильев П. М., 2004). При прогнозе дескрипторное описание соединения подставляется в ранее рассчитанную разделяющую функцию и вычисляется метрика принадлежности новой химической структуры к каждому из двух классов.

С начала 80-х годов прошлого века в QSAR начала активно использоваться методология нейросетевого моделирования. В настоящее время наиболее популярными являются многослойные нейросети (Гальберштам, 2003). Простые нейронные сети имеют определенные ограничения, которые не позволяют решать ряд важных научных и практических задач. Для преодоления существующих ограничений была предложена концепция самоорганизующихся сетей. Она позволяет конструировать алгоритмы обучения нейронных сетей с поисковым поведением, способные вести обучение сложных иерархических систем, работать на больших временных промежутках, поддерживать гомеостаз и т.д. (Kohonen, 1995).

История развития компьютерного моделирования выявляет целый ряд проблем, возникающих в связи с необходимостью восприятия и анализа человеком больших объемов данных, сгенерированных современными высокопроизводительными компьютерными комплексами. Визуализация является существенной частью процесса компьютерного моделирования, обеспечивающей анализ и правильную интерпретацию результатов вычислений, а также дальнейшую работу с вычислительной моделью (Heermann Ph. 1998). Именно появление в начале 90-х годов графических процессоров и программ для визуализации химических структур привело к скачку в области 3D-молекулярного моделирования (Chemoinformatics, 2003).

Середина 90-х характеризуется развитием методов 3D-моделирования белков. Основным методом моделирования пространственной структуры фармакологически важных белков-мишеней в настоящее время является моделирование по гомологии (Баскин И.И., 2009; Bergans N., 2000; Bharatam P. V., 2007). Оно заключается в предсказании трехмерной структуры белковой молекулы по аминокислотной последовательности с использованием данных о пространственной структуре одного или нескольких экспериментально изученных гомологов. Молекулярное моделирование и конструирование используются на финишных стадиях процесса компьютерного поиска новых лекарственных веществ. Этот процесс можно рассматривать как создание новой супрамолекулярной системы: комплекса «макромолекула — лиганд» (Хельтье Х.-Д., 2013; Bersuker I. B., 2003).

Бурно развивающимся и весьма плодотворным подходом к созданию новых веществ, обладающих определенной биологической активностью, является 3D-моделирование молекулы белка-мишени с одновременным подбором органических молекул, оптимальным образом связывающихся с ней, с помощью методов молекулярного докинга. В настоящее время докинг является основным средством предсказания способа связывания биологической макромолекулы с лигандом, который позволяет отыскать наиболее энергетически выгодное расположение этого лиганда в сайте связывания биологической мишени (Friesner, 2004). Докинг очень важен в аспекте поиска и синтеза новых лекарственных препаратов (Halperin I., 2002).

Следует отметить, что из более чем 40 тыс. белков протеома человека (Neuhold L. A., 2005) только для примерно 2,5 тыс. белков установлены их функции (Lisa A., 2004), среди которых выявлено пока только 518 фармакологически релевантных биомишеней (Swindells M. B., 2002), из которых для 324 известны действующие на них и производимые в мире свыше 1,2 тыс. лекарственных вещества (Overington, 2006). Эти мишени составляют 75 подсемейств, объединенных в семь основных классов: G-протеин сопряженные рецепторы, ионные каналы, ядерные рецепторы, рецепторные киназы и протеазы, ферменты, транспортеры/транслокаторы,

нуклеиновые кислоты (Overington, 2006). Для качественной и количественной оценки действия соединений на стадии образования комплекса «рецептор - лиганд» могут быть использованы различные методы, но в последние годы популярность завоевали методы 3D-QSAR. Из вычислительных процедур в QSAR используются методы линейной, нелинейной и непараметрической регрессии, ТРО, методы анализа сходства и кластеризации, искусственные нейронные сети, статистические методы анализа, методы принятия решений, логический вывод на основе классической, индуктивной, вероятностной, нечеткой и других логик. (Dinparast L., 2016; Филимонов Д. А., 2006; Lagunin A., 2000; Филимонов Д.А.,1995). По сути, все методы 2D- и 3D-QSAR основаны на описании структуры химического соединения с помощью набора числовых характеристик – дескрипторов и построении «корреляций» между величиной свойства (активности) и значениями дескрипторов (Палютин В.А., 2006; Филимонов Д.А.,1998). Эмпирические QSAR-модели позволяют по структурной формуле предсказывать свойства новых веществ, а также осуществлять направленное конструирование новых соединений с заданным комплексом свойств.

В настоящее время применение методов *in silico* для поиска новых лекарственных веществ является достаточно распространенной практикой (DPUG Design, 2010; Recent Advances in QSAR, 2010). В мире разработаны сотни программ для QSAR и молекулярного моделирования: издаются десятки специализированных научных журналов, посвященных компьютерным методам поиска биологически активных веществ: только два ведущих издательства выпускают 34 журнала, связанных с этой тематикой (ACS Publications, 2008; Elsevier Products, 2008). Опубликованы тысячи статей, в которых приводятся результаты успешного применения методов QSAR в поиске новых биологически активных веществ.

В частности, компьютерные методы широко используются при поиске соединений с противодиабетической активностью (Combettes, 2007; Naresh, 2012).

Например, (Murcia-Soler, 2001) использовал совместно дискриминантный и регрессионный анализ для выявления зависимости между гипогликемической активностью и молекулярной топологией антидиабетических лекарственных

препаратов. Данная модель была использована для конструирования новых гипогликемических веществ (Murcia-Soler, 2001).

В исследованиях (Al-Masri, 2008) в выборке из 358 известных ингибиторов ДПП-4 была построена смешанная фармакофорно-физико-химическая регрессионная QSAR-модель, точность прогноза которой достигает 74%. С помощью этой модели найдены соединения, активные в микромолярной концентрации (Al-Masri, 2008).

В работе (Saqib, 2009) на выборке из 45 производных триазолопиперазина методами CoMFA (Tikhonova I. G., 2003) и CoMSIA построены 3D-QSAR-модели для прогноза ингибирующей ДПП-4 активности, точность которых составила 82% и 86%, соответственно. Совместное использование полученных зависимостей позволило смоделировать новые соединения, обладающие противодиабетическими свойствами (Saqib, 2009).

Bhatt провел 3D QSAR-анализ 63 ингибиторов рецептора GPR40, перспективной мишени для создания антидиабетических средств. В результате расчетов были построены LBDD-модель и SBDD-модель, которые использовались для оценки ингибирующей GPR40активности 15 новых соединений. Точность прогноза составила 86% (Bhatt, 2011; Bickel C. A., 2002; Ecelbarger C. A., 2001).

Taha (2011) предложил новый способ прогноза для использования в методе докинга – анализ межмолекулярных контактов лиганда с аминокислотами связывающего кармана сайта биомишени. Данный подход был применен для поиска новых потенциальных антидиабетических средств, ингибиторов гликогенфосфорилазы. Найдено 9 веществ, активных в микромолярных концентрациях (Taha, 2011).

Agrawal (2012) использовал 3D-фармакофорный анализ для направленного поиска с помощью программы PharmaGist ингибиторов ДПП-4. Был выполнен скрининг базы данных Zinc, содержащей более 21 миллиона коммерчески доступных химических соединений, с применением препроцессинга по правилу Липински. Отобран пул перспективных структур и структур-основ для поиска новых ингибиторов ДПП-4 с высокой химической новизной (Agrawal, 2012; Al-masri I. M., 2008).

В том числе, методы *in silico* были использованы для направленного поиска производных гуанидинов с антидиабетической активностью (Marenich, 2008). Методами квантовой химии *ab initio* в работе построена 3D-фармакофор, детерминирующий уровень антидиабетической активности различных производных гуанидина и аминугуанидина. Фармакофорная модель была найдена в результате анализа 120 изученных соединений и использована для прогноза активности 34 веществ указанных химических классов. Данная модель показала хорошую прогностическую способность, равную 90%. В связи с этим она была использована для конструирования 12 новых структур с потенциально высокой антидиабетической активностью, как перспективных кандидатов для дальнейшего экспериментального изучения (Marenich, 2008).

1.5. Заключение.

На основе приведенных выше данных становится ясно, что рациональные подходы, используемые для любой парадигмы создания новых антидиабетических средств, могут быть разделены на две категории – поиск новых мишеней действия, их лигандов или их аналогов. Это указывает на применимость молекулярных исследований для анализа взаимодействия рецептора и лекарственного средства, изучение фармакокинетических особенностей потенциальных антидиабетических препаратов. Ожидается, что идентификация цели и ее структурный анализ будет способствовать облегчению поиска новых антидиабетических средств.

Таким образом, создание лекарственных средств, способных влиять на факторы, непосредственно участвующие в патогенезе СД, а также не только корректирующих уровень гликемии, но и существенным образом влияющих на течение заболевания и способствующих профилактике его осложнений, представляется весьма актуальным.

Таким образом, направленный поиск среди новых производных циклических гуанидинов соединений с высокой антидиабетической активностью, в том числе, с применением методов *in silico*, является весьма актуальным и востребованным. Проведение данного исследования позволит выявить в указанном ряду инновационное лекарственное вещество, на основе которого будет создан высокоэффективный конкурентоспособный препарат для лечения сахарного диабета.

Приведенные данные свидетельствуют о важном значении методов *in silico* для успешного поиска новых фармакологически активных веществ.

ГЛАВА 2. ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СРЕДИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЦИКЛИЧЕСКИХ ГУАНИДИНОВ

Применение методов *in silico* для поиска новых лекарственных веществ является распространенной практикой (Puzyn T., 2010). Мощность химико-биологического универсума (пространство, в котором находятся все биологически активные вещества по известным видам активности) очень велика, поэтому невозможно экспериментально проверить все соединения хотя бы на один вид фармакологической активности.

Процесс поиска лекарственных веществ состоит из нескольких этапов (Merz К.М., 2010):

поиск перспективной базовой структуры (структуры-основы);
виртуальный скрининг и планирование экспериментального скрининга;
экспериментальный скрининг и выбор нескольких соединений-лидеров;
уточнение методами *in silico* фармакодинамических и фармакокинетических характеристик соединений-лидеров, с целью выбора соединения для последующего углубленного исследования;
углубленное изучение соединения-лидера;
анализ *in silico* возможного механизма действия соединения-лидера (Duarte C. D., 2007).

В настоящее время в мире известно более 101 млн. органических соединений (CAS, 2015). Известное число видов биологической активности превышает 25 тыс., поэтому глобальное экспериментальное тестирование всех веществ является невозможным. Таким образом, использование методов *in silico* для поиска лекарственных веществ, в частности для предварительного отсеивания неперспективных соединений, является в настоящее время общепринятой.

Основные вычислительные методы поиска количественных соотношений между структурой и биологической активностью химических соединений (QSAR)

Параболическая модель Хэнча. Известно, что логарифм коэффициента распределения в системе октанол–вода является основной характеристикой липофильности молекулы, используемой в корреляционных уравнениях. Одна из идей Хэнча заключалась в том, что эту величину можно представить как сумму введенных им величин, характеризующих вклад в липофильность отдельных атомов или фрагментов структуры. Параметр имеет отрицательные значения для гидрофильных групп и положительные – для гидрофобных групп. Важность этой идеи заключается в том, что, суммируя определенные экспериментальные значения для структурных фрагментов данного соединения, можно получить расчетную величину его липофильности $\log P$ и в ряде случаев оценить биологическую активность веществ до их синтеза.

Уравнение Хэнча впервые было рассчитано в работе (Hansch C., 1964) и в общем виде представляет собой следующее равенство

$$\log \frac{1}{C} = a_0 + a_1\pi^2 + a_2\pi + a_3\sigma + a_4E_S,$$

где C – концентрация вещества, вызывающая определенный уровень биологического эффекта (напр., EC_{50});

π – константа Хэнча (липофильность);

σ – константа Гаммета (электронный параметр);

E_S – константа Тафта (стерический параметр);

a_0, a_1, a_2, a_3, a_4 – регрессионные коэффициенты.

На сегодняшний день подход Хэнча получил свое развитие и широко используется для поиска корреляций между биологической активностью, липофильностью, электронными и стерическими характеристиками соединений.

Множественная линейная регрессия. Этот подход (Дрейпер Н., 1986)

позволяет определить степень вариации зависимой переменной независимыми переменными; предсказать значения зависимой переменной на основе значений независимых переменных; определить вклады отдельных независимых переменных в вариацию зависимой переменной.

Общий вид уравнения регрессии задается следующей формулой

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^M a_i X_i ,$$

где Y – зависимая переменная;

X_i – независимые переменные, $i = 1, \dots, M$;

M – число независимых переменных;

a_0 – свободный член регрессионного уравнения;

a_i – регрессионные коэффициенты перед независимыми переменными, $i = 1, \dots, M$.

В частности, уравнение Хэнча является линейным регрессионным уравнением с фиксированными переменными. Линейные зависимости «структура-активность» могут включать иные переменные, например топологические индексы (Nandi S., 2012) или квантово-химические параметры молекул (Соколов Ю.А., 2008).

Модель Фри-Вильсона. Эта модель основана на предположении о том, что величина свойства данного заместителя, находящегося в базовой структуре в данном положении, всегда одинакова, независимо от того, в каком соединении присутствует рассматриваемый заместитель (Free S. M., 1964). Величины свойства заместителей рассчитываются с помощью множественного линейного регрессионного анализа. Для этого необходима только информация о молекулярной структуре и биологической активности соединений (физико-химические параметры не используются).

При анализе данных методом Фри - Вильсона для каждого изучаемого соединения составляется линейное уравнение, коэффициенты регрессии которого рассчитываются методом наименьших квадратов. Важный результат состоит в том, что с помощью рассчитанных значений параметров можно предсказать активность соединений, образованных путем всевозможных сочетаний и перестановок исходных заместителей в основной структуре данного химического ряда.

Линейный дискриминантный анализ. Данный метод является одним из первых подходов к классификации объектов, предложен Р. Фишером в 1936 г. (Fisher, R. A., 1936). Он основан на предположении, что классы имеют нормальное распределение; границы между классами можно аппроксимировать с помощью

линейных функций; задача сводится к оценке параметров этих функций. Выделяются независимые переменные (дескрипторы), которые должны быть связаны с рассматриваемым свойством так, чтобы обеспечить максимальное возможное разделение положительных и отрицательных свойств: активности и неактивности. Затем оценивается качество разделения и производится анализ полученных результатов.

Общий вид системы дискриминантных функций

$$\begin{cases} g_1 = a_{01} + a_{11}X_1 + \dots + a_{M1}X_M \\ g_2 = a_{02} + a_{12}X_1 + \dots + a_{M2}X_M \end{cases},$$

где g_1, g_2 – дискриминантные функции, отражают плотность вероятности принадлежности объекта к классу 1 или 2;

X_i – независимые переменные, $i = 1, \dots, M$;

$a_{01}, a_{02}, a_{i1}, a_{i2}$ – дискриминантные коэффициенты, $i = 1, \dots, M$.

При классификации соединения по значениям параметров его химической структуры рассчитывают значения дискриминантных функций. Если $g_1 > g_2$, соединение относят к классу 1 (например, высокоактивных); если $g_1 < g_2$ – к классу 2 (Franke M., 1976).

Байесовский классификатор. Данный классификатор основан на правиле Байеса для условной вероятности (Горелик А. Л., 2003).

Пусть $\{A_1, A_2\}$ – полная группа событий, состоящая в том, что соединение C принадлежит к классу 1 (активных соединений) или к классу 2 (неактивных соединений), с априорными вероятностями $P(A_1)$ и $P(A_2)$. Пусть B_i – событие с вероятностью $P(B_i) > 0$, заключающееся в том, что в структуре соединения C присутствует дескриптор i . Тогда апостериорная вероятность принадлежности соединения C к классу активных A_1 , при условии, что наступило событие B_i , есть

$$P(A_1 | B_i) = \frac{P(B_i | A_1) \cdot P(A_1)}{P(B_i | A_1) \cdot P(A_1) + P(B_i | A_2) \cdot P(A_2)},$$

где $P(B_i | A_k)$ – условная вероятность события B_i , вычисленная в предположении, что наступило событие A_k , $k = 1, 2$.

Классификатор основан на двух допущениях: 1) дескрипторы в соединениях обучающей выборки являются одинаково важными; 2) дескрипторы не зависят друг от друга.

До начала классификации $P(A_1) = P(A_2) = 0.5$.

С учетом этого, если в соединении C присутствует L дескрипторов, то общая вероятность его принадлежности к классу активных соединений A_1 определяется мультипликацией условных вероятностей

$$P(C \in A_1) = \frac{\prod_{i=1}^L P(B_i | A_1)}{\prod_{i=1}^L P(B_i | A_1) + \prod_{i=1}^L P(B_i | A_2)} .$$

Метод Байеса используется при прогнозе активности в системе PASS (Merz, К.М., 2010) и в ИТ «Микрокосм» (Vassiliev P. M., 2014).

Искусственные нейронные сети. Искусственные нейронные сети представляют собой математические модели, а также их программные или аппаратные реализации, построенные по принципу организации и функционирования биологических нейронных сетей, то есть сетей нервных клеток живого организма (Freeman J. A., 1991; Leave C., 1992).

Общая архитектура нейронной сети включает входные нейроны (откликами от которых обычно являются независимые переменные X_i), несколько слоев скрытых нейронов (число слоев и число скрытых нейронов в каждом слое определяется в процессе итеративного обучения) и выходного нейрона (обычно это общая функция отклика Y – например, уровень активности) (рис. 1).

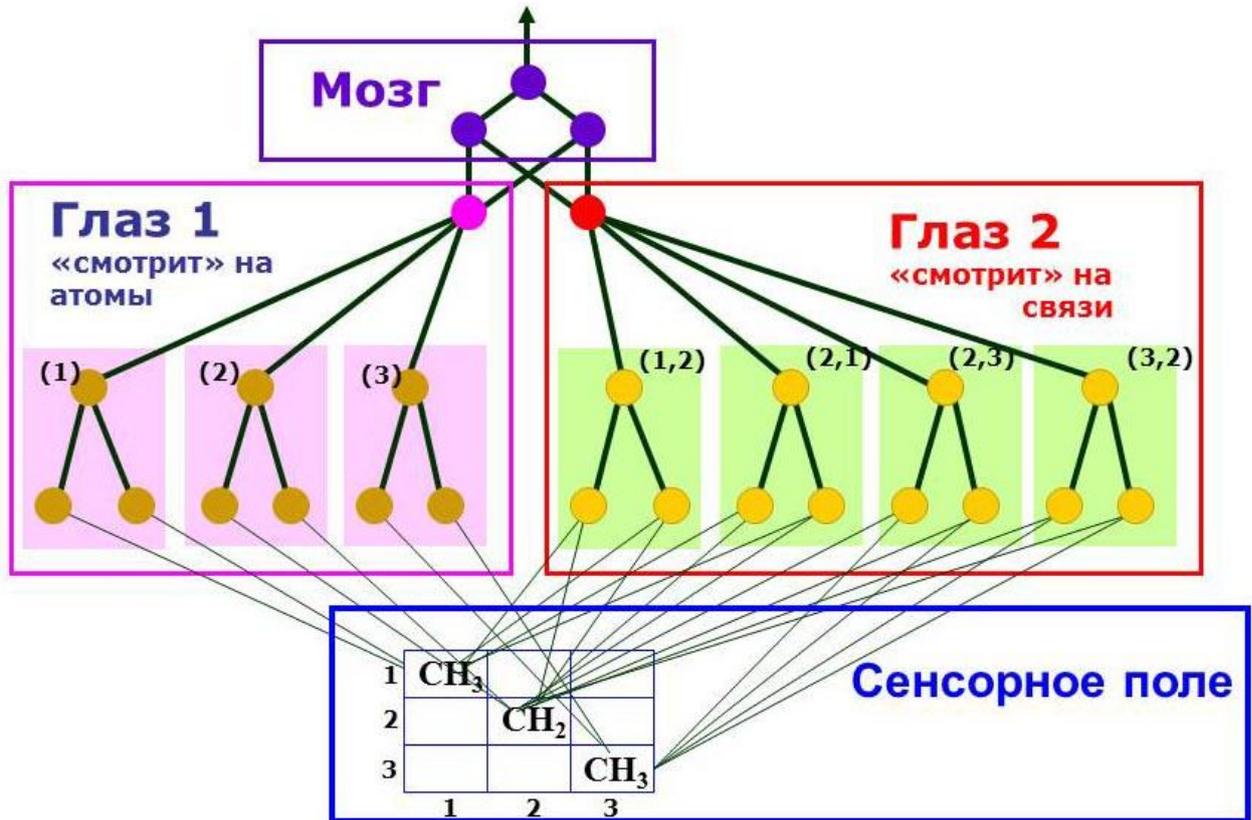


Рис. 1 – Пример архитектуры трехслойной искусственной нейронной сети (Baskin I. I., 2009).

Суть метода заключается в том, чтобы итеративно определить веса, связывающие отклик выходного нейрона с сигналами от скрытых нейронов, а отклики от скрытых нейронов – с сигналами от скрытых нейронов предыдущего уровня или от входных нейронов. Вид функции $Y=f(X)$ может быть любой, но чаще всего используется линейная форма зависимости, из-за простоты реализации алгоритма обучения. Первоначально значения всех весов устанавливают одинаковыми. На каждом шаге итерации увеличивают или уменьшают величину каждого веса и проводят классификацию обучающей и тестовой выборки. Если изменение конкретного веса улучшает классификацию, то его поощряют, а если ухудшает – то наказывают. Процедуру повторяют до достижения минимума ошибки при прогнозе объектов тестовой выборки.

Искусственная нейронная сеть – один из наиболее перспективных развивающихся методов, который отличают следующие достоинства:

многослойные нейронные сети позволяют строить любые зависимости - линейные, нелинейные, дискретные, смешанные;

метод не накладывает строгих ограничений на количественный состав выборки;

Как иллюстрацию успешного применения нейросетей для поиска биологически активных веществ можно привести обзор (Гальберштам Н. М., 2003).

Метод опорных векторов. Метод опорных векторов (Support Vector Machine, SVM) основан на преобразовании исходных данных при помощи так называемых ядерных функций (kernel function) (Cristianini N., 2000). Ядерную функцию выбирают так, чтобы в преобразованном пространстве данных классы объектов были линейно разделимы. Поиск оптимальной разделяющей прямой проводят путем построения двух параллельных гиперплоскостей по обеим сторонам от гиперплоскости, разделяющей рассматриваемые классы. Оптимальной разделяющей гиперплоскостью является та, для которой расстояние до двух параллельных гиперплоскостей будет максимальным. Ошибка минимизируется путем использования итерационного алгоритма обучения. Примером использования SVM для прогноза биологической активности может служить исследование (Карпов П. В., 2011).

Сравнительный анализ молекулярных полей. Одним из наиболее известных методов 3D-QSAR является сравнительный анализ молекулярных полей (CoMFA-Comparative Molecular Field Analysis). CoMFA позволяет рассчитывать соотношения между трехмерной структурой молекул и их биологической активностью (Cramer R. D., 1988; Klebe G., 1994).

Суть метода состоит в следующем. Для всех соединений обучающей выборки выполняют построение и оптимизацию 3D-моделей. Для каждой молекулярной модели определяют центр молекулы (либо используют общую базовую структуру). Все модели обучающей выборки совмещают друг с другом по этому центру (общей структуре), минимизируя сумму квадратов отклонений атомов. Вокруг полученного оверлея формируют параллелепипед, внутри которого находятся все совмещенные молекулы. Этот параллелепипед разбивают на ячейки постоянного размера (обычно $2 \times 2 \times 2$ Å). Каждая молекула, помещенная внутрь такой решетки,

определяет значения параметров всех ячеек решетки. Как правило, это электронные, стерические и липофильные инкременты в общий показатель свойств данного соединения. Параметры всех ячеек используются как независимые переменные при пошаговом множественном регрессионном анализе, с помощью которого рассчитывается итоговое QSAR-уравнение. Пример использования CoMFA приведен в работе (Tikhonova I. G., 2003).

2.1. Материалы и методы исследования

В данной подглаве описаны материалы и методы исследования для компьютерного прогноза фармакологической активности новых соединений – циклических гуанидинов.

На кафедре фармакологии ВолгГМУ на гипогликемическую активность были изучены производные семи химических классов: 2-амино-бензимидазолы (2-АмБИ) (I); N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы (N⁹-ИмБИ) (II); N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы (N⁹-ДгИмБИ) (III); N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазолы (N¹-ИмБИ) (IV); N¹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы (N¹-ДгИмБИ) (V); N¹,N⁹-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы (N¹,N⁹-ДгИмБИ) (VI); 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолы (ПрмБИ) (VII). Соответствующие структурные формулы приведены на рис. 4.

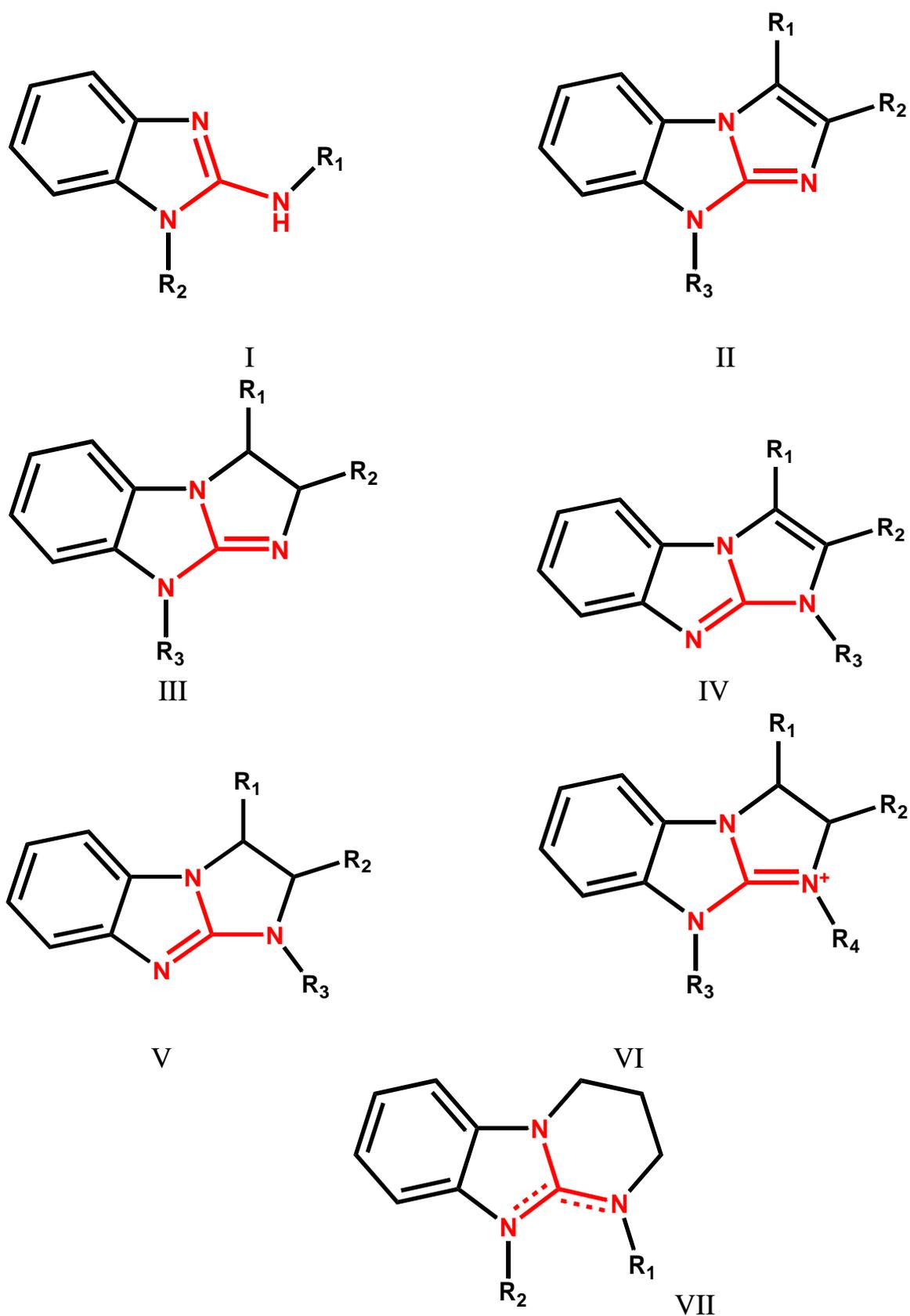


Рис. 4 – Скафолды, содержащие циклические гуанидины, изученные на гипогликемическую активность (пунктир означает возможное наличие двойной связей)

Для компьютерного прогноза фармакологической активности была создана база данных¹ по структуре и фармакологической активности веществ, изучаемых на кафедре фармакологии ВолГМУ, всего 1036 соединений (табл. 1), часть из которых была испытана на гипогликемическую и антидиабетическую активность.

Таблица 1 – Состав базы данных для исследования *in silico*

Химический класс	Кол-во соед.
2-амино-бензимидазолы (2-АмБИ)	86
2-имино-бензимидазолы (2-ИмиБИ)	124
пиримидо[1,2а]бензимидазолы (ПрмБИ)	1
N ₁ ,N ₉ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы (N ¹ ,N ⁹ -ДгИмБИ)	4
N ₁ ,N ₉ - имидазо[1,2-а]бензимидазолы (N ¹ ,N ⁹ -ИмБИ)	2
N ₁ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы (N ¹ -ДгИмБИ)	22
N ₁ -имидазо[1,2-а]бензимидазолы (N ¹ -ИмБИ)	121
N ₉ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы (N ⁹ - ДгИмБИ)	78
N ₉ -имидазо[1,2-а]бензимидазолы (N ⁹ - ИмБИ)	484
2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолы (ПрмБИ)	87
триазино[2,3-а]бензимидазолы (ТрзИмБИ)	7
триазоло[1,5-а]бензимидазолы (ТрзоИмБИ)	20
всего	1036

Примечание. Данные о структуре и активности этих соединений использовались для компьютерного прогноза.

Для анализа *in silico* перспективности производных циклических гуанидинов как источников веществ с гипогликемической активностью отдельно были отобраны из базы данных соединения, испытанные на гипогликемическую активность.

Гипогликемическое действие новых производных циклических гуанидинов изучали на крысах при внутрибрюшинном введении, в дозе 50 мг/кг. Забор крови осуществляли через 4 часа. Содержание глюкозы в крови определяли глюкозоксидазным методом с помощью стандартного набора «Глюкоза ФКД» (Северин С. Е., Соловьева Г. А., 1989). Показателем гипогликемической активности служила величина Ind_R – отношение концентраций глюкозы в плазме крови опытной и контрольной групп животных (Larsen S. D., Connell M. A., 2001):

¹ База данных была разработана лично автором диссертации кафедры фармакологии ВолГМУ

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

Компьютерный прогноз гипогликемической активности 1036 новых неиспытанных производных циклических гуанидинов был выполнен с помощью ИТ «Микрокосм» и системы PASS (Глориозова Т. А., 1998).

Прогноз в системе PASS выполнялся с использованием программы «PASS 10.4 Professional Extended» (К.М. Merz, 2010).

Работа PASS (рис. 5) основана на анализе по обучающей выборке, которая содержит структуры известных лекарственных препаратов и фармакологически активных соединений, зависимостей «структура-активность» и позволяет определять у прогнозируемого соединения наличие, либо отсутствие предполагаемого вида биологической активности.

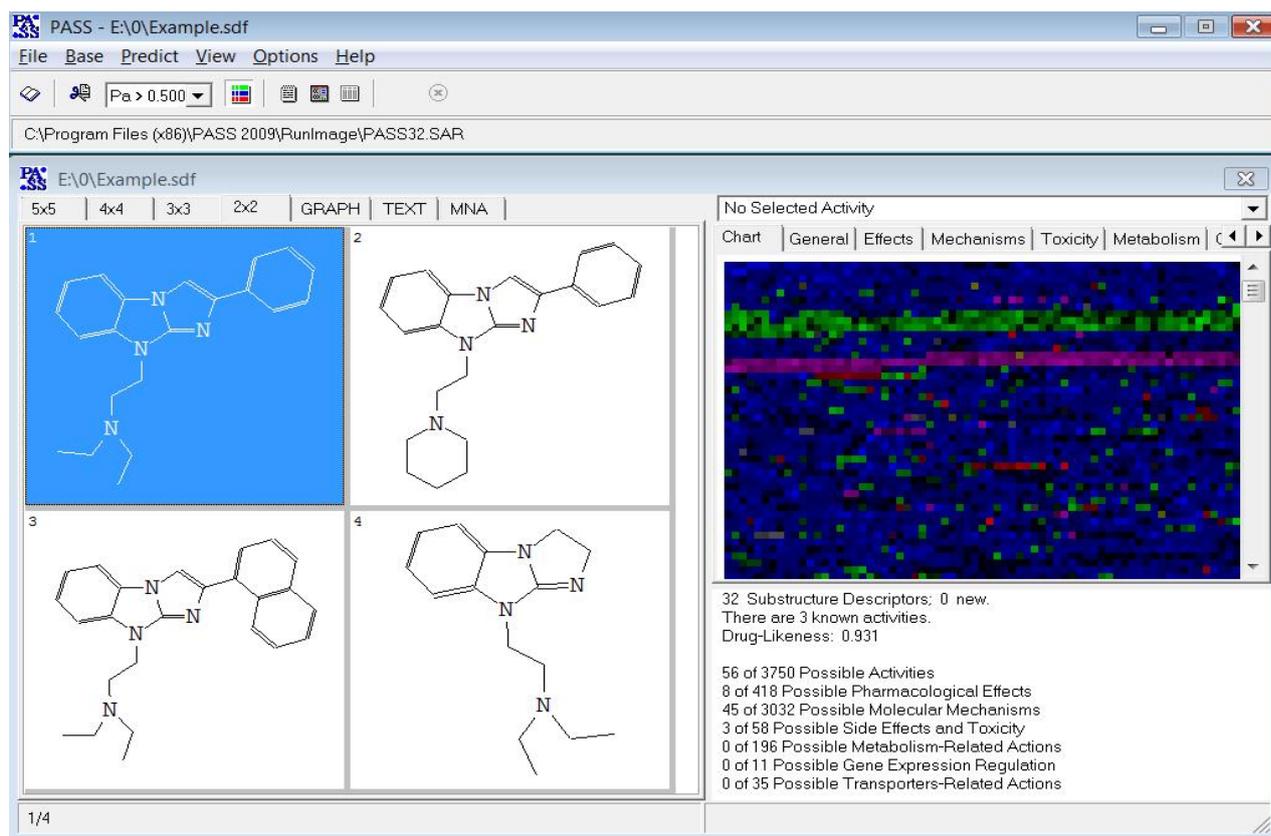


Рис. 5 – Интерфейс системы PASS

Метод прогноза состоит в оценке условной вероятности по формуле Байеса с использованием арксинусного преобразования Фишера. При прогнозе рассчитываются вероятности P_a и P_i принадлежности прогнозируемого вещества к

классам соединений, проявляющих и не проявляющих заданную активность. Соединение считается активным, если $P_a > P_i$.

Химическая структура любого прогнозируемого соединения представлена в PASS в виде оригинальных двухуровневых атом-центрированных MNA дескрипторов (MulilevelNeighbourhoodsofAtoms). Данные дескрипторы универсальны и хорошо описывают разнообразные зависимости «структура-свойство». Используемый в PASS математический алгоритм представляет собой следующее.

Алгоритм прогноза

Условные обозначения:

n – общее число соединений в обучающей выборке (базе данных);

n_i – число соединений, содержащих дескриптор i ;

n_j – число соединений, проявляющих активность j ;

n_{ij} – число соединений, содержащих дескриптор i и проявляющих активность j .

$p_j = n_j/n$ – оценка априорной вероятности активности j ;

$p_{ij} = n_{ij}/n_i$ – оценка условной вероятности активности j для дескриптора i .

m – число дескрипторов в прогнозируемом соединении;

$r_i = n_i/(n_i + 0.5/m)$ – регулирующий фактор;

Pr_j – начальная оценка вероятности наличия активности j прогнозируемого соединения.

Для прогнозируемого соединения порождается MNA-описание.

По этому описанию для каждого вида активности рассчитываются следующие значения:

$$u_j = \sum_i \arcsin[r_i \cdot (2p_{ij} - 1)]$$

$$u_{0j} = \sum_i \arcsin[r_i \cdot (2p_j - 1)]$$

$$s_j = \sin(u_j/m)$$

$$s_{0j} = \sin(u_{0j}/m)$$

$$Pr_j = [1 + (s_j - s_{0j}) / (1 - s_j \cdot s_{0j})] / 2$$

Предварительно по результатам тестирования на обучающей выборке методом скользящего контроля по одному для каждого вида активности рассчитываются функции:

$EF_j(CP)$ – зависимость, описывающая вероятность ошибки первого рода (отнесение активного соединения к не активным);

$ES_j(CP)$ – зависимость, описывающая вероятность ошибки второго рода (отнесение не активного соединения к активным);

где CP – пороговое значение для величины Pr , пробегающее при тестировании значения от 0 до 1.

В случае ошибки первого рода для активного соединения $Pr_j < CP$; в случае ошибки второго рода для не активного соединения $Pr_j > CP$.

В итоге для прогнозируемого соединения вычисляются:

$P_{aj} = EF_j(Pr_j)$ – вероятность наличия активности j ;

$P_{ij} = ES_j(Pr_j)$ – вероятность отсутствия активности j .

Эти вероятности рассчитываются независимо по подвыборкам активных и неактивных соединений и поэтому их сумма не равна единице. Величины P_a и P_i трактуют как оценки меры принадлежности вещества к классам активных и неактивных соединений, соответственно. Чем больше для конкретной активности величина P_a и чем меньше величина P_i , тем больше шанс обнаружить данную активность в эксперименте. Поэтому для последующего анализа дополнительно по результатам прогноза рассчитывались значения P_a/P_i .

Прогноз в ИТ «Микрокосм» был выполнен с использованием программного комплекса версии 5.1 (рис.6) (Свидетельство, 2011). Информационная технология «Микрокосм» позволяет по структурной формуле оценивать наличие и уровень заданной фармакологической активности прогнозируемого соединения по предварительно подготовленным экспертами-фармакологами обучающим выборкам. Основу технологии составляет комплексная методология прогноза, включающая, как составную часть, консенсусный подход к прогнозированию (Vassiliev P. M., 2014). Методами теории распознавания образов рассчитываются закономерности, связывающие между собой различные уровни активности, заданные в виде полуколичественных градаций, и структуру соединений, представленную в виде матрицы структурных дескрипторов. Химическая структура описывается с помощью дескрипторов 11 типов специализированного

иерархического многоуровневого языка QL2, из которых формируются модели обобщенных образов классов соединений в виде матрицы QL-дескрипторов (Васильев, П.М., 2006).

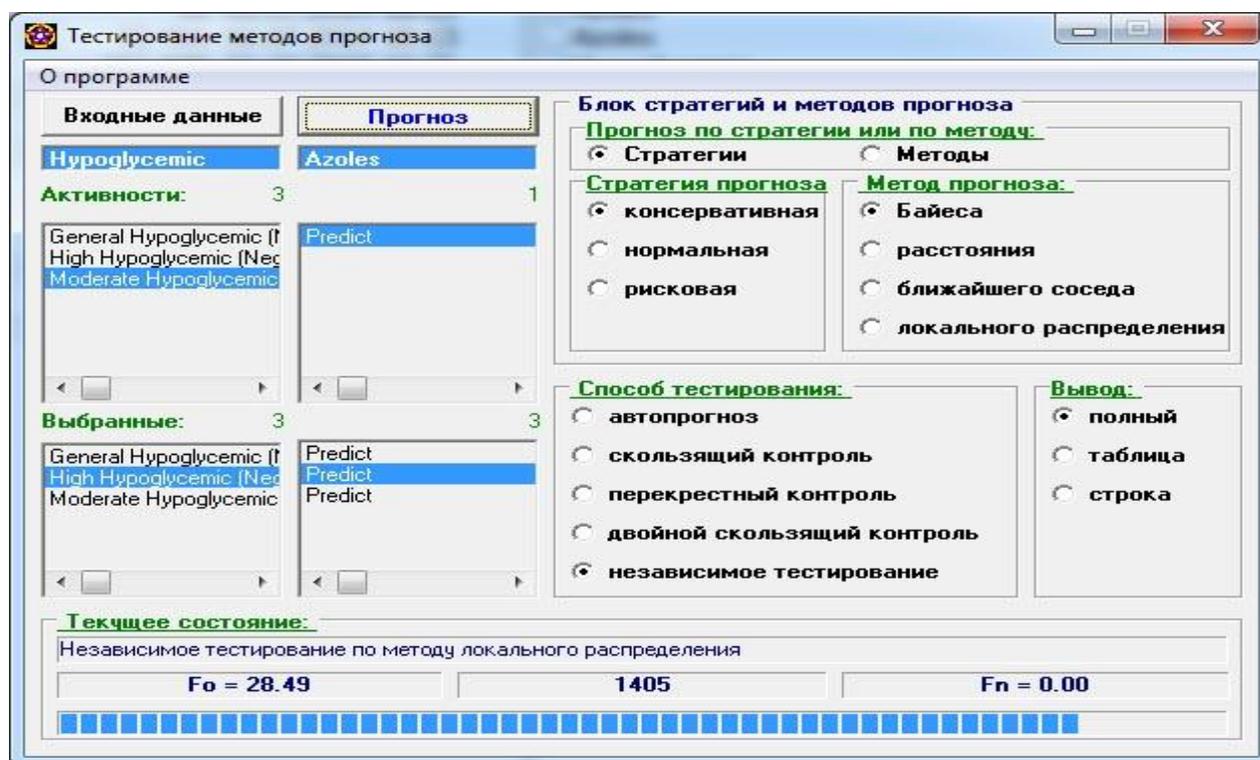


Рис. 6 – Интерфейс программы прогноза ИТ «Микрокосм»

Прогноз осуществляется с использованием четырех математических методов, с последующим обобщением спектра 44 промежуточных прогнозных оценок на основе трех стратегий голосования, с проверкой спектра прогнозных оценок на непротиворечивость.

В нашем исследовании прогноз в ИТ «Микрокосм» проведен с использованием двух обучающих выборок: первая включала 126 известных противодиабетических препаратов и 115 достоверно неактивных соединений; вторая – 109 экспериментально изученных производных циклических гуанидинов (80 активных веществ и 29 неактивных) (Vassiliev, 2014).

Границы классов гипогликемической активности (табл. 2) экспериментально изученных циклических гуанидинов определялись в результате кластерного анализа (рис. 7) показателей Ind_R двумя методами – геометрическим методом расстояний и вероятностным методом гистограмм (Мандель И Д, 1988).

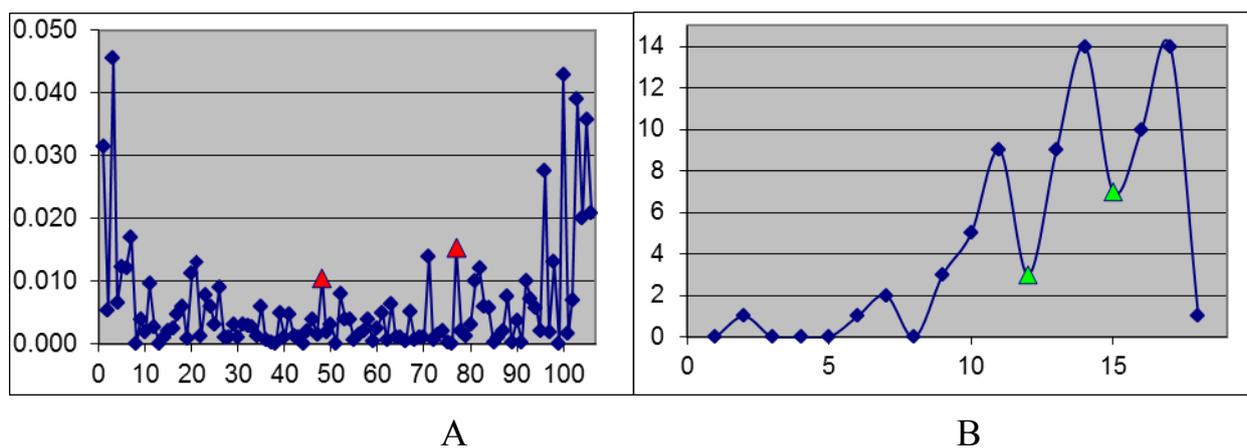


Рис.7 – Кластеризация гипогликемической активности производных циклических гуанидинов

График А: ось X – номер соединения в упорядоченном по величине Ind_R ряду; ось Y – расстояние разность активностей двух соседних соединений в этом ряду.

График В: ось X – номер интервала активности по величине Ind_R ; ось Y – число соединений в данном интервале.

Таблица 2 – Границы классов гипогликемической активности производных циклических гуанидинов

Уровень активности	Ind_R
высокая	$Ind_R < 0.82$
умеренная	$0.82 \leq Ind_R < 0.90$
выраженная	$Ind_R < 0.9$
низкая	$0.90 \leq Ind_R < 1.00$
неактивные и гипергликемические	$Ind_R \geq 1.00$

По результатам прогноза, как в системе PASS, так и в ИТ «Микрокосм», а также по экспериментальным данным, для каждого химического класса циклических гуанидинов были подсчитаны байесовские частоты встречаемости активных по прогнозу P_h и неактивных по прогнозу P_{nh} соединений. С помощью биномиального критерия для всех парных значений P_h и P_{nh} рассчитывали вероятность их равенства Pr . Оценкой достоверности различий между P_h и P_{nh} служил коэффициент информативности K_{Pr} , принимающий следующие целочисленные значения: 0, если $Pr \geq 0,2$ – различий нет; 1, если $0,1 \leq Pr < 0,2$ – очень слабые недостоверные различия (тенденция); 2, если $0,05 \leq Pr < 0,1$ – слабые недостоверные

различия; 3, если $0,01 \leq Pr < 0,05$ – выраженные достоверные различия; 4, если $0,001 \leq Pr < 0,01$ – сильные достоверные различия; 5, если $Pr < 0,001$ – очень сильные достоверные различия. Химический класс производных циклических гуанидинов считался перспективным источником гипогликемических веществ, если $P_h > P_{nh}$ – в этом случае величина K_{Pr} была положительной; если же $P_h < P_{nh}$, то класс считался неперспективным и величине K_{Pr} , присваивалось отрицательное значение. Интегральной оценкой перспективности класса в целом служила средняя величина четырех показателей K_{Pr} : одного, определенного на основании экспериментальных данных и трех, вычисленных по результатам прогноза.

Одной из задач поиска фармакологически активных веществ является выявление среди соединений различной химической структуры базовых структур, ответственных за наличие той или иной активности, в том числе ее высокого уровня. Существует много методов решения данной задачи одним из которых является подструктурный анализ. Подструктурный анализ показывает, какой тип ядра (базовой химической структуры) может обеспечить проявление среди циклических гуанидинов высокой гипогликемической активности.

Оценка статистической значимости признаков (типов базовой структуры) производилась по следующей схеме.

Подсчитывали общее число признака i в классе активности h (высокоактивные) и nh (невысокоактивные)

$$K_{ih,nh} = \frac{N_{h,nh}}{\sum_{j=1}^M K_{ij}}, \quad i = 1 \dots M,$$

где $N_{h,nh}$ – число соединений в классе h или nh ;

K_{ij} – число признака вида i в соединении j ;

M – число видов признаков.

Для каждого из M признаков подсчитывали число его выполнений в каждом из двух классов, деленное на вес класса, т.е. находили исправленное на размер класса общее число признака i в классе h и nh

$$S_{ih,nh} = \frac{K_{ih,nh}}{N_{h,nh}} \times \frac{(N_h + N_{nh})}{2}, \quad i = 1 \dots M.$$

Вычисляли Байесовскую вероятность встречаемости признака i в классе h и nh (Голендер В. Е., 1978)

$$P_{ih,nh} = \frac{S_{ih,nh} + 1}{S_{ih} + S_{inh} + 2}, \quad i = 1 \dots M.$$

Различия в частоте встречаемости признака i в классах h и nh определяли по биномиальному критерию (Глотов Н. В., 1982)

$$Z_i = \frac{\left| P_{ih} - P_{inh} \right| - \frac{1}{4 \times (S_{ih} + S_{inh})}}{\sqrt{\frac{0,5}{(S_{ih} + S_{inh})}}}, \quad i = 1 \dots M.$$

По величине биномиального критерия определяли значимость влияния признака i на наличие или отсутствие высокой антиоксидантной активности

$$Pr_i = 1 - N(Z_i),$$

где N – функция стандартного нормального распределения с параметрами (0,1).

Одной из актуальных задач, решаемых при поиске новых фармакологически активных веществ, является нахождение базовых химических структур, ответственных за проявление высокого уровня изучаемой активности. В рамках данной работы для выявления базовых структур производных циклических гуанидинов, ответственных за высокий уровень гипогликемической активности, был применен метод медианного оценивания.

Показано, что математическое ожидание величины активности в ряду соединений одного и того же химического класса является показателем вклада базовой структуры в активность соединений данного ряда (В.Е. Голендер, 1972). В случае отсутствия информации о характере распределения, несмещенной и состоятельной оценкой математического ожидания является медиана (середина упорядоченного ряда наблюдений):

$$M(X) = \text{med}_{i=1}^N (X_i),$$

где N – число наблюдений;

X_i – значения переменной X для i -го наблюдения, $i=1 \dots N$

При увеличении объема выборки медианная оценка асимптотически приближается к максимуму функции распределения, описывающей зависимость «структура – активность».

В частности, такой подход используется в методе Фри-Уилсона (Free, S. M., 1964) для определения вклада базовой структуры в активность того или иного соединения. Таким образом, рассчитывая медианы в ряду активности соединений нескольких классов, мы получаем состоятельные несмещенные оценки вкладов базовых структур каждого конкретного класса в общую активность этих химических соединений.

Метод супремального оценивания был применен для выявления влияния вводимых заместителей на уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов. Высокая лабильность базовой химической структуры порождает увеличение дисперсии в ряду значений активности соединений, содержащих различные заместители. Поскольку поиск новых лекарственных веществ ориентирован прежде всего на высокоактивные соединения, то для оценки перспективности анализируемого класса, с точки зрения усиления активности базовой структуры, имеет смысл рассматривать супремальные оценки ряда, т.е. оценки, отражающие максимальные значения показателя фармакологической активности.

Наиболее естественным способом оценки вариабельности в данном случае является функция максимума

$$\sup(X) = \max_{i=1}^N (X_i),$$

где N – число наблюдений;

X_i – значения переменной X для i -го наблюдения, $i=1 \dots N$.

При увеличении объема выборки функция максимума асимптотически приближается к супремуму функции, описывающей зависимость «структура –

активность». Таким образом, максимальное значение среди всех полученных экспериментальных величин активности отражает степень влияния на базовую структуру вводимых в эту структуру заместителей, усиливающих активность соединения.

2.2. Перспективность производных циклических гуанидинов как источников веществ с гипогликемической активностью (анализ *in silico*)

2.2.1 Прогноз в системе PASS наличия противодиабетической активности производных циклических полных гуанидинов

Прогноз в системе PASS показал перспективность нескольких классов из всех изученных циклических полных гуанидинов, результаты представлены в табл. 3 и на рис. 8.

Таблица 3 – Перспективность классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в PASS антидиабетической активности

Химический класс	N	N _a	N _a , %	P _a	P _{na}	z	Pr	K _{Pr}
2-АмБИ	86	30	34,9	0,35 2	0,64 0	3,88	1*10 ⁻³	-5
2-ИмиБИ	124	105	84,7	0,84 1	0,15 0	10,8 0	1*10 ⁻³	5
N ¹ ,N ⁹ -ДгИмБИ	4	1	25,0	0,33 3	0,66 0	1,01	1,5*10 ⁻²	-1
N ¹ ,N ⁹ -ИмБИ	2	0	0,0	0,25 0	0,75 0	1,23	1,1*10 ⁻²	-1
N ¹ -ДгИмБИ	22	7	31,8	0,33 3	0,66 0	2,23	1,2*10 ⁻³	-3
N ¹ -ИмБИ	121	120	99,2	0,98 3	0,02 0	15,1 4	1*10 ⁻⁴	5
N ⁹ - ДгИмБИ	78	76	97,4	0,96 2	0,03 0	11,6 6	1*10 ⁻⁴	5
N ⁹ - ИмБИ	484	346	71,5	0,71 4	0,28 0	13,3 2	1*10 ⁻⁴	5
ПрмБИ	87	83	95,4	0,94 3	0,05 0	11,8 0	1*10 ⁻⁴	5
ТрзиБИ	7	2	28,6	0,33 3	0,66 0	1,29	9,7*10 ⁻³	-2
ТрзоБИ	20	7	35,0	0,36 3	0,63 0	1,73	4,1*10 ⁻³	-3

Примечание. N – общее число соединений в классе.

N_a – число соединений, проявляющих гипогликемическую активность.

$N_a, \%$ - процент соединений, проявляющих гипогликемическую активность.

P_a – вероятность наличия гипогликемической активности в классе.

P_{na} – вероятность отсутствия гипогликемической активности в классе.

z - биномиальный критерий.

P_r – вероятность равенства значений P_a и P_{na} (достоверность различий).

K_{Pr} – коэффициент информативности.

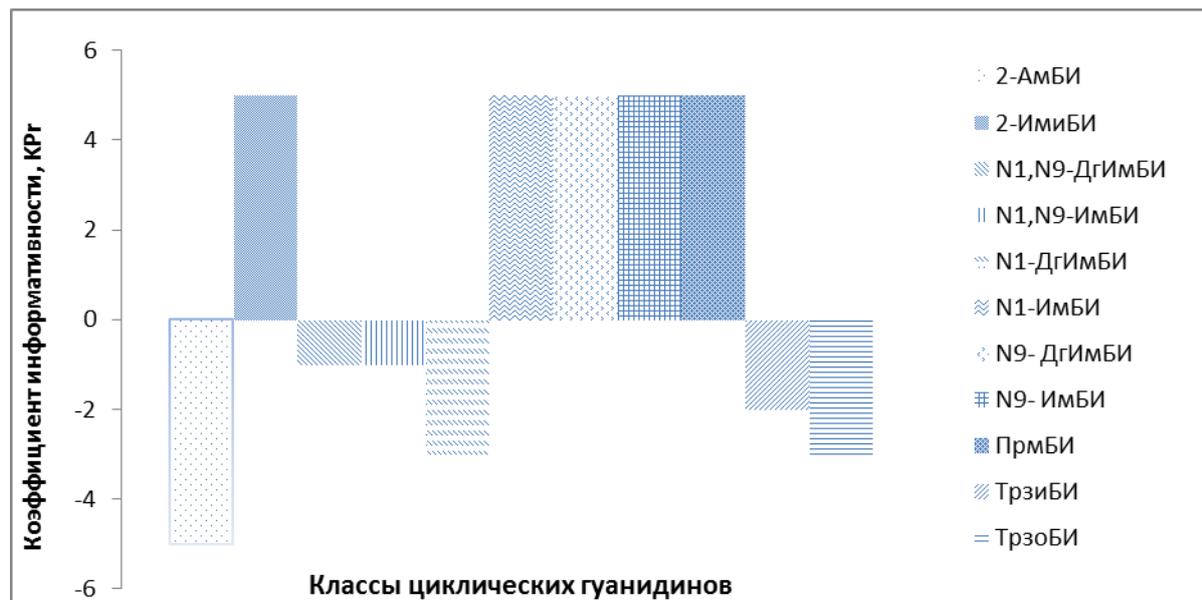


Рис. 8 – Перспективность классов циклических гуанидинов по результатам прогноза в PASS антидиабетической активности

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, N^1 -имидазо[1,2-а]бензимидазола, N^9 -2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола, N^9 -имидазо[1,2-а]бензимидазола, 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2а]бензимидазола.

2.2.2 Прогноз в ИТ «Микрокосм» наличия гипогликемической активности производных циклических гуанидинов

Анализ перспективности классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" по выборке известных противодиабетических препаратов приведены в табл. 4 и на рис. 9.

Таблица 4 – Анализ перспективности классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" антидиабетической активности

Химический класс	N	N _a	N _a , %	P _a	P _{na}	z	P _r	K _{Pr}
2-АмБИ	86	52	60.5	0.60 2	0.39 0	2.67	3,7*10 ⁻³	4
2-ИмиБИ	124	73	58.9	0.58 7	0.41 0	2.74	3,1*10 ⁻³	4
N ¹ ,N ⁹ -ДгИмБИ	4	4	100.0	0.83 3	0.16 0	2.16	1,5*10 ⁻³	3
N ¹ ,N ⁹ -ИмБИ	2	1	50.0	0.50 0	0.50 0	-0.17	5,7*10 ⁻²	0
N ¹ -ДгИмБИ	22	22	100.0	0.95 8	0.04 0	6.27	1*10 ⁻⁴	5
N ¹ -ИмБИ	121	55	45.5	0.45 5	0.54 0	1.37	8,5*10 ⁻²	-2
N ⁹ - ДгИмБИ	78	73	93.6	0.92 5	0.07 0	10.7 1	1*10 ⁻⁴	5
N ⁹ - ИмБИ	484	14 2	29.3	0.29 4	0.70 0	12.8 1	1*10 ⁻⁴	-5
ПрмБИ	87	60	69.0	0.68 5	0.31 0	4.90	1*10 ⁻⁴	5
ТрзиБИ	7	6	85.7	0.77 7	0.22 0	2.23	1,2*10 ⁻²	3
ТрзоБИ	20	10	50.0	0.50 0	0.50 0	-0.07	5,3*10 ⁻¹	0

Примечание. N – общее число соединений в классе.

N_a – число соединений, проявляющих гипогликемическую активность.

N_a, % - процент соединений, проявляющих гипогликемическую активность.

P_a – вероятность наличия гипогликемической активности в классе.

P_{na} – вероятность отсутствия гипогликемической активности в классе.

z- биномиальный критерий.

P_r – вероятность равенства значений P_a и P_{na} (достоверность различий).

K_{Pr} – коэффициент информативности.

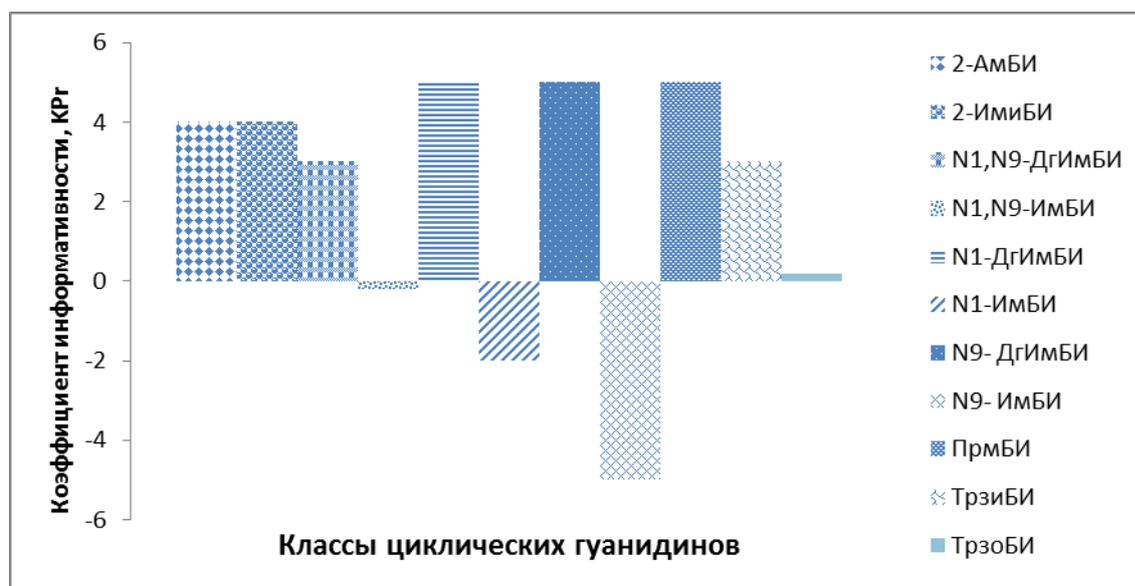


Рис. 9 – Перспективность классов циклических гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" антидиабетической активности

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, N^1, N^9 -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола, N^1 -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола, N^9 -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.

2.2.3 Прогноз в ИТ «Микрокосм» уровня гипогликемической активности производных циклических гуанидинов.

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:

оценка перспективности классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" наличия гипогликемической активности (табл. 5);
оценка перспективности классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" выраженной гипогликемической активности (табл. 6);
оценка перспективности классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" высокой гипогликемической активности (табл. 7).

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 в табл. 5 и на рис. 10.

Таблица 5 – Перспективность классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" наличия гипогликемической активности

Химический класс	N	N _a	N _a , %	P _a	P _{на}	z	P _r	K _{Pr}
2-АмБИ	86	13	15,1	0,159	0,840	9,00	1*10 ⁻⁵	-5
2-ИмиБИ	124	113	91,1	0,904	0,090	12,83	1*10 ⁻⁵	5
N ¹ ,N ⁹ -ДгИмБИ	4	4	100,0	0,833	0,160	2,16	1,5*10 ⁻²	3
N ¹ ,N ⁹ -ИмБИ	2	2	100,0	0,750	0,250	1,23	1*10 ⁻¹	1
N ¹ -ДгИмБИ	22	14	63,6	0,625	0,370	1,65	4,8*10 ⁻²	3
N ¹ -ИмБИ	121	113	93,4	0,926	0,070	13,32	1*10 ⁻⁵	5
N ⁹ - ДгИмБИ	78	54	69,2	0,687	0,310	4,70	1*10 ⁻⁵	5
N ⁹ - ИмБИ	484	474	97,9	0,977	0,020	29,74	1*10 ⁻⁵	5
ПрмБИ	87	74	85,1	0,842	0,150	9,10	1*10 ⁻⁵	5
ТрзиБИ	7	5	71,4	0,666	0,330	1,29	9,7*10 ⁻²	2
ТрзоБИ	20	17	85,0	0,818	0,180	4,14	1*10 ⁻⁵	5

Примечание. N – общее число соединений в классе.

N_a – число соединений, проявляющих гипогликемическую активность.

N_a, % - процент соединений, проявляющих гипогликемическую активность. P_a – вероятность наличия гипогликемической активности в классе.

P_{на} – вероятность отсутствия гипогликемической активности в классе.

z- биномиальный критерий.

P_r – вероятность равенства значений P_a и P_{на} (достоверность различий).

K_{Pr} – коэффициент информативности.

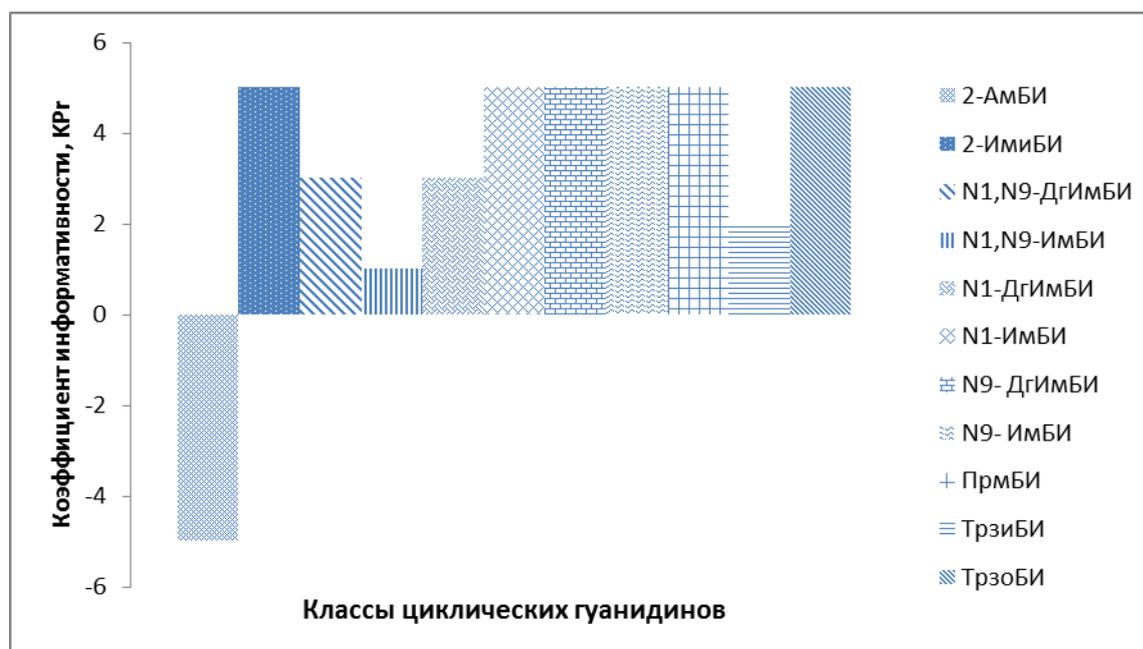


Рис. 10 – Перспективность классов циклических гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" наличия гипогликемической активности

По данным прогноза наличия гипогликемической активности производных циклических полных гуанидинов были выделены несколько классов, имеющие рассчитанный показатель K_{PI} 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 (табл. 6 и на рис. 11).

Таблица 6 – Перспективность классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" выраженной гипогликемической активности

Химический класс	N	N _a	N _a , %	P _a	P _{na}	z	P _r	K _{Pr}
2-АмБИ	86	11	12,8	0,136	0,86	4,75	1*10 ⁻⁴	-5
2-ИмиБИ	124	24	19,4	0,198	0,80	4,75	1*10 ⁻⁴	-5
N ¹ ,N ⁹ -ДгИмБИ	4	4	100,0	0,833	0,16	1,01	1,5*10 ⁻¹	1
			100,0	0,750	0,25	0,53	2,9*10 ⁻¹	0
N ¹ ,N ⁹ -ИмБИ	2	2						
N ¹ -ДгИмБИ	22	13	59,1	0,583	0,41	0,50	3*10 ⁻¹	0
N ¹ -ИмБИ	121	27	22,3	0,227	0,77	4,23	1*10 ⁻⁴	-5
			70,5	0,700	0,30	2,49	6,4*10 ⁻³	4
N ⁹ - ДгИмБИ	78	55						
N ⁹ - ИмБИ	484	100	20,7	0,207	0,79	9,09	1*10 ⁻⁴	-5
ПрмБИ	87	69	79,3	0,786	0,21	3,78	1*10 ⁻⁴	5
ТрзиБИ	7	2	28,6	0,333	0,66	0,5	2,7*10 ⁻¹	0
ТрзоБИ	20	1	5,0	0,090	0,90	2,63	4,2*10 ⁻³	-4

Примечание. N – общее число соединений в классе.

N_a – число соединений, проявляющих гипогликемическую активность.

N_a, % - процент соединений, проявляющих гипогликемическую активность.

P_a – вероятность наличия гипогликемической активности в классе.

P_{na} – вероятность отсутствия гипогликемической активности в классе.

z- биномиальный критерий.

P_r – вероятность равенства значений P_a и P_{na} (достоверность различий).

K_{Pr} – коэффициент информативности.

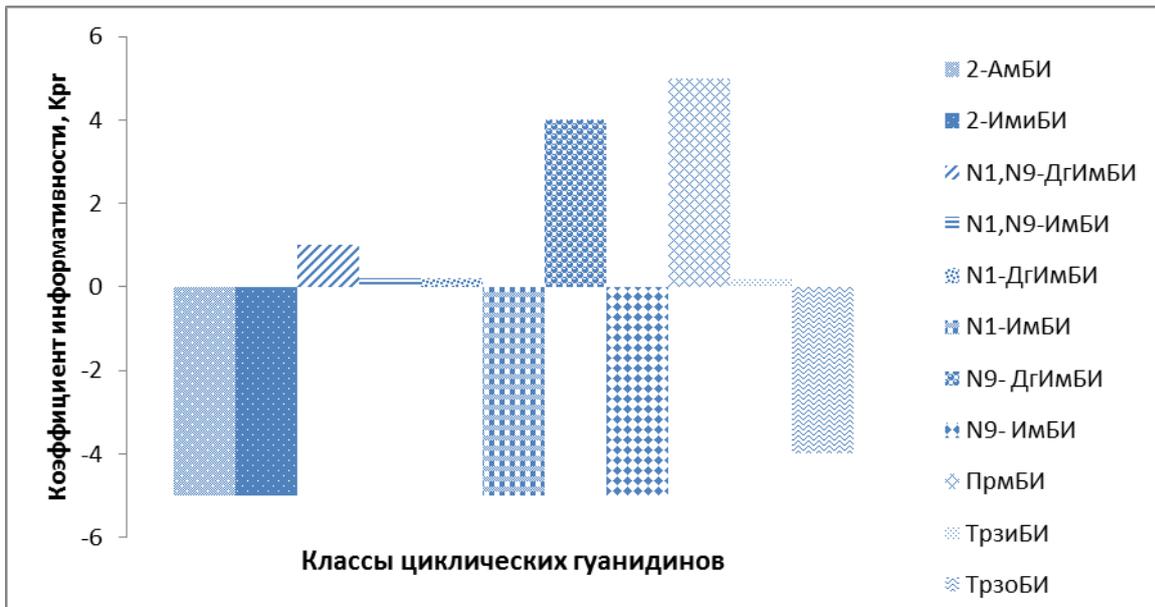


Рис. 11 – Перспективность классов циклических гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" выраженной гипогликемической активности

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 в табл. 7 и на рис. 12.

Таблица 7 – Перспективность классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" высокой гипогликемической активности

Химический класс	N	N _a	N _a , %	P _a	P _{na}	z	P _r	K _{Pr}
2-АмБИ	86	34	39.5	0.397	0.60	1.92	2*10 ⁻²	3
2-ИмиБИ	124	52	41.9	0.420	0.57	2.67	3*10 ⁻³	4
N ¹ ,N ⁹ -ДгИмБИ	4	4	100.0	0.833	0.16	1.87	3*10 ⁻²	3
N ¹ ,N ⁹ -ИмБИ	2	0	0.0	0.250	0.75	0.17	5,7*10 ⁻¹	0
N ¹ -ДгИмБИ	22	6	27.3	0.291	0.70	0.21	4,1*10 ⁻¹	0
N ¹ -ИмБИ	121	39	32.2	0.325	0.67	1.14	1,2*10 ⁻¹	1
N ⁹ - ДгИмБИ	78	27	34.6	0.350	0.65	1.22	1,1*10 ⁻¹	1
N ⁹ - ИмБИ	484	164	33.9	0.339	0.66	2.77	2*10 ⁻³	4
ПрмБИ	87	34	39.1	0.393	0.60	2.81	2,5*10 ⁻³	4
ТрзиБИ	7	3	42.9	0.444	0.55	0.35	3,6*10 ⁻¹	0
ТрзоБИ	20	12	60.0	0.590	0.40	1.13	1,2*10 ⁻¹	1

Примечание. N – общее число соединений в классе.

N_a – число соединений, проявляющих гипогликемическую активность.

N_a, % - процент соединений, проявляющих гипогликемическую активность.

P_a – вероятность наличия гипогликемической активности в классе.

P_{na} – вероятность отсутствия гипогликемической активности в классе.

z- биномиальный критерий.

P_r – вероятность равенства значений P_a и P_{na} (достоверность различий).

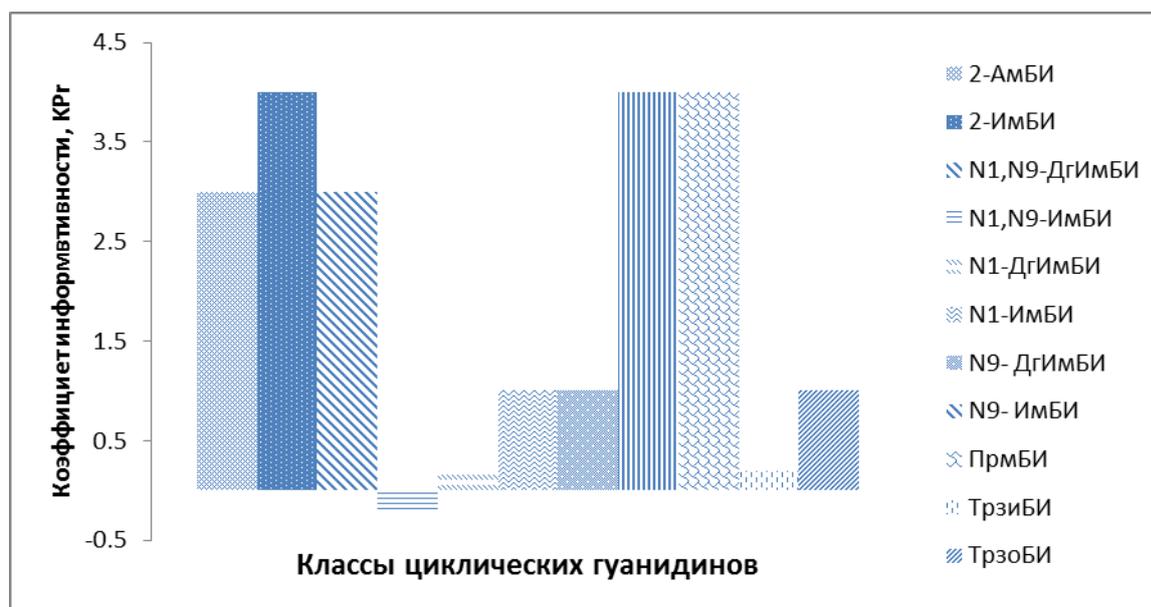


Рис. 12 – Перспективность классов циклических гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" высокого уровня гипогликемической активности

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; N¹,N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]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; 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.

2.2.4 Подструктурный анализ перспективности различных классов циклических полных гуанидинов.

В данном анализе 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 в табл. 8 и на рис. 13.

Таблица 8 – Подструктурный анализ влияния типа ядра на высокую гипогликемическую активность производных циклических гуанидинов

Тип ядра	N	P _h	P _{nh}	z	Pr	K _{Pr}
2-АмБИ	11	0.112	0.887	3.15	8*10 ⁻⁴	-5
N ⁹ - ИмБИ	7	0.305	0.694	2.35	9,5*10 ⁻³	-4
N ¹ - ИмБИ	3	0.607	0.393	0.58	2,8*10 ⁻¹	0
N ⁹ - ДгИмБИ	35	0.598	0.401	1.77	3,8*10 ⁻²	3
N ¹ - ДгИмБИ	22	0.556	0.444	0.41	3,4*10 ⁻¹	0
ПрмБИ	30	0.585	0.415	1.37	8,5*10 ⁻²	2

Примечание. N - число соединений;

P_h - байесовская вероятность встречаемости в классе высокоактивных соединений;

P_{nh} - байесовская вероятность встречаемости в классе не высокоактивных соединений;

z - биномиальный критерий (имеет нормальное распределение);

Pr - достоверность различий P_h и P_{nh};

K_{Pr} - коэффициент информативности различий P_h и P_{nh}

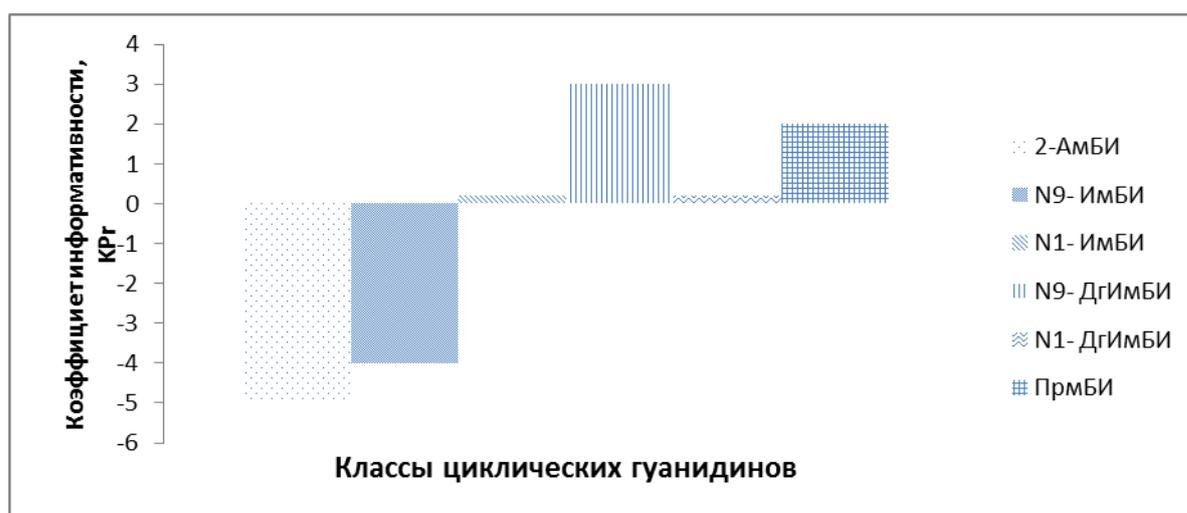


Рис. 13 – Подструктурный анализ влияния типа ядра на высокую гипогликемическую активность производных циклических гуанидинов

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 (N₉-ИмБИ) – коэффициент информативности $K_{Pr} = -4$ ($Pr = 0,0095$). В отношении производных N¹-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 N¹- 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 N⁹-ДгИмБИ.

2.2.5 Оценка перспективности различных классов циклических полных гуанидинов методом медианного и супремального оценивания.

Для оценки перспективности изучаемых циклических гуанидинов методом медианного и супремального оценивания были изучены производные семи химических классов: 2-амино-бензимидазола; N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N¹-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N¹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола; N¹,N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола; 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола. Соответствующие структурные формулы приведены на рисунке 3.

При обработке результатов анализа производные N¹,N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и N¹-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 в табл. 9 и на рис. 14.

Таблица 9 – Медианные оценки гипогликемической активности классов циклических гуанидинов

Химический класс	Число соединений	Медиана Ind _R	K _{Pr} *
N ¹ -ДгИмБИ	7	0,87	+2
ПрмБИ	30	0,88	+2
N ⁹ - ИмБИ	22	0,93	+1
N ⁹ - ДгИмБИ	35	0,95	+1
2-АмБИ	11	1,10	-2

* По экспертной оценке, с шагом $\Delta \text{Ind}_R=0,1$; величина $\text{Ind}_R=1,00$ соответствует $K_{Pr}=0$.

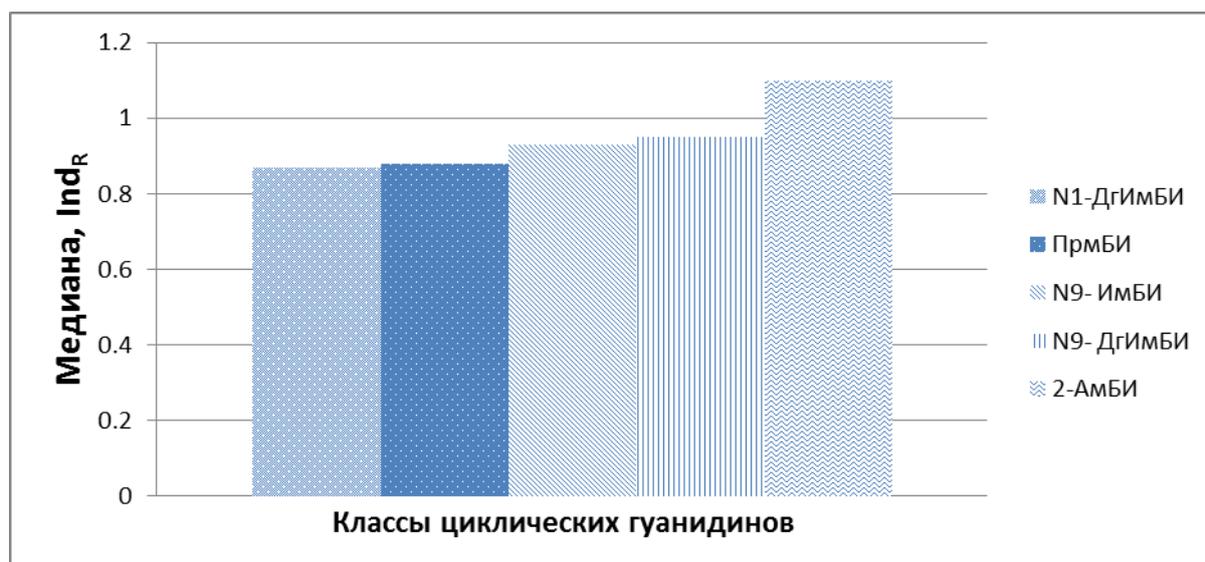


Рис. 14 – Медианные оценки гипогликемической активности классов циклических гуанидинов

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_{Pr}=-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 в табл. 10 и рис. 15.

Таблица 10 – Супремальные оценки гипогликемической активности классов циклических гуанидинов

Химический класс	Число соединений	Максимум 1-Ind _R ¹⁾	K _{Pr} ²⁾
N ¹ -ДгИмБИ	7	0,23	+3
ПрмБИ	30	0,28	+3
N ⁹ - ИмБИ	22	0,33	+4
N ⁹ - ДгИмБИ	35	0,36	+4
2-АмБИ	11	0,12	+2

Примечание: 1) 1-Ind_R отражает снижение концентрации глюкозы в крови подопытных животных;

2) По экспертной оценке, с шагом $\Delta \text{Ind}_R=0,1$.

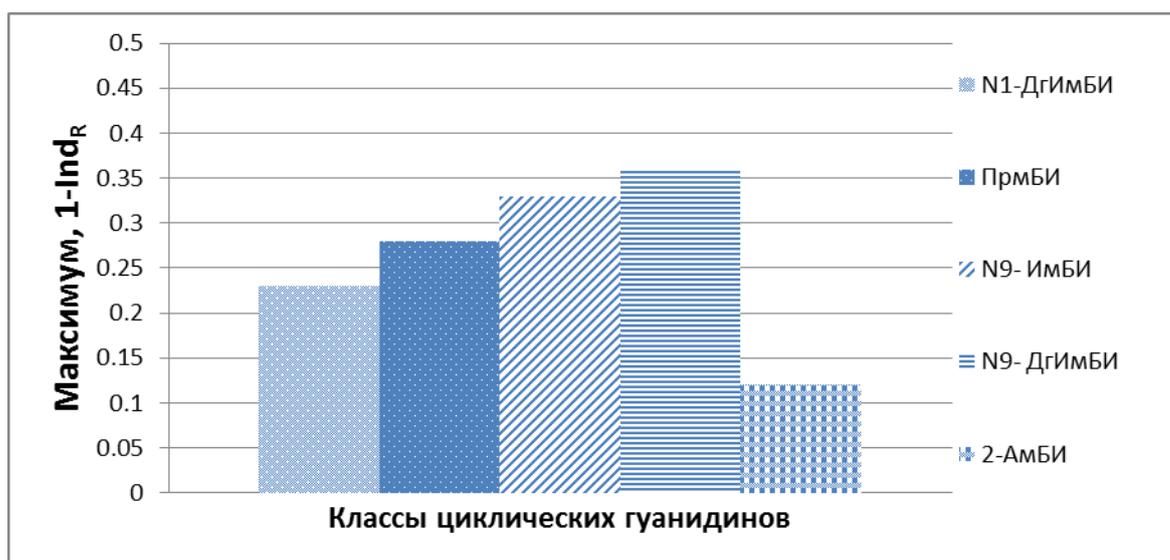


Рис. 15 – Супремальные оценки гипогликемической активности классов циклических гуанидинов

Наиболее лабильной структурой в отношении заместителей, повышающих уровень гипогликемической активности, являются 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.

2.2.6 Консенсусный анализ перспективности различных классов циклических полных гуанидинов.

Под консенсусным анализом подразумевают метод принятия решения на основе оценок, полученных несколькими способами (Opitz, 1999); (Baurin, 2004; Izenman, 2008; Weisswenger P., 2003). Данные консенсусного анализа перспективности циклических гуанидинов как источников веществ с гипогликемической активностью приведены в табл. 11 и на рис. 16.

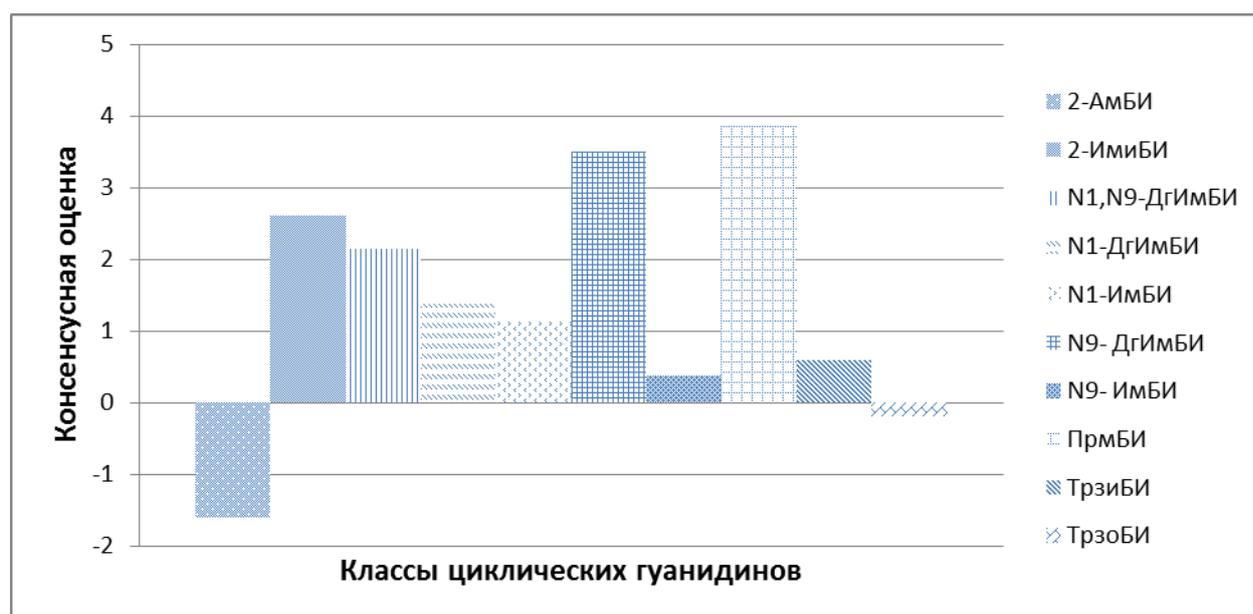


Рис. 16 – Перспективность классов циклических гуанидинов как источников веществ с гипогликемической активностью по результатам консенсусного анализа

По данным консенсусного анализа результатов прогноза гипогликемической активности все исследуемые производные циклических гуанидинов можно объединить в следующие группы;

неперспективные классы ($K_{PT} < 1$) - 2-АмБИ; N¹-ИмБИ; N⁹-ИмБИ; ТрзиБИ; ТрзоБИ;

малоперспективные классы ($1 < K_{PT} < 2$) - N¹,N⁹-ДгИмБИ; N¹-ДгИмБИ;

умеренно перспективный класс ($2 < K_{Pr} < 3$) - 2-ИмиБИ;

весьма перспективные классы ($K_{Pr} > 3$) - N⁹-ДгИмБИ; ПрмБИ.

Таким образом, использование консенсусного анализа для обобщения всех

Таблица 11 – Консенсусный анализ перспективности циклических гуанидинов как источников веществ с гипогликемической активностью

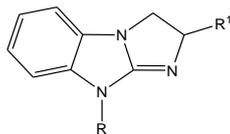
Химический класс	Коэффициент информативности K_{PI}								
	Прогноз в PASS наличия активности	Прогноз в ИТ «Микрокосм»				Статистическая оценка			Среднее
		По выборке препарата в	По выборке испытанных веществ			Подструктурный анализ	Медианная оценка	Супремальная оценка	
			Наличие активности	Наличие активности	Высокая или умеренная активность				
2-АмБИ	-5	4	-5	-5	3	-5	-2	2	-1,63
2-ИмиБИ	5	4	5	-5	4	—	—	—	2,60
N ¹ N ⁹ -ДгИмБИ	-1	3	3	1	3	—	—	—	1,80
N ¹ -ДгИмБИ	-3	5	3	0	0	0	2	3	1,25
N ¹ -ИмБИ	5	-2	5	-5	1	0	—	—	0,67
N ⁹ -ДгИмБИ	5	5	5	4	1	3	1	4	3,50
N ⁹ -ИмБИ	5	-5	5	-5	4	-4	1	4	0,63
ПрмБИ	5	5	5	5	4	2	2	3	3,88
ТрзиБИ	-2	3	2	0	0	—	—	—	0,60
ТрзоБИ	-3	0	5	-4	1	—	—	—	-0,20

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.

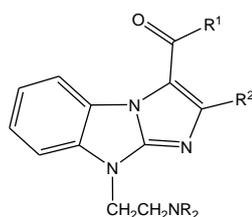
2.2.7. Анализ перспективности различных классов циклических гуанидинов.

Известно, что одним из представителей полностью встроенных циклических гуанидинов является имидазобензимидазол. Противодиабетическая активность производных имидазобензимидазола – один из видов фармакологической активности, который привлекает многих исследователей (Спасов А.А., 2005, Дудченко Г.П., 2005), так как дает возможность создания лекарственных средств для лечения сахарного диабета.

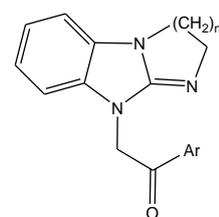
Так, по данным интернет-анализа производные 2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]-бензимидазола, которые являются полностью встроенными циклическими гуанидинами, проявляют гипогликемический эффект. В работе (В. А. Анисимова, 1987) показано, что 2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]-бензимидазолы (I) проявляют гипогликемическую активность. Установлено, что при введении в базовую структуру (I) в качестве заместителей R метила, этила или бутила максимальный гипогликемический эффект соединений развивался к 4 часу. Если же заместителями R были пропил или пиперидиноэтил, то максимальный эффект развивался ко 2 часу. Все производные 2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]-бензимидазола (I) по гипогликемическому действию превосходили препарат сравнения хлорпропамид (4-хлор-N-[(пропиламино)карбонил]бензолсульфонамид), однако они были менее эффективны, чем другой препарат сравнения – буформин (1-бутилбигуанид).



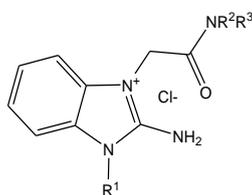
I



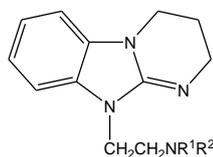
II



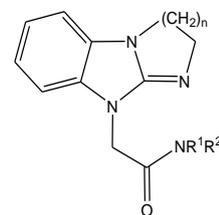
III



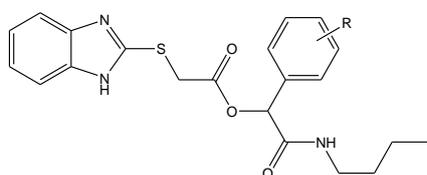
IV



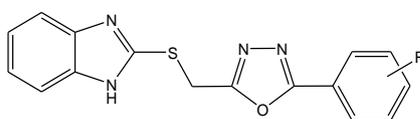
V



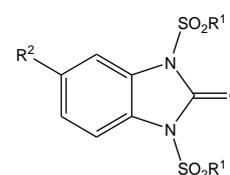
VI



VII



VIII



IX

Более поздние работы также подтвердили гипогликемический потенциал конденсированных циклических гуанидинов. Была экспериментально изучена гипогликемическая активность 3-(ароил)- и 3-(гетароил)-имидазо[1,2-а]бензимидазолов (II) (В. А. Анисимова, 2007). При изучении фармакологических свойств этих производных выяснили, что не все исследуемые вещества оказывают гипогликемическое действие. Из 14 веществ через 4 часа после введения статистически достоверный гипогликемический эффект проявляет шесть соединений.

В дальнейшем был осуществлен синтез и изучена фармакологическая активность ароилметилзамещенных конденсированных трициклических бензимидазолов, которые представляют собой полные циклические гуанидины (III). Показано, что большинство из изученных соединений в той или иной степени снижают содержание глюкозы в крови (В. А. Анисимова, 2012). Самыми активными оказались вещества, в структуру которых в качестве арильного заместителя входил 4-гидроксифенильный радикал. Эти соединения оказывали стойкий сахароснижающий эффект, существенно превосходящий активность препарата сравнения хлорпроаида.

При введении ацетамидной группировки в различные гетероциклы были получены соединения с широким спектром фармакологического действия, включая гипогликемические свойства (В. А. Анисимова, 2012). Показано, что среди хлоридов 3-(*N,N*-дизамещенных) ацетамидо- N^1 -замещенного 2-амидобензимидазолия (IV), которые являются полными частично встроенными циклическими гуанидинами, есть вещества с высоким и длительным гипогликемическим эффектом.

При изучении 10-диалкиламиноэтил-2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-*a*] бензимидазолов (полные циклические гуанидины) (V) было установлено, что для исследованных соединений характерно наличие гипогликемического действия (В. А. Анисимова, 2012; Симонов А. М., 1973).

N-ацетамидные производные конденсированных трициклических бензимидазольных систем, имеющие в своем составе внешнее гидрированное имидазольное или пиримидиновое кольцо (VI), также проявляют гипогликемическую активность. Из 20 испытанных соединений девять по степени снижения уровня глюкозы превосходят препарат сравнения метформин (I. Shaikh, 2012; Карпов Ю. А., 2010; Puggiero-Lopez D., 1999).

В проведенных экспериментах было установлено, что замещенные амиды 2,3-дигидро-имидазо- и 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо-[1,2-*a*] бензимидазолил-*N*-уксусной кислоты (VI) проявляют гипогликемическую активность с разной степенью выраженности эффекта. Соединения, имеющие в качестве заместителя NR^1R^2 аминогруппу или пиперидин, стабильно в течение 6 часов снижали уровень сахара в крови (Thakare P. V., 2011; Bergans N., 2000).

Ряд производных бензимидазола, проявляющих гипогликемическую и антидиабетическую активность, относятся к производным меркаптобензимидазола (неполные частично встроенные циклические гуанидины). Так, в работе (R. V. Shingalapur, 2010) исследованы производные 1-*H*-бензимидазол-2-ил-сульфанил-уксусной кислоты в форме эфиров амида миндальной кислоты (VII). На модели аллоксанового диабета установлено, что на девятый день введения этих соединений отмечается выраженный

гипогликемический эффект. Наибольшая активность соединений проявляется при введении в структуру (VII) следующих групп: 2-OCH₃; 4-OCH₃; 4-NO₂; 4-Cl; 2,4-Cl. Для этих же веществ характерно снижение толерантности к глюкозе.

В работе (B. Goswami, 2012) показано, что производные 2-(5-фенил-[1,3,4]-оксадиазол-2-илметилсульфанил)-1H-бензимидазола (VIII) проявляют гипогликемическую активность.

Была изучена и подтверждена антидиабетическая активность *N,N*-ди(арил-сульфонил)бензимидазолов (IX) в тесте на секрецию инсулина в культуре клеток INS-1 (Шестакова М.В., 2007). Эти соединения содержат мочевиновую группировку и являются неполными частично встроенными циклическими гуанидинами.

Таким образом, по результатам анализа 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.

2.3. Планирование экспериментального скрининга гипогликемических свойств у производных циклических гуанидинов различных классов.

При планировании экспериментального скрининга в рамках многоуровневого иерархического консенсуса обобщались три группы оценок, полученных разными способами.

Первая группа оценок формировалась на основе прогноза уровней активности каждого из новых неиспытанных соединений с помощью ИТ "Микрокосм" и системы PASS. При прогнозе в ИТ "Микрокосм" использовались две различные обучающие выборки: первая включала известные гипогликемические вещества, данные по которым были взяты из литературы; вторая содержала информацию о соединениях, изученных на кафедре фармакологии ВолгГМУ до проведения настоящего исследования. При прогнозе в ИТ "Микрокосм" по выборке из известных гипогликемических веществ оценивалось наличие или отсутствие гипогликемической активности. При

прогнозе в ИТ "Микрокосм" по выборке из ранее испытанных соединений расчетные оценки вычислялись по следующим градациям уровня гипогликемической активности: «active» - $\text{Ind}_R > 1.0$ (наличие или отсутствие активности); «high or moderate» - $0.82 \leq \text{Ind}_R < 0.9$ (выраженная активность); «high» - $\text{Ind}_R < 0.82$ (высокая активность).

Прогноз в ИТ "Микрокосм" выполнялся с использованием трех стратегий (Vassilev, 2014): консервативной, нормальной и рискованной. В каждом из четырех прогнозов соединение считалось активным, если хотя бы по одному из трех стратегий была получена положительная оценка.

При прогнозе в системе PASS соединение считалось активным, если вероятность наличия активности P_a была больше вероятности отсутствия P_i .

Таким образом, на первом этапе, для каждого неиспытанного соединения получали спектр из пяти прогнозных оценок: одна в ИТ "Микрокосм" по выборке известных гипогликемических веществ; три в ИТ "Микрокосм" по выборке из ранее испытанных соединений; одна в системе PASS.

При обобщении этого спектра прогнозных оценок использовалась методология двухуровневого частичного консенсуса.

Результаты прогноза активности каждого неиспытанного соединения были представлены в виде строки символов, состоящей из двух полей.

Первое поле содержало число положительных оценок, полученных тремя методами прогноза: в ИТ "Микрокосм" по выборке известных соединений; в ИТ "Микрокосм" по выборке из ранее испытанных веществ; в системе PASS. Прогноз считался положительным, если в данном методе хотя бы по одной из прогнозных оценок было получено положительное значение. Данный параметр может принимать значения «пусто», 1А, 2А, 3А, так как в нем учитываются результаты трех различных подходов к прогнозу.

Второе поле строки содержит общее число положительных оценок по всем градациям активности, независимо от метода прогноза. Так как градаций было пять, то данный параметр будет принимать значение от 0 до +5.

Совокупная оценка уровня активности конкретного неиспытанного соединения может выглядеть, например, так: "3A 4+". В табл. 12 приведены примеры оценки спектров прогнозной активности нескольких соединений.

Таким образом, на первом этапе, с использованием двухуровневого выборочного консенсуса, были обобщены результаты прогноза тремя различными методами пяти градаций гипогликемической активности.

Полученные прогнозные оценки в виде строки символов переводили в баллы:

+5 – "3A 5+", "3A 4+", "3A 4+", "3A 3+";

+4 – "2A 4+", "2A 4+", "2A 3+", "2A 3+", "2A 3+", "2A 3+";

+3 – "2A 2+";

+2 – "1A 3+", "1A 2+", "1A 2+";

+1 – "1A 1+".

Таблица 12 – Пример оценки прогнозных спектров гипогликемической активности некоторых новых неиспытанных производных циклических гуанидинов

Шифр	Спектр прогнозных оценок	Прогноз в PASS наличия активности	Прогноз в ИТ «Микрокосм»			
			По выборке препаратов	По выборке испытанных веществ		
			Наличие активности	Наличие активности	Высокая или умеренная активность	Высокая активность
РУ-1180	3А 5+	+	+	+	+	+
РУ-1220	3А 4+	+	+	+	—	+
АЦИ-004	3А 3+	+	+	+	—	—
РУ-520	2А 4+	+	—	+	+	+
РУ-560	2А 3+	—	+	+	+	—
РУС-0079	2А 2+	—	+	+	—	—
РУ-523	1А 3+	—	—	+	+	+
РУС 0082	1А 2+	—	—	—	+	+
РУС-0080	1А 1+	—	+	—	—	—

На втором этапе к рассчитанным ранее для каждого вещества оценкам спектра гипогликемической активности в баллах добавляли расчетные оценки в баллах (от -5 до +5) перспективности класса, к которому это соединение принадлежит:

по наличию активности "Active" - в ИТ "Микрокосм" по выборке известных препаратов;

по наличию активности "Active" - в ИТ "Микрокосм" по выборке из ранее испытанных производных гуанидинов;

по выраженному уровню активности "High or Moderate" - в ИТ "Микрокосм" по выборке из ранее испытанных производных гуанидинов;

по высокому уровню активности "High" - в ИТ "Микрокосм" по выборке из ранее испытанных производных гуанидинов;

по наличию активности в системе PASS.

Таким образом, на первых двух этапах обобщались прогнозные оценки перспективности наличия у соединения гипогликемической активности, полученные только методами *in silico*.

На третьем этапе ко всем ранее полученным шести расчётным оценкам в баллах добавили оценку в баллах (от -5 до +5) перспективности класса, к которому это соединение принадлежит, по результатам подструктурного анализа ранее испытанных производных циклических гуанидинов (подглава 2.2.4). По смыслу, эта оценка учитывает, прежде всего, экспериментальные данные. Общей оценкой перспективности каждого нового соединения служило среднее значение всех семи вышеописанных индексов.

В соответствии с рассчитанными величинами, для последующего экспериментального скрининга, были отобраны вещества, имеющие достаточно высокие индексы перспективности.

В последующую выборку были добавлены:

соединения классов триазино[2,3-а]бензимидазола, триазоло[1,5-а] бензимидазола и N₁,N₉-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола (недостаточно изученные ранее);

2-амино-бензимидазолы (с целью подтверждения различий между 2-амино и 2-имино-бензимидазолами);

вещества, сходные с ранее испытанными соединениями, найденными в результате анализа доступной информации о гипогликемической активности производных циклических гуанидинов, исследованных мировым научным сообществом; ряд неактивных по прогнозу веществ, с целью более точной оценки ошибки первого рода.

В результате была сформирована итоговая выборка для экспериментального скрининга, прогнозные характеристики некоторых соединений из которой приведены в табл.13. Полностью все данные приведены в приложении, табл. 2.3.1п1.

Таблица 13 – Пример прогнозных характеристик некоторых новых производных циклических гуанидинов, отобранных для экспериментального скрининга

Шифр	Химический класс	Индекс перспективно с-ти соединения по спектру прогнозных оценок активности	Индекс перспективности химического класса					Среднее	
			При прогнозе в ИТ «Микрокосм»			При прогнозе в системе PASS Наличие активности	По результатам подструктурного анализа экспериментальных данных Высокая активность		
			По выборке препарата в Наличие активности	По выборке испытанных веществ					
				Наличие активности	Высокая или умеренная активность				Высокая активность
РУ-1222	ПрмБИ	5	5	5	5	4	5	2	4.43
АЦИ-10	N ⁹ -ДгИмБИ	5	5	5	4	1	5	3	4.00
АЦИ-1	2-ИмиБИ	5	4	5	-5	4	5	-5	1,86
РУ-557	N ¹ N ⁹ -ДгИмБИ	5	3	3	1	3	-1	—	2.33
РУ-458	N ⁹ -ИмБИ	5	-5	5	-5	4	5	-4	0.71
РУ-270	N ¹ -ИмБИ	4	-2	5	-5	1	5	0	1,14
РУС-83	ТрзиБИ	1	3	2	0	0	-2	—	0,67
РУС-81	ТрзоБИ	4	0	5	-4	1	-3	—	0,50
АЖИ-7	2-АмБИ	4	4	-5	-5	3	-5	-5	-1,29

2.4. Заключение.

В результате виртуального скрининга среди производных циклических гуанидинов для дальнейшего углубленного изучения были выбраны соединения следующих химических классов:

2-имино-бензимидазола;

2-амино-бензимидазола;

N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола;

N⁹-2,3-дигидро-имидазо[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.

Указанный выбор был обусловлен следующими результатами прогноза:

по данным прогноза в PASS наличия гипогликемической активности были выявлены 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;

по данным прогноза в ИТ "Микрокосм" наличия гипогликемической активности были найдены 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, 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]-бензимидазола и 2-триазино[2,3-а]бензимидазола;

по данным прогноза в ИТ "Микрокосм" наличия гипогликемической активности производных циклических полных гуанидинов были выделены классы: 2-имино-бензимидазола, N¹,N⁹-2,3-дигидро-имидазо [1,2-а]бензимидазола; N¹,N⁹-имидазо[1,2-а]бензимидазола, N¹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]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-тетрагидро-пиримидо[1,2a]бензимидазола, 2-триазино[2,3-a]бензимидазола, 2-триазоло[1,5-a] бензимидазола;

по данным прогноза в ИТ "Микрокосм" выраженной гипогликемической активности производных циклических полных гуанидинов были выделены классы: N¹,N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-a]бензимидазола, N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-a]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2a]бензимидазола;

по данным прогноза в ИТ "Микрокосм" высокой гипогликемической активности перспективности классов циклических полных гуанидинов, были выделены производные: 2-амино-бензимидазола; 2-имино-бензимидазола; N¹,N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-a]бензимидазола; N¹-имидазо[1,2-a]бензимидазола; N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-a]бензимидазола; N⁹-имидазо[1,2-a]бензимидазола; 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2a]бензимидазола; 2-триазоло[2,3-a]бензимидазола;

подструктурный анализ показал, что наиболее перспективным и статистически достоверным химическим классом производных циклических гуанидинов является класс N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-a]бензимидазола;

методом медианных оценок были выделены перспективные классы циклических гуанидинов: N¹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-a]бензимидазола, N⁹-имидазо[1,2-a]бензимидазола, N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-a]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2a] бензимидазола;

методом супремальных оценок установлено, что наиболее лабильной к введению заместителей, повышающих уровень гипогликемической активности, является структура производных N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-a]бензимидазола;

консенсусный анализ позволил выявить два наиболее перспективных класса циклических полных гуанидинов: N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-a]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-a]бензимидазола.

Таким образом, 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.

ГЛАВА 3. ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ, ОКАЗЫВАЮЩИХ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СРЕДИ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЦИКЛИЧЕСКИХ ГУАНИДИНОВ

Производные имидазобензимидазола, содержащие гуанидиновую группировку, являются природными биологически активными соединениями и являются оптимальной базой для конструирования новых лекарственных веществ. Известно, что данные структуры входят в состав многих лекарственных средств, применяемых в клинической практике. Некоторые авторы относят его к так называемым «привилегированным» молекулам (Costantino L., 2006), соединениям, проявляющим несколько видов активности и используемых для поиска новых биологически активных веществ (R. W. DeSimone, K. S. Currie, 2004). Соединения данного химического класса проявляют широкий спектр биологической и фармакологической активности, в том числе – антибактериальную, противопаразитарную, антигистаминную, противосудорожную, противовоспалительную, гипотензивную, противоопухолевую (APUImuPYgan S., 2013; Vinodkumar R., 2008), противогрибковую, противотуберкулезную, антигерпесвирусную и противовирусную в отношении гепатита С и В (Mishra D., 2010; V. Gautam, 2010); δ -опиоидную агонистическую (Salvadori S., 2009). Противодиабетическая активность производных имидазобензимидазола – один из видов фармакологической активности, который привлекает многих исследователей (Дудченко Г.П., 2005; Анисимова В.А., 2007), так как дает возможность создания лекарственных средств для лечения сахарного диабета.

В настоящее время все технологии, используемые для поиска новых препаратов для снижения уровня сахара в крови при сахарном диабете, представлены несколькими направлениями. Одно из них – это изучение гипогликемических или антидиабетогенных свойств в узких рядах конденсированных и неконденсированных азолов (Спасов А.А., Дудченко Г.П., 1995).

3.1 Материалы и методы

Все изученные при скрининге вещества были синтезированы кандидатами химических наук В.А. Анисимовой, Толпыгиным, И.Е., Кузьменко Т.А., Жуковской О.Н. на базе НИИ физической и органической химии Южного федерального университета. Кроме этого, в работе использовались субстанция и таблетки диабенола (дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2,3-дигидроимидазо[1,2- α]бензимидазола) («ООСлед» и «АКРИХИН» соответственно, Россия); субстанция метформина, («ХарманФайнокем», Индия).

При скрининге определение гипогликемической активности проводили на половозрелых нелинейных крысах-самцах (на одно вещество по 6 животных) массой 300-350 г и 100 белых неинбредных мышах обоего пола массой 15-30 г, содержащихся в условиях вивария (естественный световой режим, полноценный рацион и свободный питьевой режим) (Западнюк И.П., 1983).

Проведение экспериментов было одобрено на заседании этической комиссии 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 «МЭСТ», который является полнорационным сбалансированным по содержанию питательных веществ (таблица 14), экологически чистым, изготовленным без применения консервантов и искусственных красителей (ГОСТ Р 50258-92).

Таблица 14 – Состав лабораторного корма для животных, ООО
«Лабораторкорм»

Наименование показателя	Норма для крыс
Массовая доля сырого протеина, % не менее	22,0
Массовая доля сырой клетчатки, % не более	5,0
Массовая доля сырого жира, % не более	6,0
Массовая доля кальция, %	0,9-1,2
Массовая доля фосфора, %	0,6-0,9
Массовая доля натрия, % не менее	0,2
Массовая доля лизина, % сухого вещества не менее	1,5
Массовая доля метионина+цистеина, % сухого вещества не менее	0,9
Массовая доля триптофана, % сухого вещества не менее	0,3
Массовая доля поваренной соли по титрованию хлоридов, % не более	0,2

Изучение гипогликемического действия проводилось на белых беспородных крысах, массой 250-300 г., которые в течение 18 часов находились на свободном питьевом режиме при полной пищевой депривации. Исследуемые вещества вводились однократно в дозе 50 мг/кг (перорально). 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). Измерение оптической плотности проводилось на спектрофотометре PD-303 UVAPEL (Япония) при длине волны 500 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. Показателем гипогликемической активности служила величина С (концентрация глюкозы в крови), ммоль/л. 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.

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

Экспериментальный сахарный диабет вызывали стрептозотоцином в дозе 45 мг/кг при внутривенном введении (хвостовая вена). Диабет развивался на 3-5 сутки. После этого проводилось ежедневное пероральное введение диабенола в дозе 50 мг/кг, в течение 28 дней. Каждую неделю проводился тест толерантности к глюкозе для определения нарушения толерантности к глюкозе.

Острая токсичность активных соединений изучалась на 600 белых неинбредных мышах, прошедших карантин (в течение 14 дней), обоего пола массой 15-30 г, путем определения средней летальной дозы (LD_{50}) (Прозоровский В.Б.,1962). Мышам вводили субстанцию изучаемого соединения.

Далее в течение 4 часов отслеживались поведенческие реакции и общее состояние животных: характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координации движений, тонус скелетных мышц, реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители; частота и глубина дыхательных движений, ритм покрова, окраска слизистых оболочек, размер зрачка; положение хвоста, потребление корма и воды и другие показатели, которые могут быть использованы для выявления токсикологического эффекта. Вычисление LD_{50} проводилось по методу Личфилда-Вилкоксона в соответствии с требованиями и инструкциями Минздравсоцразвития (Миронов А.Н.,2012).

3.2. Влияние новых производных циклических гуанидинов на уровень глюкозы в крови белых беспородных крыс.

Направленный поиск новых биологически активных веществ является актуальным и своевременным, из-за возникшей потребности в создании новых гипогликемических веществ.

В настоящее время для поиска антидиабетических средств существуют разные подходы, одним из которых является скрининг гипогликемических веществ.

Скрининг необходим комплексный, с применением моделей, равнозначных нескольким звеньям развития сахарного диабета, таких как гипергликемия. Поэтому в данной главе представлены результаты исследования гипогликемической активности новых производных циклических гуанидинов.

3.2.1. Влияние производных 2-амино-бензимидазола на уровень сахара в крови белых беспородных крыс.

Всего было изучено 98 соединений (п.п.1) производных циклических гуанидинов из них 14 соединений - производные 2-амино-бензимидазола (п.п. 2), (рис 17).

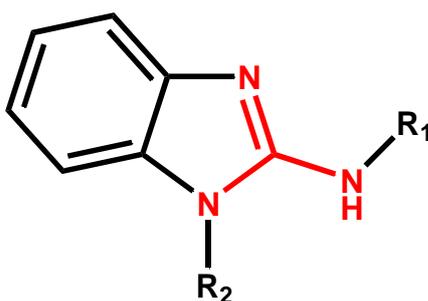


Рисунок 17 – Общая формула 2-амино-бензимидазола

По данным, изложенным в приложении 1.1, следует, что в ходе экспериментального скрининга, 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.

Величины активности производных 2-амино-бензимидазола статистически значимо снижавших уровень сахара в крови интактных животных приведены в табл. 15.

Таблица 15 – Влияние производных 2-амино-бензимидазола на уровень глюкозы в плазме крови белых беспородных крыс

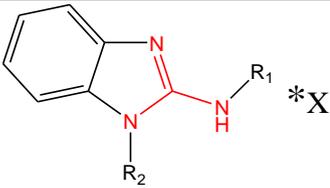
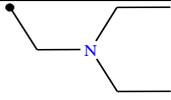
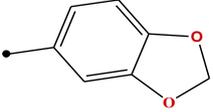
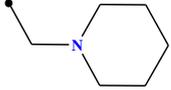
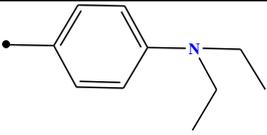
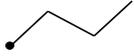
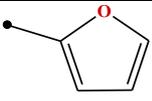
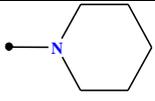
Шифр	С глюкозы, ммоль/л (M±m)	С глюкозы, ммоль/л (M±m)
	4 часа	6 часов
АЖИ - 1	2,72±0,9	2,51±0,01**
АЖИ – 9	3,06±0,09**	3,50±0,029**
АЖИ – 13	3,80±0,046**	3,40±0,4
АЖИ – 15	3,23±0,05*	2,76±0,3
метформин	3,01±0,44*	3, 64±0,05*
контроль	3,96±0,11	3,85±0,17

* - достоверно по отношению к контролю ($p \leq 0,05$)

** - достоверно по отношению к препарату сравнения (метформин) ($p \leq 0,05$)

По данным из таблицы 15 следует, соединения, под лабораторными шифрами АЖИ-13 и АЖИ-15 (табл. 16), статистически значимо понижали уровень глюкозы в крови на 4 час после введения, но по силе гипогликемического действия не превосходили метформин. Соединения АЖИ-1 и АЖИ 9 (табл.16) проявляли гипогликемический эффект к 6 часу наблюдений, превосходя препарат сравнения метформин.

Таблица 16 – Химические структуры производных 2-амино-бензимидазола

2-амино-бензимидазол			
 <p>Общая формула химического класса</p>			
Шифр	R ₁	R ₂	Солевой остаток (X)
АЖИ-1			2HCl
АЖИ-9			2HCl
АЖИ-13			2HCl
АЖИ-15			2HCl

3.2.2. Влияние производных 2-имино-бензимидазола на уровень сахара в крови белых беспородных крыс .

Всего из группы производных 2-имино-бензимидазола (формула представлена ниже) было исследовано 18 соединений (п.п.1).

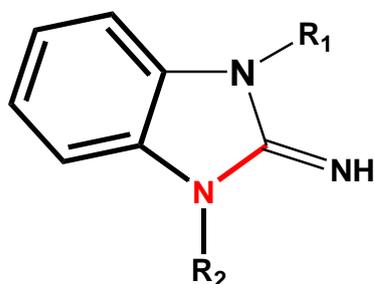


Рисунок 18 – Общая формула производных 2-имино-бензимидазола

В ходе скрининга было установлено, что гипогликемическими свойствами обладают 65% соединений из группы 2-имино-бензимидазола (по силе

гипогликемического действия не уступали метформину). Гипергликемические свойства выявлены у 26% соединений. Токсичными оказались 6% всех протестированных веществ, которые вызывали гибель животных (п.п.1). Неактивными оказались 3% соединений исследуемого класса. В ходе эксперимента была определена средняя активность в отношении гипогликемического эффекта данного класса соединений.

Величины активности производных 2-имино-бензимидазола статистически значимо снижавших уровень сахара в крови интактных животных приведены в табл. 17.

Таблица 17 – Влияние производных 2-имино-бензимидазола на уровень глюкозы в плазме крови белых беспородных крыс

Шифр	С глюкозы, ммоль/л (M±m)	
	4 часа	6 часов
АЦИ - 1	3,00±0,014**	3,41±0,05**
АЦИ – 4	2,66±0,05**	2,94±0,43
АЦИ – 10	2,59±0,002**	3,75±0,02**
АЦИ – 11	3,92±0,04**	2,64±0,02**
АЦИ – 12	3,04±0,5	3,41±0,05**
АЦИ – 14	3,06±0,6	3,27±0,04**
АЦИ – 15	2,87±0,036**	2,33±0,1
АЦИ – 18	2,94±0,005**	3,22±0,05**
метформин	3,01±0,005*	3,64±0,22
контроль	4,10±0,13	4,20±0,12

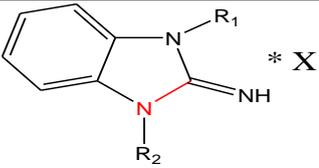
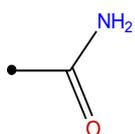
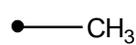
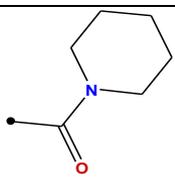
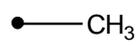
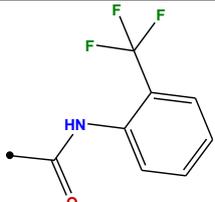
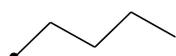
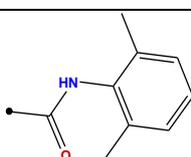
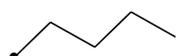
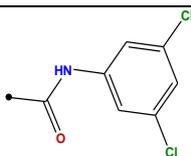
* - достоверно по отношению к контролю ($p \leq 0,05$)

** - достоверно по отношению к препарату сравнения (метформин) ($p \leq 0,05$)

Соединения, под лабораторными шифрами АЦИ-1, АЦИ-4, АЦИ-10, АЦИ-15 и АЦИ-18 (табл. 18), статистически значимо снижали уровень сахара в крови интактных животных на 4 час после введения соединений и по силе гипогликемического действия превосходили препарат сравнения метформин. Соединения АЦИ-1, АЦИ-9, АЦИ-11, АЦИ-12, АЦИ-14 и АЦИ-18 (табл.18)

проявляли гипогликемический эффект к 6 часу наблюдений, также превосходя препарат сравнения метформин за исключением одного соединения под лабораторным шифром АЦИ-10, гипогликемический эффект которого уступал метформину.

Таблица 18 – Химические структуры производных 2-имино-бензимидазола

2-имино-бензимидазол			
 <p style="text-align: center;">Общая формула химического класса</p>			
Шифр	R ₁	R ₂	X
АЦИ-1			HCl
АЦИ-4			HCl
АЦИ-10			—
АЦИ-11			HCl
АЦИ-12			HCl

АЦИ-14			HCl
АЦИ-15			HCl
АЦИ-18			HCl

3.2.3. Влияние производных N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола на уровень сахара в крови белых беспородных крыс.

Всего было изучено 24 соединения (п.п.1) производных N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола (общая формула представлена ниже).

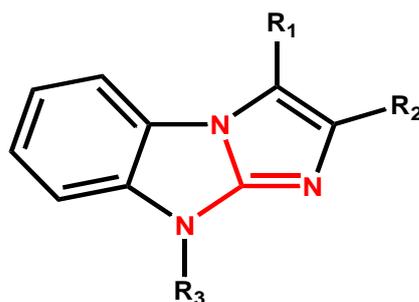


Рисунок 19 – Общая формула производных N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола

Экспериментальный скрининг выявил гипогликемические свойства у 71% соединений (по силе гипогликемического действия 46% не уступали метформину). Гипергликемические свойства не были выявлены у изученных соединений. Токсичными оказались 5,2% всех протестированных веществ, которые вызывали гибель животных (п.п. 1). 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.

Величины активности производных N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола статистически значимо снижавших уровень сахара в крови интактных животных приведены в табл. 19.

Таблица 19 – Химические структуры производных N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2а] бензимидазола

Шифр	С глюкозы, ммоль/л (M±m)	
	4 часа	6 часов
РУ - 0254	2,51±0,06	2,60±0,05**
РУ - 1180	3,52±0,044**	3,63±0,9
РУ - 1213	3,56±0,013**	3,34±0,001**
РУ - 1219	3,47±0,0002**	3,25±0,003**
РУ - 1293	3,39±0,02**	2,36±0,055
РУ - 1294	3,94±0,004**	2,95±0,5
РУ - 1295	3,07±0,045**	3,39±0,4
РУ - 1297	3,19±0,001**	3,33±0,002**
РУ - 1317	3,04±0,02**	3,86±0,005**
РУ - 0623	3,09±0,004**	2,97±0,22
РУ - 0769	2,63±0,04**	2,95±0,4
РУ - 0855	2,62±0,04**	2,92±0,3
РУ - 0887	2,85±0,3	2,54±0,04**
метформин	3,01±0,2*	3,64±0,05*
контроль	3,83±0,09	3,71±0,08

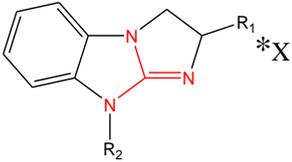
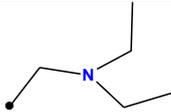
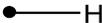
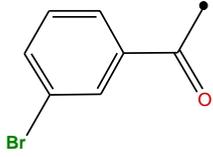
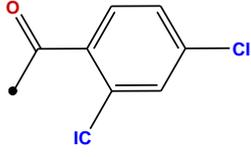
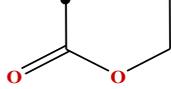
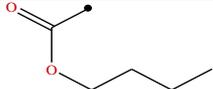
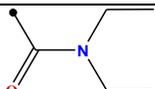
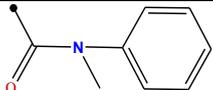
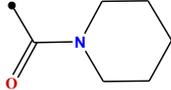
* - достоверно по отношению к контролю ($p \leq 0,05$)

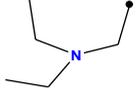
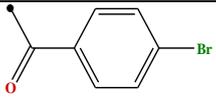
** - достоверно по отношению к препарату сравнения (метформин) ($p \leq 0,05$)

Соединения, под лабораторными шифрами РУ-254, РУ-623, РУ-769, РУ-855, РУ-1295, и РУ-1317 (табл. 20), статистически значимо снижали уровень глюкозы в крови интактных животных на 4 час после введения соединений и по силе гипогликемического действия превосходили препарат сравнения метформин. Соединения РУ-0254, РУ-887, РУ-1213, РУ-1219 и РУ-1297 (табл. 20) проявляли гипогликемический эффект к 6 часу наблюдений, также превосходя препарат сравнения метформин. Наиболее выраженный гипогликемический эффект, превышающий препарат сравнения в 1,4 раза,

был обнаружен у соединений под лабораторными шифрами РУ-254 и РУ-887.

Таблица 20 – Химические структуры производных N9-2,3-дигидроимидазо [1,2-а]бензимидазола

 <p>Общая формула химического класса</p>			
Шифр	R ₁	R ₂	X
РУ-254			2HCl
РУ-1180			HCl
РУ-1213			HBr
РУ-1219			HCl
РУ-1293			HBr
РУ-1294			HCl
РУ-1295			—
РУ-1297			HCl
РУ-1317			HCl

РУ-623	●—Н		2HNO ₃
РУ-855	●—Н		HCl

3.2.4. Влияние производных 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2a]бензимидазола на уровень сахара в крови белых беспородных крыс.

Всего было изучено 23 соединения производных 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола (рис. 20).

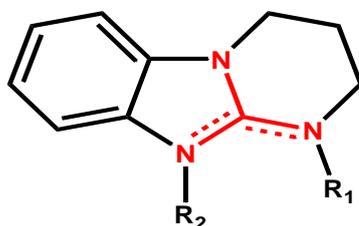


Рисунок 20 – Общая формула производных 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола

Выраженные гипогликемические свойства обнаружены у 73,9% соединений (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. Токсичными оказались 4,4% всех протестированных веществ, которые вызывали гибель животных (п.п. 1). Таким образом, было показано значительное влияние производных 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола на уровень глюкозы в плазме крови интактных животных.

Величины активности производных 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола статистически значимо снижавших уровень сахара в крови интактных животных приведены в табл. 21.

Таблица 21 – Влияние производных 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а] бензимидазола на уровень глюкозы в плазме крови белых беспородных крыс

Шифр	С глюкозы, ммоль/л (M±m)	С глюкозы, ммоль/л (M±m)
	4 часа	6 часов
РФ-101	3,99±0,03**	3,52±0,29
РФ-102	3,76±0,003**	2,91±0,15
РФ-103	3,64±0,007**	3,21±0,13
РФ-105	3,92±0,001	3,37±0,14
РУ -669	2,81±0,05**	3,13±0,1
РУ -1144	2,76±0,05	2,03±0,05**
РУ -1214	3,39±0,0003**	3,70±0,001**
РУ -1216	3,64±0,009**	3,11±0,005**
РУ -1220	2,83±0,6	2,49±0,02**
РУ -1222	3,20±0,036**	2,91±0,045**
РУ -1224	3,10±0,4	2,69±0,02**
РУ -1298	3,64±0,01**	3,43±0,9
РУ -1308	3,67±0,001**	3,79±0,003**
РУ -1314	3,28±0,004**	2,60±0,9
РУ -1315	3,26±0,015**	3,13±0,13
РУ -1318	3,15±0,016**	3,70±0,024**
метформин	2,89±0,02*	3,87±0,04*
интактные	3,94±0,1	3,99±0,1

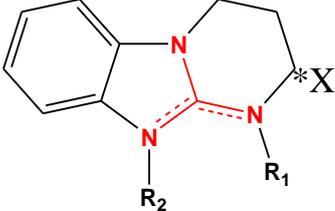
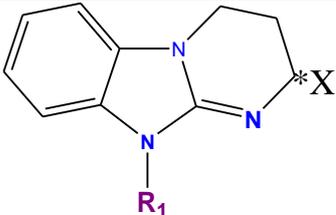
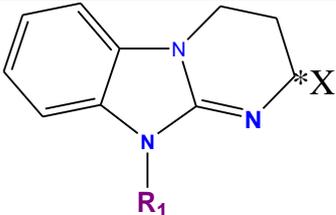
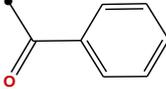
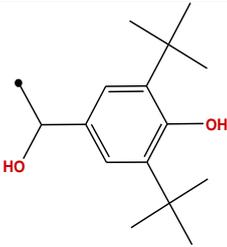
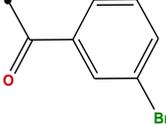
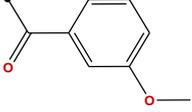
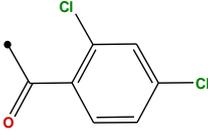
* - достоверно по отношению к контролю ($p \leq 0,05$)

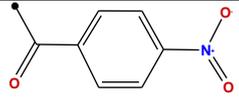
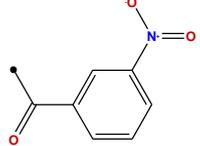
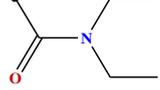
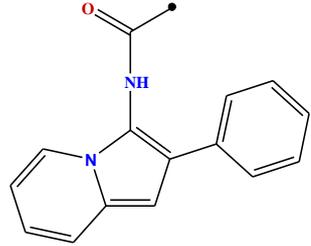
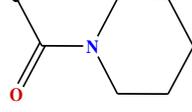
** - достоверно по отношению к препарату сравнения (метформин) ($p \leq 0,05$)

Соединения, под лабораторными шифрами РУ-669, РУ-1222, РУ-1314, РУ-1315 и РУ-1318 (табл. 22), статистически значимо снижали уровень сахара в плазме интактных животных на 4 час после введения. Однако по силе гипогликемического действия только одно соединение под лабораторным шифром РУ-669 статистически значимо превосходило препарат сравнения

метформин. К шестому часу после введения соединений наиболее выраженный гипогликемический эффект, превышающий по силе метформин, обнаруживался у соединений РУ-1144, РУ-1214, РУ-1216, РУ-1220 и РУ-1224 (табл. 22).

Таблица 22 – Химические структуры производных 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола

 Общая формула химического класса			
Шифр	R ₁	R ₂	X
РФ-101-105			2HCl
РУ-669			HCl
РУ-1144			HCl
РУ-1214			HBr
РУ-1216			HBr
РУ-1220			HCl

РУ-1222			HBr
РУ-1224			HBr
РУ-1298			HCl
РУ-1314			HCl
РУ-1315			HCl
РУ-1318			HCl

3.2.5. Влияние производных N1-имидазо[1,2-а]бензимидазола на уровень сахара в крови белых беспородных крыс.

Всего было изучено 3 соединения производных N1-имидазо[1,2-а]бензимидазола (табл. 23).

Гипогликемические свойства не были обнаружены у данного класса соединений. Таким образом, 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. 24.

Таблица 23 – Влияние производных N1-имидазо[1,2-а]бензимидазола на уровень глюкозы в плазме крови интактных животных

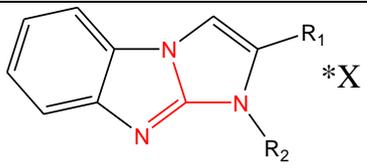
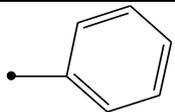
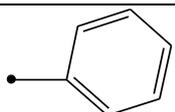
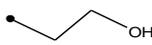
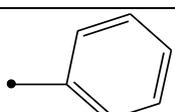
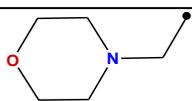
Шифр	С глюкозы, ммоль/л (M±m)	
	4 часа	6 часов
РУ-270	3,9±0,03**	4,2±0,02*
РУ-271	3,8±0,9	4,0±0,5
РУ-355	4,1±0,05**	4,2±0,03**
метформин	2,89±0,02*	3,87±0,04*
контроль	3,94±0,1	3,99±0,1

* - достоверно по отношению к контролю ($p \leq 0,05$)

** - достоверно по отношению к препарату сравнения (метформин) ($p \leq 0,05$)

Экспериментальный скрининг показал отсутствие гипогликемического действия у исследуемых соединений производных N1-имидазо[1,2-а]бензимидазола на уровень глюкозы в плазме крови интактных животных.

Таблица 24 – Химические структуры производных N1-имидазо[1,2-а]бензимидазола

 <p>Общая формула химического класса</p>			
Шифр	R ₁	R ₂	X
РУ-270			HBr
РУ-271			HCl
РУ-355			2HCl

3.2.6. Влияние производных N1-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола на уровень сахара в крови белых беспородных крыс.

Всего было изучено 7 соединений (п.п.1) производных N1-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола (рис. 21).

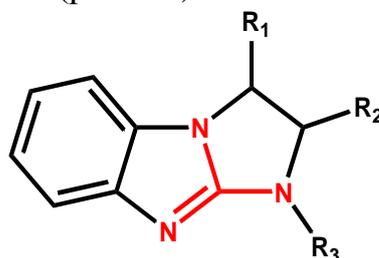


Рисунок 21 – Общая формула производных N1-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола

Выраженные гипогликемические свойства обнаружены у 71,4% соединений (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. Токсичными веществ выявлено не было.

Величины активности производных N1-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола статистически значимо снижавших уровень сахара в крови интактных животных приведены в табл. 25.

Таблица 25 – Влияние производных N1-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола на уровень глюкозы в плазме крови интактных животных

Шифр	С глюкозы, ммоль/л (M±m)	
	4 часа	6 часов
РУ-505	3,55±0,004**	3,60±0,002*
РУ-506	3,25±0,01**	3,23±0,023**
РУ-516	3,36±0,002**	2,80±0,008**
РУ-1163	3,67±0,03**	3,58±0,9
РУ-1209	3,02±0,003**	3,09±0,05**
метформин	2,90±0,02**	3,28±0,05**
контроль	3,84±0,084	3,67±0,074

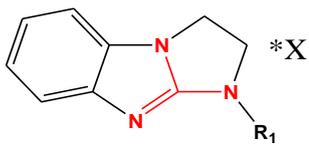
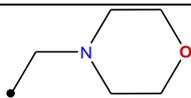
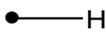
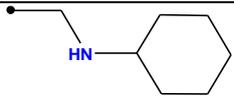
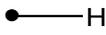
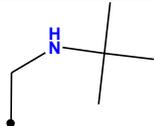
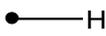
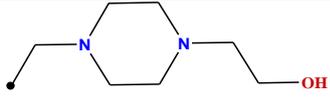
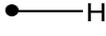
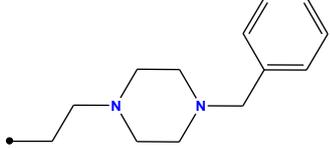
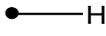
* - достоверно по отношению к контролю ($p \leq 0,05$)

** - достоверно по отношению к препарату сравнения (метформин) ($p \leq 0,05$)

В ходе экспериментального скрининга было показано, что соединения, под лабораторными шифрами РУ-506, РУ-516 и РУ-1209 (табл. 25), статистически значимо снижали уровень сахара в плазме интактных животных на 4 и 6 час после введения и по силе гипогликемического действия превосходили препарат сравнения метформин.

Таким образом, было показано значительное влияние производных N1-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола на уровень глюкозы в плазме крови интактных животных.

Таблица 26 – Химические структуры производных N1-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола

N1-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазол			
 <p>Общая формула химического класса</p>			
Шифр	R ₁	R ₂	X
РУ-505			2HCl
РУ506			2HCl
РУ-516			2HCl
РУ-1163			2HCl
РУ-1209			2HCl

Таким образом, по результатам проведенных исследований можно заключить, что среди новых производных циклических гуанидинов достаточно часто встречаются вещества, влияющие на уровень сахара в крови, как понижающие, так и повышающие его.

3.3. Влияние новых производных циклических гуанидинов на уровень глюкозы в крови животных со стрептозотоциновым диабетом.

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

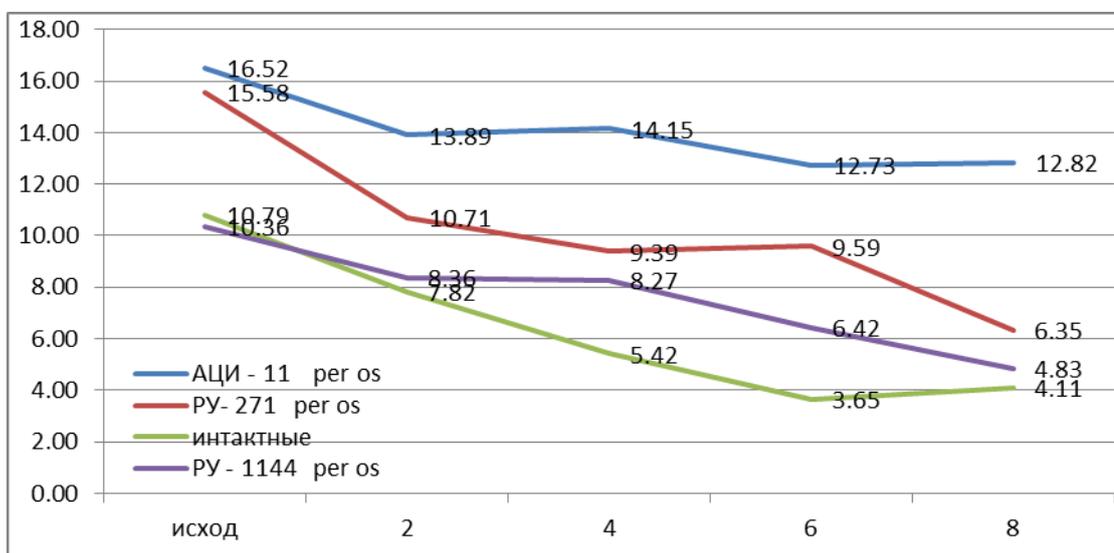
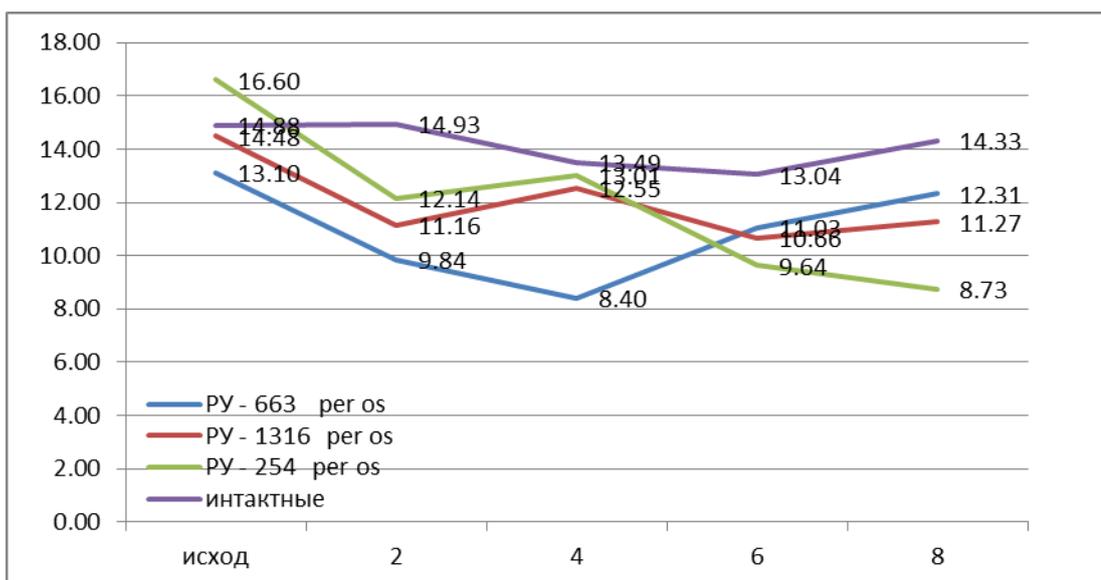
Таблица 27 – Влияние новых производных циклических гуанидинов на уровень глюкозы в плазме крови животных со стрептозотоциновым диабетом

Шифр	С глюкозы, ммоль/л (M±m)	С глюкозы, ммоль/л (M±m)
	4 часа	6 часов
АЖИ-1	12,55±0,03**	10,66±0,03**
РУ-254	12,01±0,09	9,64±0,04**
АЦИ-11	14,15±0,02**	12,73±0,015**
РУ-1220	11,66±0,03**	8,76±0,04**
РУ-663	11,3±0,02**	9,8±0,03**
РУ-1316	10,5±0,02**	8,05±0,02**
метформин	5,00±0,06*	4,47±0,05*
контроль-диабет	13,49±0,05	13,04±0,05

* - достоверно по отношению к контролю ($p \leq 0,05$)

** - достоверно по отношению к препарату сравнения (метформин) ($p \leq 0,05$)

В ходе эксперимента на модели стрептозотоцинового диабета было определено изменение уровня глюкозы в плазме крыс в диапазоне от 2 до 12 часов. Данные представлены на графиках ниже.



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.

3.4. Заключение.

Поиск соединений, оказывающих гипогликемическое действие среди новых производных циклических гуанидинов, показал, что у класса 2-амино-бензимидазола (в ходе экспериментального скрининга), гипогликемические свойства были обнаружены у 50% соединений (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.

В ходе экспериментального скрининга было установлено, что гипогликемическими свойствами обладают 65% соединений из группы 2-имино-бензимидазола (по силе гипогликемического действия не уступали метформину). Гипергликемические свойства выявлены у 26% соединений. Токсичными оказались 6% всех протестированных веществ, которые вызывали гибель животных. Нейтральными оказались 3% соединений исследуемого класса.

Экспериментальный скрининг производных N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола 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. Токсичными оказались 5,2% всех протестированных веществ, которые 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. Токсичными оказались 4,4% всех протестированных веществ, которые 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. 24.

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.

Таким образом, среди изученных соединений наиболее перспективными классами считаются производные N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола и 2-амино-бензимидазола, перспективные представители которых были изучены на модели стрептозотоцинового диабета при однократном введении.

В ходе эксперимента на модели стрептозотоцинового диабета было определено, что наиболее сильный гипогликемический эффект наблюдался у препарата РУ-254, относящегося к классу производных N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола.

ГЛАВА 4. ЗАВИСИМОСТЬ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ОТ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Изложенные в предыдущих главах результаты расчетных исследований и экспериментального скрининга гипогликемической активности производных циклических гуанидинов показали, что наиболее перспективным классом соединений для последующего изучения являются производные N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола (N⁹-ДгИмБИ), общая формула которых представлена на рис.22. Экспериментально изученные соединения именно этого класса были более детально исследованы методами *in silico*, с целью выбора соединения-лидера для углубленного изучения на моделях сахарного диабета типа 2.

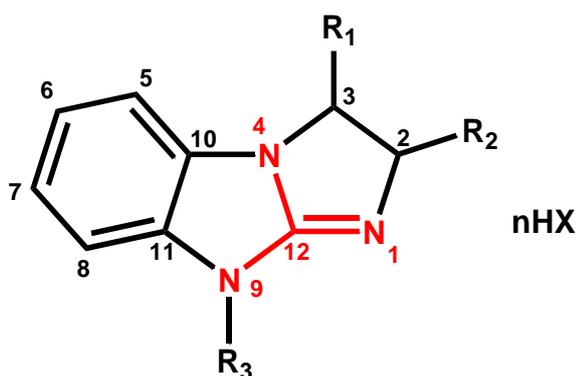


Рисунок 22. Общая формула производных N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола

4.1. Материалы и методы исследования.

Для выбора соединения-лидера был проведен уточняющий QSAR- анализ (Murcia-Soler M., 2001) зависимостей между гипогликемической активностью и химической структурой производных N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола с применением следующих методов:

выполнен подструктурный анализ влияния заместителей на высокий уровень гипогликемической активности производных N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола;

проведен частотный анализ влияния физико-химических параметров на высокий уровень гипогликемической активности производных N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола;

проведен фармакофорный анализ с помощью ИТ «Микрокосм» трех производных N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола с наиболее высокой гипогликемической активностью;

методами *in silico* выполнена оценка показателей ADME этих трех наиболее активных производных N⁹-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола.

По результатам обобщения данных, полученных вышеуказанными методами, было выбрано одно соединение-лидер для последующего углубленного изучения на моделях диабета.

Подструктурный анализ выполняли по алгоритму, описанному выше, в главе 2. В качестве признаков наличия/отсутствия высокой гипогликемической активности выступали виды заместителей R₂, R₃ и кислотного остатка nHX. В положении R₁ у всех изученных соединений находится атом водорода, поэтому данный заместитель из подструктурного анализа был исключен.

Для частотного анализа были рассчитаны следующие физико-химические параметры.

Показатели липофильности в виде логарифма коэффициента распределения в системе «октанол – вода» log P вычислялись с применением различных схем фрагментного приближения (Broto P. et al., 1984; Ghose A. K. et al., 1987; Viswanadhan V. N. et al., 1989). Этот параметр был вычислен для всей молекулы в целом Log P₀ и для заместителей R₂ (Log P₂) и R₃(Log P₃). Липофильность рассчитывалась без учета влияния кислотного остатка.

В качестве стерического параметра использовалась молекулярная рефракция MR, значения которой рассчитывались с использованием классической аддитивной схемы в различных модификациях (Июффе Б. В., 1983; Ghose A. K. et al., 1999; Viswanadhan V. N. et al., 1989). Молекулярная рефракция (Бацанов С. С., 1976) была рассчитана: для всей молекулы в целом MR₀; для второго заместителя MR₂ (положение R₂ это C₂); для третьего заместителя

MR_3 (положение R_3 это N_9). Молекулярную рефракцию также рассчитывали без учета влияния кислотного остатка, как и в случае липофильности.

Электронными характеристиками служили заряды на атомах, которые рассчитывались с использованием квантово-химического метода AM1 (Dewar M. J. S. et al. 1993; Минкин В. И. и др., 1997), с предварительной оптимизацией конформации методом молекулярной механики MM2 (Буркерт У. и др., 1986; Кларк Т., 1990; Wildman S. A., 1999). Были вычислены следующие электронные параметры.

Заместитель R_1 . В этом положении всегда находится атом водорода, но в зависимости от конфигурации остальной части молекулы, заряд на атоме водорода меняется. Кроме того, заряд на нем всегда положительный, поэтому в качестве электронного параметра данного заместителя рассматривался только один показатель: средний заряд на этом заместителе (атоме водорода) $M(Q)_1$.

Заместитель R_2 . В этом положении заместители по структуре весьма разнообразны, поэтому рассчитывались следующие показатели (с учетом атомов водорода):

$M(Q)_2$ – средний заряд на атомах;

$M|Q|_2$ – среднее значение абсолютных величин зарядов на атомах;

$Max(Q^+)_2$ – максимальный положительный заряд на атомах;

$Max(Q^-)_2$ – максимальный отрицательный заряд на атомах;

$Min(Q^+)_2$ – минимальный положительный заряд на атомах;

$Min(Q^-)_2$ – минимальный отрицательный заряд на атомах;

$Q(Het_1)_2$ – заряд на первом гетероатоме (от места присоединения заместителя).

Заместитель R_3 . Данный заместитель не только структурно более разнообразный, но и содержит большее число гетероатомов, поэтому для него рассчитывались:

$M(Q)_3$, $M|Q|_3$, $Max(Q^+)_3$, $Max(Q^-)_3$, $Min(Q^+)_3$, $Min(Q^-)_3$, $Q(Het_1)_3$ – параметры, аналогичные показателям для заместителя R_2 ;

$Q(\text{Het}_2)_3$ - заряд на втором гетероатоме;

$Q(\text{Het}_3)_3$ – заряд на третьем гетероатоме.

Кроме электронных параметров заместителей рассчитывались также электронные характеристики базовой структуры (конденсированной трициклической системы):

$M(Q)_{CS}$, $M|Q|_{CS}$, $\text{Max}(Q^+)_{CS}$, $\text{Max}(Q^-)_{CS}$, $\text{Min}(Q^+)_{CS}$, $\text{Min}(Q^-)_{CS}$ – параметры, аналогичные показателям для заместителей R_2 и R_3 ;

$Q(N_1)_{CS}$ – заряд на азоте N_1 ;

$Q(N_9)_{CS}$ – заряд на азоте N_9 ;

$Q(N_4)_{CS}$ – заряд на азоте N_4 ;

$Q(\text{Benz})_{CS}$ – суммарный заряд атомов на бензольном кольце;

$Q(\text{Imid}_1)_{CS}$ – суммарный заряд атомов на первом (внутреннем) имидазольном кольце;

$Q(\text{Imid}_2)_{CS}$ – суммарный заряд атомов на втором (внешнем) имидазольном кольце.

В отличие от липофильных и стерических параметров, все электронные параметры вычислялись для молекулы в форме соли, то есть учитывали влияние кислотного остатка на электронную конфигурацию молекулы. Поэтому в качестве дополнительных параметров были рассчитаны следующие электронные характеристики кислотного остатка:

$Q(\text{Ac}_R)$ – заряд атомов на кислотном остатке, координированном к заместителю;

$Q(\text{Ac}_{\text{Cond}})$ – заряд атомов на кислотном остатке, координированном к трициклической конденсированной системе.

Полные таблицы значений физико-химических параметров приведены в приложении 4.2.

Для использования в частотном анализе стандартного алгоритма подструктурного анализа была выполнена дискретизация на пять интервалов всех непрерывных физико-химических параметров – следующим образом.

Для каждого непрерывного физико-химического параметра x_k вычисляли длину интервала дискретизации

$$\Delta_k = \frac{\left| \max_{i=1}^N(x_{ik}) - \min_{i=1}^N(x_{ik}) \right|}{5}, \quad k = 1 \dots M,$$

начало первого интервала

$$y_{0k} = \min_{i=1}^N(x_{ik}) - \frac{\Delta_k}{2}, \quad k = 1 \dots M,$$

окончания интервалов

$$y_{jk} = y_{(j-1)k} + \Delta_k, \quad j = 1 \dots 5, \quad k = 1 \dots M.$$

Для каждого соединения вместо одного непрерывного физико-химического параметра x_k определяли пять бинарных переменных

$$\delta_{ijk} = \begin{cases} 1, & \text{если } y_{(j-1)k} < x_{ik} \leq y_{jk}, \quad i = 1 \dots N, \quad j = 1 \dots 5, \quad k = 1 \dots M. \\ 0, & \text{иначе} \end{cases}$$

Здесь i – номер соединения;

j – номер интервала;

k – номер непрерывного физико-химического параметра;

N – число соединений;

M – число непрерывных физико-химических параметров.

Оценка статистической значимости бинарных физико-химических признаков δ_{ijk} , применительно к наличию/отсутствию высокой гипогликемической активности, производилась по той же самой схеме, что и в случае подструктурного анализа (см. главу 2).

Полные таблицы бинарных физико-химических признаков приведены в приложении 4.2.

Для трех наиболее активных соединений (РУ-254, РУ-633, РУ-1316) с помощью программы FarmFor программного комплекса ИТ «Микрокосм» был проведен сравнительный фармакофорный анализ.

Согласно классического определения (Барлоу, 1959; Комиссаров, 1969), фармакофоры представляют собой фиксированные фрагменты химической структуры, обуславливающие наличие того или иного вида фармакологической активности. В настоящем исследовании в качестве потенциальных фармакофоров выступали базовые дескрипторы языка QL (Васильев П.М., 2006).

Алфавит QL постулирован и задается тремя типами элементарных дескрипторов.

1. Структурный дескриптор (СД) – фрагмент структуры соединения, обладающий достаточно выраженными электродонорными или электроакцепторными свойствами и представляющий собой неводородный атом или группу атомов с учетом ближайшего окружения, либо элементарный цикл. Подалфавит СД QL постулирован и состоит из 10219 видов дескрипторов.

2. Дескриптор длины (ДД) представляет собой число сигма-связей между двумя структурными дескрипторами, либо число общих атомов у циклического дескриптора и любого другого СД. Подалфавит дескрипторов длины содержит 197 видов дескрипторов.

3. Дескриптор связи (ДС) характеризует типы электронной системы на дескрипторе длины. Подалфавит ДС постулирован и состоит из 22 видов дескрипторов.

Элементарные QL-дескрипторы являются дескрипторами 1-го ранга. Дескрипторы 2-го ранга есть попарные комбинации элементарных дескрипторов, 3-го ранга – комбинации из троек.

Базовые дескрипторы языка QL являются дескрипторами 4-го ранга, описываются общей формулой $СД_1-ДД-СД_2-ДС$ и представляют собой два простейших структурных фрагмента, соединенные цепочкой σ -связей, для которой указан характер распределения электронной плотности. Такие подструктуры имеют как минимум два центра взаимодействия, обеспечивающие жесткую фиксацию молекулы в сайте белка-биомишени.

Процедура выявления фармакофоров на основе QL-дескрипторного описания химической структуры описана в работах (Vassiliev, 2014; Спасов, 2007) и состоит в следующем.

Для заданного уровня активности рассчитывают байесовскую частоту встречаемости QL-дескриптора ij в классе $k = a, n$

$$P_{ijk} = \frac{S_{ijk} + 1}{S_{ik} + d_i}, \quad j = 1, \dots, d_i, \quad i = 1, \dots, 11,$$

где S_{ijk} – число дескрипторов j -го вида i -го типа в классе k ;

S_{ik} – общее число дескрипторов i -го типа в классе k .

Для каждого дескриптора ij оценивается достоверность различия байесовских частот встречаемости этого дескриптора в классах a и n по гипергеометрическому критерию (Корн, 2003):

$$Pr_{ij} = \frac{\binom{(S_{ija} + S_{ijn} + 2)}{(S_{ija} + 1)} \times \binom{(S_{ia} + S_{in} + 2d_i) - (S_{ija} + S_{ijn} + 2)}{(S_{ia} + d_i) - (S_{ija} + 1)}}{\binom{(S_{ia} + S_{in} + 2d_i)}{(S_{ia} + d_i)}},$$

где $\binom{R}{r} = \frac{R!}{r!(R-r)!}$ – число сочетаний.

QL-дескриптор j -го вида i -го типа является статистически значимым признаком активности (потенциальным фармакофором), если

$$P_{ija} > P_{ijn} \quad \text{и} \quad Pr_{ij} < Pr_0,$$

где Pr_0 – порог статистической значимости, выбирается в зависимости от нужной исследователю степени достоверности.

Выявление потенциальных фармакофоров проводили для пяти уровней значимости ($p = 0,05; 0,01; 0,001; 1 \cdot 10^{-4}; 1 \cdot 10^{-5}$), на основе двух обучающих выборок, по следующим градациям активности:

«активно» – для выборки по известным гипогликемическим лекарственным веществам;

«высокая», «высокая или умеренная», «активно» – для выборки по ранее испытанным на гипогликемическую активность новым производным циклических гуанидинов (границы этих градаций активности получены в результате кластерного анализа, см. главу 2).

Фармакофорные спектры трех соединений-лидеров (РУ-254, РУ-663, РУ-1316) 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. Интегральной оценкой перспективности соединения служило суммарное число всех потенциальных фармакофоров в структуре каждого соединения-лидера.

По определению (Kern, 2008), ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion) есть комплекс физико-химических и фармакокинетических параметров, который необходим для оценки химического соединения, как достаточно хорошего кандидата на лекарственное вещество (так называемое лекарственное подобие, dPYg likeness). На первом этапе виртуального ADME-скрининга используются достаточно простые «фильтры», основанные на физико-химических свойствах, характерных для лекарственных веществ. Наиболее известным из таких «фильтров» является правило Липински (Lipinski, 1997).

В настоящем исследовании для анализа предварительного соответствия показателей соединений-лидеров основным характеристикам ADME (Gleeson M. P., 2008; Di L., Kerns E. H., 2015) была использована свободно доступная программа DPULiTo (DPYg Likeness Tool, 2015), в которой рассчитывались следующие структурные и физико-химические параметры:

MW – молекулярный вес, Да;

D – дипольный момент, дебай;

SASA_{tot} – общая площадь сольватационной поверхности, Å²;

SASA_{hphob} – площадь гидрофобной сольватационной поверхности, Å²;

$SASA_{\text{phil}}$ – площадь гидрофильной сольватационной поверхности, Å^2 ;

V – общий Ван-дер-Ваальсовский объем, Å^3 ;

V_{PSA} – Ван-дер-Ваальсовский объем полярной поверхности, Å^3 ;

L – поляризуемость, Å^3 ;

$\text{Log } P$ – логарифм коэффициента распределения октанол/вода (липофильность), рассчитанный по фрагментной схеме (в большей степени учитывает гидрофобные взаимодействия), отн.ед.;

$\text{Alog } P$ – логарифм коэффициент распределения октанол/вода (липофильность), рассчитанный на основании электронных характеристик молекулы (в большей степени учитывает гидрофильные взаимодействия), отн.ед.;

$\text{Per}_{\text{Caco-2}}$ – кажущаяся проницаемость клеток аденокарциномы толстого кишечника человека Caco-2, нмоль/сек;

Per_{MDCK} – кажущаяся проницаемость клеток эпителия почек собаки, нмоль/сек;

$\text{Absz}_{\text{HOGI}}$ – степень всасывания в ЖКТ человека при пероральном введении, нмоль/сек;

HBA – число групп, выступающих как акцепторы при образовании водородной связи, шт.;

HBD – число групп, выступающих как доноры при образовании водородной связи, шт.;

TPSA – площадь топологической полярной поверхности, Å^2 ;

MR – молекулярная рефракция, см^3 ;

n_{RB} – число вращающихся связей, шт.;

n_{At} – число атомов, включая атомов водорода, шт.;

n_{AcGr} – число кислотных групп, шт.;

RC – число колец, шт.;

n_{RigB} – число жестких связей, шт.;

n_{ArRing} – число ароматических колец, шт.;

nHB – число водородных связей, шт.;

SAAlerts – индекс промышленной вредности соединения, усл.ед. (0÷5);

uwQED - невзвешенная количественная оценка лекарственного подобия, отн.ед. (0÷1);

wQED - взвешенная количественная оценка лекарственного подобия, отн.ед. (0÷1).

В программе DPUiTo были определены следующие фильтры ADME.

Lipinski: $50 \leq MW \leq 500$; $-5 \leq \log P \leq +5$; $HBD \leq 5$; $HBA \leq 10$ (Lipinski, 1997).

Ghose: $160 \leq MW \leq 480$; $-0,4 \leq \log P \leq 5,6$; $20 \leq nAt \leq 70$; $40 \leq MR \leq 130$ (Ghose A. K., 1999).

CMC-50-like: $1,3 \leq \log P \leq 4,1$; $30 \leq nAt \leq 55$; $230 \leq MW \leq 390$; $70 \leq MR \leq 110$ (Brenk R., 2008; Kerns E. H., 2008).

Veber: $nRB \leq 10$; $TPSA \leq 140$ (Veber D. F. et al., 2002).

BBB Likeness: $MW \leq 400$; $nHB \leq 8$; $nAcGr = 0$ (Kerns E. H., 2008).

$uwQED \geq 0,5$ (Bickerton G. R., 2012).

$wQED \geq 0,5$ (Bickerton G. R., 2012).

Соединение по основным показателям ADME считалось оптимальным кандидатом на лекарственное вещество, если рассчитанные для него структурные и физико-химические параметры соответствовали вышеуказанным параметрам программы DPUiTo. Более точный анализ соответствия показателей соединений-лидеров характеристикам ADME референсных лекарственных веществ был выполнен с помощью модуля QikProp системы Schröginger (пробная версия 10.2) (QikProp, 2015). В этой программе для изучаемых химических структур рассчитываются спектры уточненных и расширенных показателей ADME, для которых на базе данных 1712 известных лекарственных веществ определены диапазоны, охватывающие 95% этих референсных соединений.

Перечень параметров, рассчитываемых программой QikProp, и их 95%-ные доверительные интервалы приведены в табл. 28.

Таблица 28 – Доверительные интервалы основных показателей ADME программы QikProp

Показатель		95%-ный интервал	
Обозначение	Физический смысл	Минимум	Максимум
MW	Молекулярный вес, Да	130,0	725,0
D	Дипольный момент, D	1,0	12,5
SASA _{tot}	Общая сольватационная поверхность, Å ²	300,0	1000,0
SASA _{hphob}	Гидрофобная сольватационная поверхность, Å ²	0,0	750,0
SASA _{hphil}	Гидрофильная сольватационная поверхность, Å ²	7,0	330,0
V	Общий Ван-дер-ваальсовский объем, Å ³	500,0	2000,0
V _{PSA}	Ван-дер-ваальсовская полярная поверхность, Å ²	7,0	200,0
nRB	Число вращающихся связей, шт.	0	15
HBD	Число групп, выступающих как доноры при образовании водородных связей, шт.	0	6
HBA	Число групп, выступающих как акцепторы при образовании водородных связей, шт.	2	20
L	Поляризуемость, Å ³	13,0	70,0
LogP	Логарифм коэффициента распределения октанол/вода, отн.ед.	-2,0	6,5
LogS	Логарифм растворимости в воде, отн.ед.	-6,5	0,5
LogK _{HSA}	Логарифм коэффициента связывания с сывороточным альбумином человека, отн.ед.	-1,5	1,5
Per _{Caco-2}	Кажущаяся проницаемость клеток аденокарциномы толстого кишечника человека Caco-2, нМ/сек	<25 (низкая)	>500 (высокая)
0Per _{MDCK}	Кажущаяся проницаемость клеток эпителия почек собаки, нМ/сек	<25 (низкая)	>500 (высокая)
Absz _{HOGI}	Степень всасывания в ЖКТ человека при пероральном введении, %	<25 (низкая)	

Соединение считается оптимальным кандидатом на лекарственное вещество, если для него все рассчитанные показатели укладываются в 95%-ные доверительные интервалы, вычисленные для референсных препаратов.

4.2. Выявление методами *in silico* соединения-лидера нового производного циклических гуанидинов с высокой гипогликемической активностью.

4.2.1. Подструктурный анализ влияния заместителей на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов.

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 ($Ind_R < 0.82$). Результаты подструктурного анализа выраженной гипогликемической активности N⁹-ДгИмБИ приведены в табл. 29.

Таблица 29 – Подструктурный анализ выраженной гипогликемической активности производных циклических гуанидинов класса 2,3-дигидро-N⁹-имидазобензимидазола

Признак	P _h	P _{nh}	z	Pr	K _{Pr}
R ₂					
-CH ₂ OC ₆ H ₅ -феноксиметил	0,200	0,800	1,74	0,041	-3
R ₃					
-C ₂ H ₅ ; этил	0,750	0,250	1,24	0,108	1
-(CH ₂) ₂ NC ₄ H ₈ O; морфолиноэтил	0,250	0,750	1,24	0,108	-1
-CH ₂ CO(4-C ₆ H ₄ Br); (4-бромфенил)карбоксометил	0,750	0,250	1,24	0,108	1
Солевой остаток					
2HCl; дигидрохлорид	0,384	0,615	1,08	0,140	-1
2HBr; дигидробромид	0,250	0,750	1,24	0,108	-1
Г; иодид	0,800	0,200	1,74	0,041	3

Примечание. 1. Уровень активности «высокий» или «умеренный» - $Ind_R < 0,90$.
2. Обозначения соответствуют табл.3. главы 2.

Среди всех признаков, сколько-нибудь влияющих на «высокий или умеренный» ($\text{Ind}_R < 0,9$) уровень гипогликемической активности производных N₉-ДГИМБИ, только один статистически достоверно положительно ее обуславливает – это солевой остаток Г.

Результаты подструктурного анализа гипогликемической активности изученных соединений для уровня активности «высокая» ($\text{Ind}_R < 0,82$) приведены в табл. 30.

Таблица 30 – Подструктурный анализ высокой гипогликемической активности производных циклических гуанидинов класса 2,3-дигидро-N⁹-имидазо-бензимидазола

Признак	P _h	P _{nh}	z	Pr	K _{Pr}
R ₂					
–CH ₂ OC ₆ H ₅ феноксиметил	0,241	0,759	1,32	0,093	-2
R ₃					
–C ₂ H ₅ ; этил	0,291	0,709	0,90	0,183	-1
–CH ₂ C ₆ H ₅ ; бензил	0,726	0,274	1,03	0,150	1
–CH ₃ ; метил	0,638	0,362	0,88	0,190	1
–(CH ₂) ₂ NC ₅ H ₁₀ ; пиперидиноэтил	0,638	0,362	0,88	0,190	1
–(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂ ; диэтиламиноэтил	0,706	0,294	1,80	0,035	3
–CH ₂ CO(α-C ₁₀ H ₇); (α-нафтил)карбоксометил	0,726	0,274	1,03	0,150	1
–CH ₂ CH(OH)(t-C ₄ H ₉); 2-трет-бутил-2-гидроксиэтил	0,726	0,274	1,03	0,150	1
–CH ₂ COOC ₂ H ₅ ; этилкарбоксометил	0,726	0,274	1,03	0,150	1
–CH ₂ COOC ₄ H ₉ ; н-бутилкарбоксометил	0,726	0,274	1,03	0,150	1
–CH ₂ CONH ₂ ; аминокарбоксометил	0,726	0,274	1,03	0,150	1
–(CH ₂) ₂ NC ₄ H ₈ O; морфолиноэтил	0,291	0,709	0,90	0,183	-1
–CH ₂ CO(4-C ₆ H ₃ O ₂ CH ₂); бензо[d][1,3]диоксолил-4	0,726	0,274	1,03	0,150	1
–CH ₂ CO(4-C ₆ H ₄ NO ₂); (4-нитрофенил)карбоксометил	0,726	0,274	1,03	0,150	1
–CH ₂ CO(4-C ₆ H ₄ Br);	0,291	0,709	0,90	0,183	-1

(4-бромфенил)карбоксометил					
Солевой остаток					
2HNO ₃ ; динитрат	0,726	0,274	1,03	0,150	1
HCl; гидрохлорид	0,417	0,582	1,22	0,111	-1
2HBr; дигидробромид	0,291	0,709	0,90	0,183	-1
Г; иодид	0,714	0,286	1,34	0,090	2

Примечание. 1. Уровень активности «высокий» или «умеренный» - $Ind_R < 0,90$.
2. Обозначения соответствуют табл.3. главы 2.

Из таблицы 30 видно, что статистически достоверным влиянием на высокий уровень гипогликемической активности обладает один единственный заместитель, в положении R₃ – диэтиламиноэтил $-(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$. Влияние остальных заместителей статистически не достоверно и носит иллюстративный характер.

Таким образом, в ходе подструктурного анализа влияния заместителей на гипогликемическую активность производных циклических гуанидинов установлено, что на выраженный уровень гипогликемической активности влияет Г, а этот солевой остаток характерен для класса N₁,N₉-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолов. В случае высокого уровня активности, который собственно и интересен, есть статистически достоверный заместитель R₃ – диэтиламиноэтил $-(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$, который обуславливает высокий уровень гипогликемической активности.

Из трех наиболее активных соединений-лидеров (РУ-254, РУ-663 и РУ-1316) диэтиламиноэтильный фрагмент $(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$ содержит только одно соединение – РУ-254.

4.2.2. Частотный анализ влияния физико-химических параметров на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов.

Частотный анализ влияния физико-химических параметров на высокий уровень гипогликемической активности также был выполнен для 56 производных 2,3-дигидро-N₉-имидазо[1,2-а]бензимидазола.

В ходе исследований найден 41 физико-химический признак, влияющий на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов.

Положительное статистически достоверное влияние оказывают 8 признаков (рис. 23):

$$60,69 \leq MR_0 < 75,04 \text{ — } K_{Pr} = +3$$

$$13,16 \leq MR_3 < 27,51 \text{ — } K_{Pr} = +3$$

$$M(Q)_3 \geq 0,066 \text{ — } K_{Pr} = +3$$

$$M|Q|_{CS} < 0,105 \text{ — } K_{Pr} = +3$$

$$0,029 \leq \text{Min}(Q^+)_{CS} < 0,037 \text{ — } K_{Pr} = +4$$

$$\text{Min}(Q^+)_{CS} \geq 0,037 \text{ — } K_{Pr} = +3$$

$$Q(N_4)_{CS} < -0,232 \text{ — } K_{Pr} = +3$$

$$Q(\text{Imid}_1)_{CS} \geq -0,109 \text{ — } K_{Pr} = +3$$

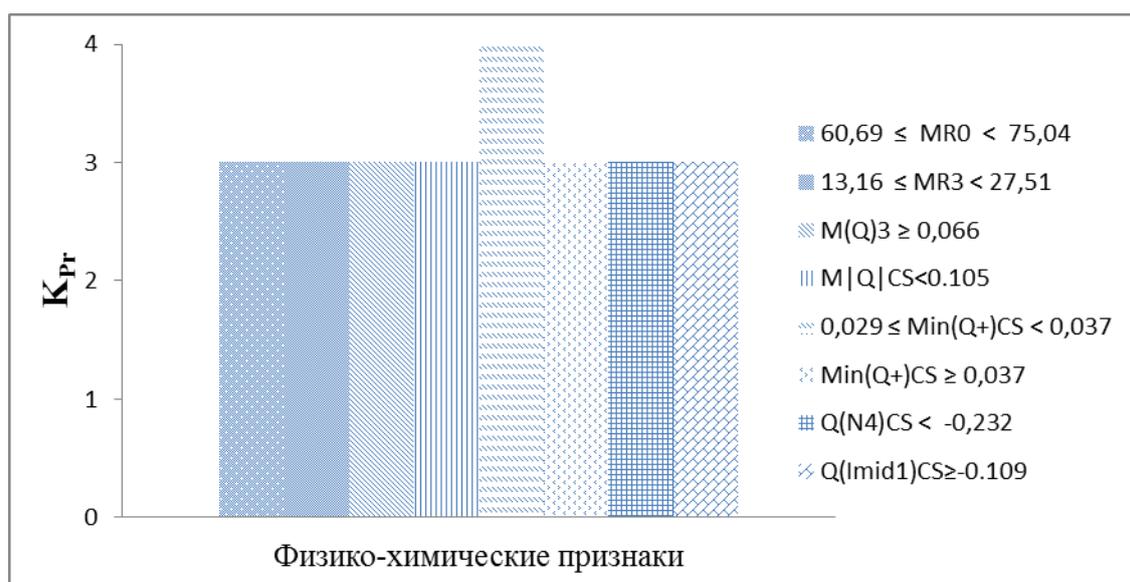


Рис.23 – Физико-химические признаки, влияющие на высокий уровень гипогликемической активности

Проанализировав все физико-химические признаки у трех наиболее значимых соединений-лидеров (РУ-254, РУ-663 и РУ-1316), влияющих на высокий уровень гипогликемической активности, установили, что индекс соединения РУ-254 содержит признак $Q(\text{Imid}_1)_{CS} \geq -0,109$, достоверно влияющий на гипогликемические свойства соединения. У двух других

соединений-лидеров (РУ-663 и РУ-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 N₁,N₉-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолов.

4.2.3. Фармакофорный анализ в ИТ «Микрокосм» производных циклических гуанидинов с высокой гипогликемической активностью.

Для оценки фармакофорного спектра трех соединений лидеров (РУ-254, РУ-663, РУ-1316), имеющий наиболее высокий уровень гипогликемической активности, был проведен расчет фармакофоров по двум обучающим выборкам: 126 известных лекарственных веществ, проявляющих гипогликемическую активность; 109 экспериментально изученных производных циклических гуанидинов. Поскольку данные во второй выборке были представлены в количественном виде, то по результатам кластерного анализа был проведен фармакофорный анализ трех уровней активности: высокой активности; высокой либо умеренной активности; наличие активности. Фармакофорный анализ проводился для нескольких уровней значимости, начиная от стандартного $p \leq 0,05$ и дальше, по следующим градациям 0,01; 0,001; 10^{-4} и 10^{-5} . Программа «FarmFor» выявляет значимые признаки, различной степени сложности, отвечающие за проявление или не проявление данного уровня активности, но не выявляет как таковые фармакофоры, потому что для этого требуются специальные расчеты и дополнительные экспериментальные исследования. Из всех выявленных признаков нами были использованы только базовые QL-дескрипторы четвертого ранга, имеющие как минимум два центра взаимодействия, которые позволяют жестко фиксировать молекулу на белке-биомишени.

Три соединения лидера (РУ-254, РУ-663, РУ-1316) были представлены в виде матриц базовых QL-дескрипторов. Для каждого лидера было подсчитано, сколько в его структуре присутствует значимых QL-дескрипторов 4 ранга, ответственных за проявление того или иного уровня активности. Фармакофорный спектр всех трех соединений приведен в таблице 00. Интегральной оценкой перспективности соединений-лидеров являлось суммарное число значимых фармакофорных признаков, которые встречаются в структуре данного соединения-лидера. Из табл. 31 видно, что наибольшее число признаков, ответственных за проявление высокой гипогликемической активности, содержит структура вещества РУ-254; на втором месте – РУ-1316, а на третьем месте РУ-663. Таким образом, в результате проведенного фармакофорного анализа установлено, что наиболее перспективным соединением, с точки зрения содержания в химической структуре фрагментов, ответственных за достаточно высокий уровень гипогликемической активности, является соединение РУ-254.

Таблица 31 – Анализ фармакофорного спектра структур соединений-лидеров

Уровень значимости	Суммарное число значимых признаков гипогликемической активности		
	РУ – 254	РУ – 663	РУ – 1316
По выборке известных гипогликемических препаратов			
Наличие активности			
$p \leq 0,05$	23	10	20
$p \leq 0,01$	21	7	16
$p \leq 0,001$	14	3	12
$p \leq 1 \cdot 10^{-4}$	14	1	10
$p \leq 1 \cdot 10^{-5}$	12	1	10
По выборке новых изученных циклических гуанидинов			
Наличие активности			
$p \leq 0,05$	20	15	15
$p \leq 0,01$	0	0	0
$p \leq 0,001$	0	0	0
$p \leq 1 \cdot 10^{-4}$	0	0	0

$p \leq 1 \cdot 10^{-5}$	0	0	0
По выборке новых изученных циклических гуанидинов Высокий уровень активности			
$p \leq 0,05$	4	9	2
$p \leq 0,01$	2	6	0
$p \leq 0,001$	2	6	0
$p \leq 1 \cdot 10^{-4}$	2	6	0
$p \leq 1 \cdot 10^{-5}$	2	6	0
По выборке новых изученных циклических гуанидинов Высокий или умеренный уровень активности			
$p \leq 0,05$	19	17	15
$p \leq 0,01$	0	3	0
$p \leq 0,001$	0	3	0
$p \leq 1 \cdot 10^{-4}$	0	0	0
$p \leq 1 \cdot 10^{-5}$	0	0	0
Всего	135	93	100

4.2.4. Анализ показателей ADME новых производных циклических гуанидинов с высокой гипогликемической активностью.

В табл. 32 приведены основные показатели ADME, рассчитанные в программе DPU_{LiTo} для соединений-лидеров.

Таблица 32 – Физико-химические показатели ADME соединений-лидеров

Показатель	РУ-254	РУ-663	РУ-1316
MW	258,2	257,2	216,1
Log P	2,491	2,186	0,446
Alog P	0,581	0,930	-0,997
HBA	4	4	5
HBD	0	0	1
TPSA	22,08	35,91	61,93
MR	82,35	79,08	62,05
nRB	5	3	2
nAt	41	38	28
nAcGr	0	0	0
RC	3	3	3

nRigB	16	18	16
nArRing	1	1	1
nHB	4	4	6
SAlerts	0	0	0
uwQED	0,791	0,848	0,809
wQED	0,832	0,849	0,79

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

Интерфейс расчета в программе DPULiTo основных показателей ADME приведены на рис. 24.

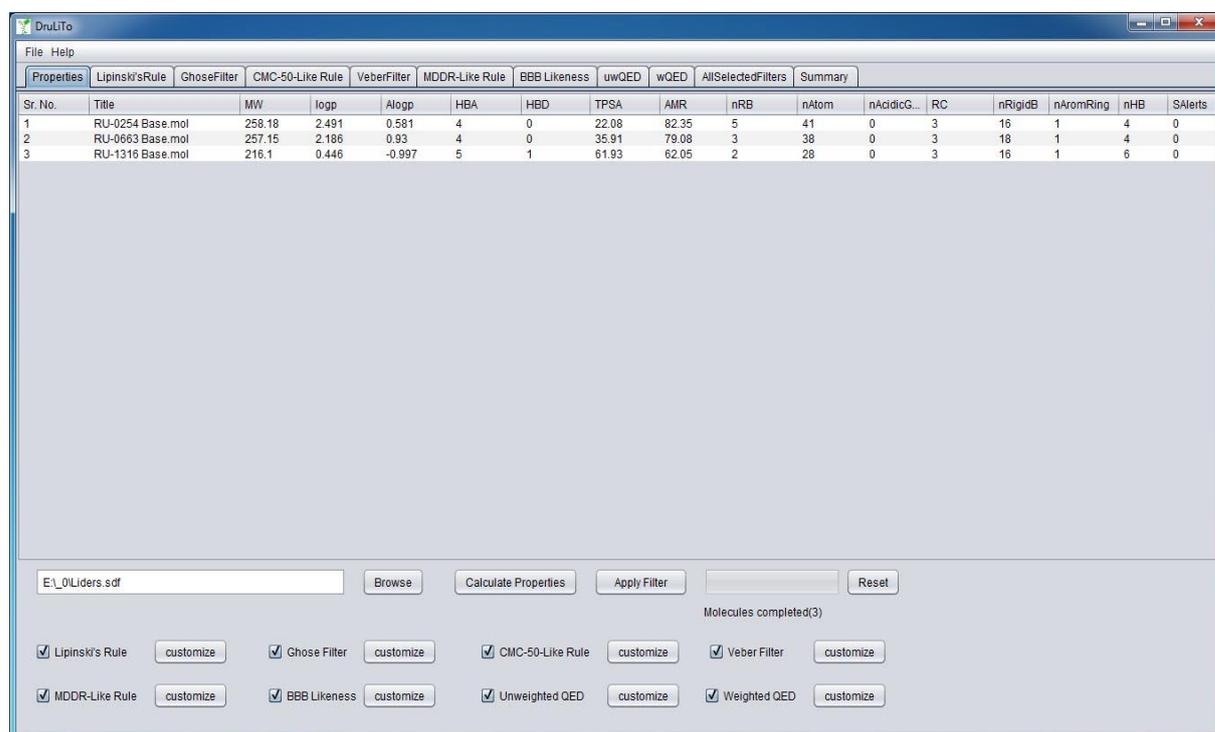


Рисунок 24 – Основные показатели ADME в программе DPULiTo

Пример соответствия показателей ADME соединений-лидеров фильтру CMC-50-like приведен на рисунке 25.

The screenshot shows the DruLiTo interface with the 'CMC-50-Like Rule' filter selected. The table below displays the ADME parameters for three molecules.

Sr.No.	Title	MW	logP	AMR	nAtom
1	RU-0254 Base mol	258.18	2.491	82.35	41
2	RU-0563 Base mol	257.15	2.186	79.08	38
3	RU-1316 Base mol	216.1	0.446	62.05	28

Рисунок 25 – Соответствие показателей ADME соединений-лидеров фильтру CMC-50-like

Итоговый результат применения всех фильтров программы DruLiTo и показателям ADME соединений-лидеров приведена на рис.26.

The screenshot shows the DruLiTo interface with all filters selected. The table below displays the ADME parameters for three molecules across all filters.

Sr. No.	Title	MW	logp	Alogp	HBA	HBD	TPSA	AMR	nRB	nAtom	nAcidic...	RC	nRigidB	nAtom...	nHB	SAAlerts
1	RU-02	258.18	2.491	0.581	4	0	22.08	82.35	5	41	0	3	16	1	4	0
2	RU-06	257.15	2.186	0.93	4	0	35.91	79.08	3	38	0	3	18	1	4	0
3	RU-13...	216.1	0.446	-0.997	5	1	61.93	62.05	2	28	0	3	16	1	6	0

Рисунок 26 – Соответствие показателей ADME соединений-лидеров всем фильтрам программы DruLiTo

Результаты соответствия основных показателей ADME фильтрам программы DPULiTo приведены в табл. 33.

Таблица 33 – Соответствие основных показателей ADME соединений-лидеров фильтрам программы DPULiTo

Название фильтра	Соответствие показателям ADME		
	PY-254	PY-663	PY-1316
Lipinski	+	+	+
Ghose	+	+	+
CMC-50-like	+	+	–
Veber	+	+	+
BBB-Likeness	+	+	+
uwQED	+	+	+
wQED	+	+	+

Таким образом, оценка основных показателей ADME активных соединений-лидеров (PY-254, PY-663, PY-1316) показала, что они соответствуют всем стандартам программы DPULiTo, за исключением соединения PY-1316, показатели которого не соответствуют CMC-50-like фильтру.

Специальные характеристики ADME рассчитанные с помощью модуля QikProp системы Schödingер (пробная версия 10.2), приведены в табл. 34

Таблица 34 – Фармакокинетические показатели ADME трех соединений-лидеров

Показатель	PY-254	PY-663	PY-1316
MW	258,4	257,3	216,2
D	3,62	3,24	7,89
SASA _{tot}	539,3	490,0	435,2
SASA _{hphob}	360,	294,8	151,9
SASA _{hphil}	22,2	41,8	122,4
V _{PSA}	24,7	38,0	69,7

L	29,7	24,5	22,9
LogP	3,220	3,204	0,746
LogS	-2,587	-3,182	-1,025
logK _{HSA}	0,193	0,101	-0,577
Per _{Caco-2}	1521	3978	295
Per _{MDCk}	861	2200	327
Absz _{HOGI}	100	100	76

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

Значимость физико-химических характеристик для прогноза фармакологической активности: дипольный момент рассчитывается для оценки полярности соединения, чем выше полярность соединения, тем хуже вещество проникает через липидные мембраны (для РУ-1316 дипольный момент высокий, что говорит о значительной полярности молекулы, то есть плохой всасываемости); общая сольватационная поверхность представляет собой косвенную меру гидрофобности молекулы (у РУ-254 она выше, чем у двух других веществ); гидрофобная сольватационная поверхность и гидрофильная сольватационная поверхность показывают способность проникать через клеточные мембраны, то есть, чем больше гидрофобная поверхность и меньше гидрофильная, тем легче вещество будет проникать через мембраны (соединение РУ-1316 уступает по этим показателям двум другим); ван-дер-ваальсовская полярная поверхность – величина обратная, то есть, чем больше ван-дер-ваальсовская полярная поверхность, тем более гидрофильным является вещество (значение этого параметра для РУ-1316 высокое); поляризуемость определяет способность молекулы изменять свою форму под воздействием внешнего поля, то есть отражает полярность, деформируемость, гибкость молекулы и способность подстроиться под сайт связывания (сопоставима у всех трех соединений); липофильность и водная растворимость отражает растворимость вещества и всасываемость;

связывание с человеческим сывороточным альбумином характеризует транспортировку вещества в крови (по этому показателю соединение РУ-254 превосходит два других).

Соответствие фармакологических показателей ADME соединений-лидеров 95%-ным доверительным интервалам для референсных препаратов приведено в табл.8. Видно, что только два соединения-лидера (РУ-254 и РУ-663) полностью соответствуют референсным показателям ADME. Кроме того, из данных табл.35 следует, что соединение РУ-663 характеризуется более низкими значениями фармакокинетических параметров, существенных для всасывания, транспортировки вещества и биодоступности, чем РУ-254. Таким образом, по совокупности расчётных фармакокинетических показателей, оцененных программой QikProp, наиболее перспективными для дальнейшего изучения является вещество РУ-254.

Таблица 35– Соответствие фармакологических показателей ADME соединений-лидеров

Показатель	РУ-254	РУ-663	РУ-1316
MW	+	+	+
D	+	+	+
SASA _{tot}	+	+	+
SASA _{phob}	+	+	+
SASA _{phil}	+	+	+
V _{PSA}	+	+	+
L	+	+	+
LogP	+	+	+
LogS	+	+	+
logK _{HSA}	+	+	+
Per _{Caco-2}	++ (высокая)	++ (высокая)	– (невысокая)
Per _{MDCK}	++ (высокая)	++ (высокая)	– (невысокая)
AbsZ _{HOGI}	++ (100%)	++ (100%)	– (76%)
LD50	275,0	64,8	222,5

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

4.3. Заключение.

В ходе подструктурного анализа влияния заместителей на гипогликемическую активность производных циклических гуанидинов установлено, что заместитель R₃-диэтиламиноэтил ((CH₂)₂N(C₂H₅)₂), обуславливает высокий уровень гипогликемической активности. Из трех наиболее активных соединений-лидеров (РУ-254, РУ-663 и РУ-1316) диэтиламиноэтильный фрагмент (CH₂)₂N(C₂H₅)₂ содержит только одно соединение РУ-254.

Частотный анализ выявил, что соединение РУ-254 соответствует признаку $Q(\text{Imid}_1)_{\text{CS}} \geq -0.109$, достоверно влияющему на гипогликемические свойства соединения. У двух других соединений-лидеров (РУ-663 и РУ-1316) не найдено физико-химических признаков, оказывающих статистически достоверное влияние на высокий уровень гипогликемической активности производных циклических гуанидинов.

Фармакофорный анализ показал, что наиболее перспективным соединением, с точки зрения наличия в химической структуре фрагментов, ответственных за достаточно высокий уровень гипогликемической активности, является соединение РУ-254.

Оценка основных показателей ADME активных соединений-лидеров (РУ-254, РУ-663, РУ-1316) показала, что они проходят все основные фильтры программы DPULiTo, за исключением соединения РУ-1316, показатели которого не соответствуют СМС-50-like фильтру.

Оценка специальных характеристик ADME, рассчитанных с помощью модуля QikProp системы Schödinger в общем показала соответствие соединений-лидеров всем основным референсным физико-химическим параметрам.

Однако соединения РУ-663 и РУ-1316 характеризуются более низкими значениями фармакокинетических показателей, существенных для всасывания, транспортировки вещества и его биодоступности в целом. Кроме того, у соединения РУ-663 более высокая токсичность и наименьшее

значение условного терапевтического индекса, чем у соединений РУ-663 и РУ-1316 .

Следовательно, по основным показателям ADME соединений-лидеров соединение РУ-254 предпочтительнее, чем два других.

Таким образом, выбор соединения-лидера для изучения на модели сахарного диабета показал, что РУ-254 предпочтительнее, чем два других соединения (РУ-663 и РУ-1316).

ГЛАВА 5. АНТИДИАБЕТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ ДИАБЕНОЛ

Как известно, причиной развития и прогрессирования осложнений заболевания является именно хроническая гипергликемия (Дедов И.И., 2003; Абусуев С. А., 2000). В отношении эффективного управления СД существуют убедительные доказательства, свидетельствующие, что улучшение гликемического контроля может значительно уменьшить риск развития как микро-, так и макроангиопатии (Дедов И.И., 2003). Исходя из этого, основной целью лечения болезни является как можно более полная компенсация нарушений углеводного обмена (Аметов С.А., 2015). Ранее проведенные исследования на кафедре фармакологии ВоГМУ по гипогликемическому действию диабенола (Дудченко Г.П., Спасов А.А., 1995) показали, что субстанция, содержащая диабенол, снижает уровень сахара в крови при аллоксановом и стрептозотоциновом диабете (Hu Y., 1996). Также была установлена гипертрофия β -клеток поджелудочной железы и увеличение в плазме крови инсулина. При проведении клинических исследований, была установлена достаточно хорошая компенсация углеводного обмена (содержание сахара в крови и гликозилированного гемоглобина) (Дудченко Г.П., 1995).

В данной главе впервые было изучено влияние антидиабетогенных свойств гранулята таблеток диабенола на интактных кроликах для подтверждения гипогликемического эффекта. Затем были более подробно изучены антидиабетогенные свойства как субстанции, так и гранулята таблеток диабенола, как при однократном, так и при курсовом введении. Кроме этого, было изучено влияние диабенола на содержание аланина в крови и гликозилированного гемоглобина субстанции и гранулята таблеток при курсовом введении.

5.1. Материалы и методы исследования

Изучение антидиабетогенных свойств диабенола проводили на 500-та половозрелых белых беспородных крысах-самках, массой 250-300г.,

доставленных из питомника «Рапполово» (Ленинградская обл.) и прошедших двухнедельный карантин в виварии кафедры фармакологии. 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).

Все животные были разделены на 4 основные группы: интактные, с экспериментальным диабетом, с экспериментальным диабетом, получавшие субстанцию диабенола и интактные с экспериментальным диабетом, получавшие гранулят таблеток диабенола. Диабет моделировали путем внутривенного введения (хвостовая вена) стрептозотоцина в дозе 45 мг/кг (на цитратном буфере, pH=4,5). Стрептозотоциновый диабет развивался на 3-5 сутки.

На 5 сутки производили количественное определение уровня сахара в крови животных ферментативным методом, с использованием наборов «Глюкоза ФКД» (Россия). Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре APOL PD-303 UV (Япония). Экспериментальные группы формировались из животных с учетом уровня сахара в крови (не менее 10 ммоль/л). Исследуемая субстанция и гранулят таблеток диабенола (дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2,3-дигидроимидазо[1,2- α]бензимидазола) («ООО След» и «АКРИХИН» соответственно, Россия) в дозе 50 мг/кг вводились ежедневно перорально. Группе интактных животных вводили растворитель по аналогичной схеме и в равноценной дозировке.

Каждую неделю проводилось определение уровня глюкозы в крови и моче, то есть на 7, 14, 21 и 28 день. 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). До начала эксперимента, животные подвергались пищевой

депривации, в течение 12 часов, со свободным доступом к воде. За 2 часа до начала теста толерантности к глюкозе животным, получавшим диабенол, вводили данное вещество, а остальным группам вводили дистиллированную воду в равноценном объеме. Глюкозу вводили перорально и определение гликемии проводили через 30, 90 и 120 минут. Величина площади под кривой «глюкоза-время» служила оценочной и определяла скорость утилизации глюкозы [Древаль А.В., 2005]. Гликемия оценивалась исходя из степени снижения площади под кривой, содержания глюкозы-время, рассчитанной по правилу трапеций.

Определение аланина проводилось в пробах крови. Для анализа аминокислот использовали пластинки со слоем силикагеля фирмы «Силуфол», которые обрезали по шаблону, ставя точки нанесения аминокислот - линии старта (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).

5.2. Изучение антидиабетогенных свойств субстанции и твердой лекарственной формы диабенола при однократном введении.

Блок исследований по антидиабетогенным свойствам диабенола был начат с изучения свойств гранулята таблеток и субстанции диабенола на интактных кроликах для подтверждения гипогликемических свойств гранулята таблеток диабенола.

Было сформировано четыре группы (диабенол-субстанция; диабенол-гранулят таблеток и две контрольные группы) по три кролика в каждой.

Измеряли исходный уровень глюкозы и уровень глюкозы через каждые 2 часа в течение 24 часов (до стабилизации уровня сахара в крови), после введения диабенола (гранулята таблеток и субстанции).

В ходе исследования выяснили, что субстанция диабенола была активнее гранулята таблеток на 2 и 4 часу. Так, на 2 и 4 час эксперимента % глюкозы к исходу при введении субстанции в 4,75, 5,15 превышал данный показатель, после введения гранулята таблеток диабенола. На 6 час произошло увеличение % глюкозы к исходу в группе, получавших гранулят таблеток диабенола (в 1,62). 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.

Следующим этапом эксперимента явилось моделирование стрептозотоцинового диабета крыс. Далее исследования проводили на крысах с моделированным стрептозотоциновым диабетом, при однократном введении субстанции диабенола.

Исследования проводились в течение 12 часов. Субстанцию диабенола изучали в трех дозировках: 25, 50 и 100 мг/кг при пероральном введении.

Таблица 37 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг при однократном введении внутрь) на уровень глюкозы в крови крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом, ($M \pm m$)

доза, мг/кг время	исход, [C] ммоль/л	3 часа, [C] ммоль/л	6 часов, [C] ммоль/л	12 часов, [C] ммоль/л
диабет-контроль	16,81±0,01	13,83±0,03	11,09±0,02	14,54±0,014
диабенол, 25 мг/кг	17,80±0,04*	14,42±0,05*	8,65±0,01*	12,35±0,02*
диабенол, 50 мг/кг	16,89±0,015*	13,91±0,06*	6,05±0,01*	11,91±0,05*
диабенол, 100 мг/кг	17,69±0,06*	12,53±0,04*	5,94±0,02*	13,32±0,04*

* - достоверно по отношению к группе с экспериментальным сахарным диабетом, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

Изучение гипогликемической активности субстанции диабенола в течение 12 часов показало прямую зависимость «доза-эффект-время». Так, при введении диабенола в дозе 25 мг/кг было отмечено снижение уровня глюкозы в крови на 6 час, максимально и к 12 часу постепенное восстановление уровня сахара

в крови, как и должно происходить при физиологической норме. При введении диабенола в дозах 50 и 100 мг/кг наблюдалась идентичная зависимость, но с возрастанием дозировки, снижение уровня сахара в крови происходило более интенсивно. Так, диабенол в дозе 25 мг/кг понижал уровень глюкозы в крови к 6 часу на 22% по сравнению с контрольной группой.

При введении диабенола в дозе 50 и 100 мг/кг происходило снижение уровня сахара в крови на 45% и 46,4% соответственно.

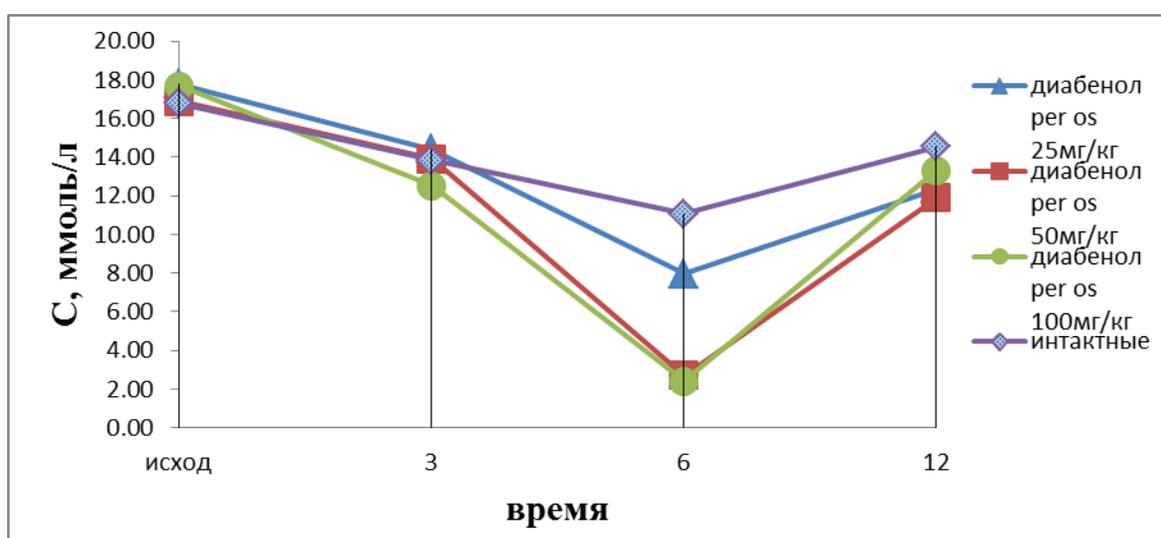


Рис. 27 – Гипогликемический эффект субстанции диабенола в трех концентрациях при однократном введении.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что разница в силе гипогликемического эффекта при введении субстанции диабенола в дозах 50 и 100 мг/кг незначительна, поэтому в дальнейших исследованиях была выбрана доза 50 мг/кг, что более рационально, учитывая токсические свойства данной субстанции.

5.3. Изучение антидиабетогенных свойств субстанции и гранулята таблеток диабенола при курсовом введении.

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).

Таблица 38 – 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) ($M \pm m$)

неделя, [C] ммоль/л группа	I [C], ммоль/л	II [C], ммоль/л	III [C], ммоль/л	IV [C], ммоль/л
интактные	4,24±0,005	3,54±0,004	3,46±0,007	3,61±0,004
диабет	12,52±0,03*	17,05±0,007*	20,24±0,03*	20,75±0,005*
диабенол субстанция	11,48±0,035**	13,05±0,01**	16,0±0,02**	12,14±0,01**
диабенол, гранулят таблеток	11,76±0,02**	14,2±0,04**	15,4±0,32**	11,90±0,01**

* - достоверно по отношению к контролю, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

* * - достоверно по отношению к группе с экспериментальным сахарным диабетом, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

Из таблицы 38 видна тенденция снижения уровня сахара в крови под влиянием диабенола (субстанция и гранулят таблеток), 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, но по силе гипогликемического действия сопоставим с субстанцией диабенола. При дальнейшем более глубоком изучении антидиабетогенных свойств диабенола нами были исследованы и субстанция и гранулят таблеток диабенола в равнозначной концентрации 50 мг/кг.

5.4. Воздействие диабенола на толерантность к глюкозной нагрузке.

Тест толерантности к глюкозе проводился каждую неделю в течение 28 дней введения. Данный показатель мониторинга уровня сахара в крови был

выбран с учетом того, что у больных сахарным диабетом происходит снижение утилизации глюкозы периферическими тканями, о чем свидетельствует увеличение площади под кривой «концентрация глюкозы-время».

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.

На 28 день введения утилизация глюкозы периферическими тканями составила 40% и 52,9% соответственно. Можно сделать вывод о том, что гранулят таблеток был немного 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.

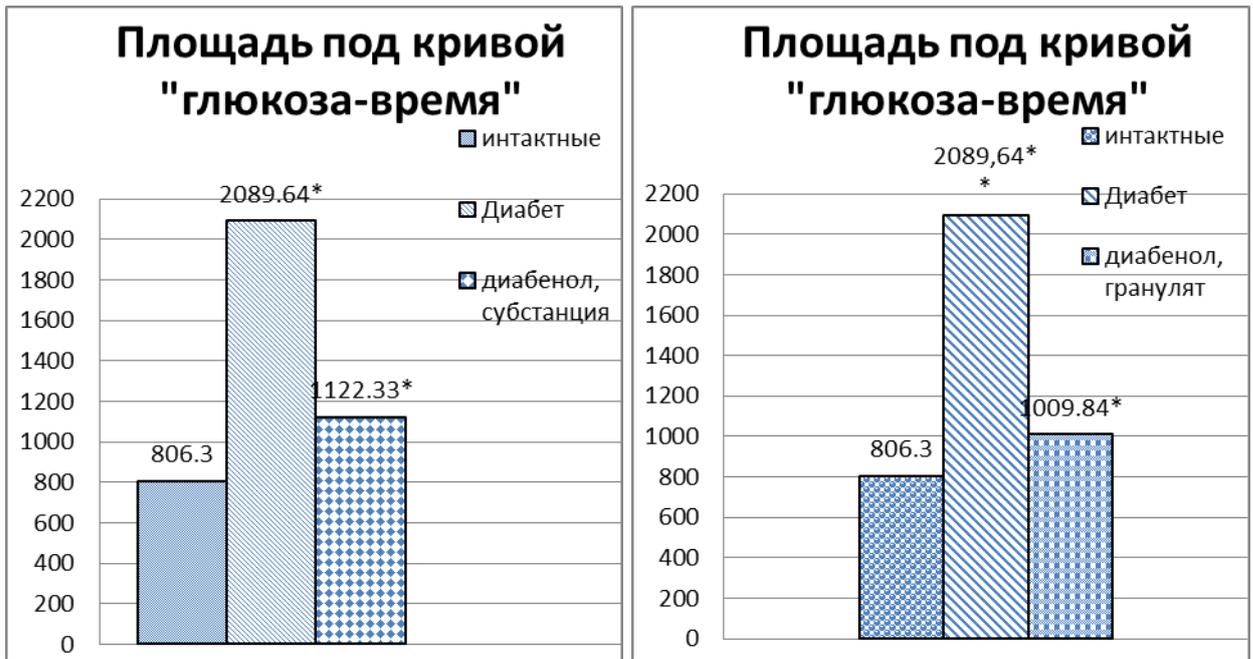


Рис.28 – Влияние субстанции и гранулята таблеток диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на площадь под кривой «глюкоза-время» у крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом (14 день введения)

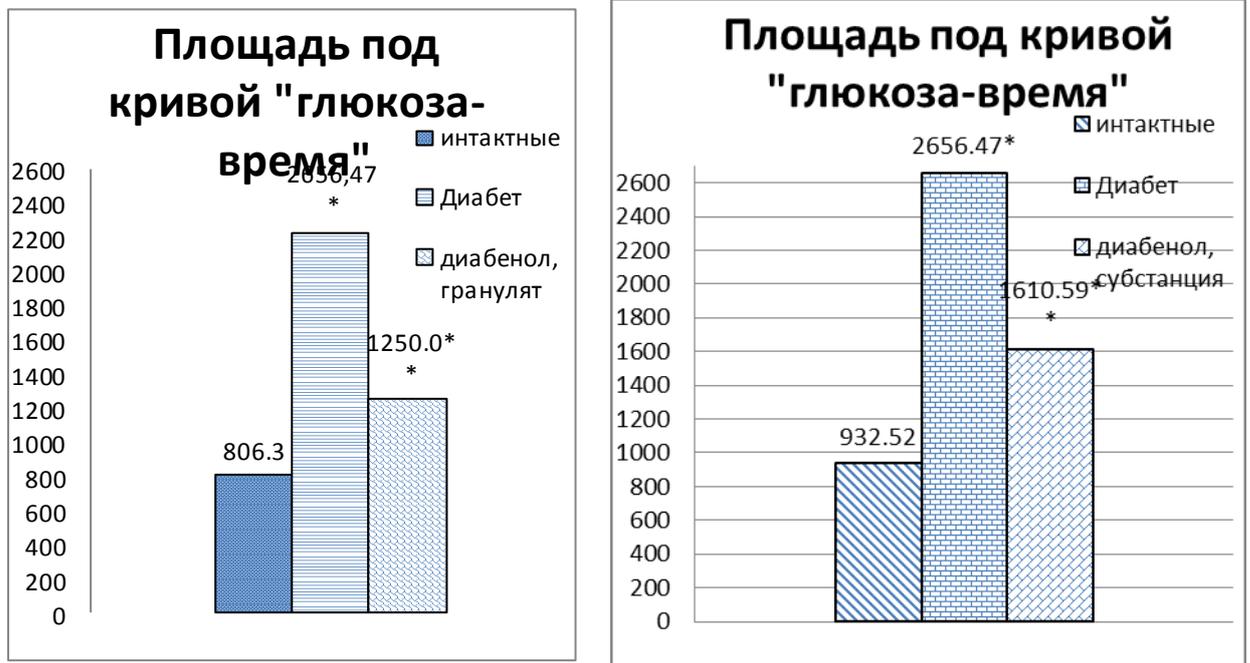


Рис.29 – Влияние субстанции и гранулята таблеток диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на площадь под кривой «глюкоза-время» у крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом (28 день введения).

5.5. Влияние диабенола на содержание аланина в крови крыс при введении субстанции и гранулята таблеток диабенола.

Известно, что при дефиците инсулина (Philip F., 1971) 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.

Таблица 39 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на концентрацию аланина крови крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом, (28 день введения) ($M \pm m$)

Группа животных	Концентрация аланина, ммоль/л
интактные	65,19±6,33
диабет	44,14±14,4*
диабет +диабенол (субстанция)	58,86±5,80**
диабет +диабенол (гранулят таблеток)	56,64±3,97**

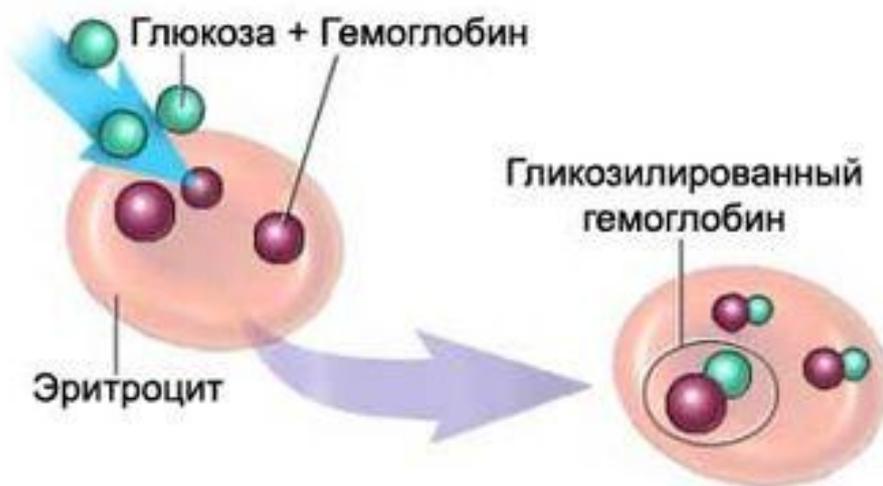
* - достоверно по отношению к контролю, критерий Стьюдента ($p \geq 0,05$)

* * - достоверно по отношению к группе с экспериментальным сахарным диабетом, критерий Стьюдента ($p \geq 0,05$)

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

5.6. Влияние диабенола на уровень гликозилированного гемоглобина.

Гликозилированный гемоглобин (гликированный гемоглобин, HbA1c) определяет уровень глюкозы в крови на протяжении длительного времени (до 3 месяцев). Этот тип гемоглобина образуется вследствие медленной реакции между гемоглобином и глюкозой сыворотки крови (данная реакция происходит самопроизвольно, без участия ферментов). Скорость гликозилирования гемоглобина и его концентрация зависят от среднего уровня глюкозы на протяжении всей жизни эритроцита. Из трех видов гликированного: гемоглобина HbA1a, HbA1b, HbA1c, только лишь последний тип HbA1c преобладает количественно и позволяет судить о степени выраженности сахарного диабета (Балаболкин М.И., 2005). Степень гликозилирования белков зависит от концентрации глюкозы и скорости обновления конкретного белка.



При моделировании стрептозотоцинового диабета наблюдалось (на 28 день введения) увеличение гликозилированного гемоглобина HbA1c в 1,6 раз по сравнению с интактной группой (табл 40). Однако, после курсовой терапии диабенолом (50 мг/кг, субстанция; 28 дней) была отмечена тенденция к снижению гликозилированного гемоглобина HbA1c на 68,7% ($p \geq 0,05$).

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

Таблица 40 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на концентрацию гликозилированного гемоглобина крови крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом, (28 день введения) ($M \pm m$)

Группа животных	Концентрация HbA1c, %
интактные	3,62±0,21
диабет	12,63±0,24*
диабет +диабенол (субстанция)	8,68±0,14**

* - достоверно по отношению к контролю, критерий Стьюдента ($p > 0,05$)

** - достоверно по отношению к группе с экспериментальным сахарным диабетом, критерий Стьюдента ($p > 0,05$)

5.7. Заключение.

По результатам экспериментального исследования оценки влияния субстанции вещества и гранулята таблеток диабенола на уровень глюкозы в крови интактных кроликов установлено, что исследуемые вещества проявляли стойкий и выраженный гипогликемический эффект. Продолжительность гипогликемического действия составляла 20-24 часа, что совпадает с таковыми эффектами у препаратов сравнения (метформин, глибенкламид), применяемыми в настоящее время в клинической практике.

При изучении проявления антидиабетогенного действия при однократном введении в разных дозировках была выявлена оптимальная доза (50 мг/кг) с максимальным гипогликемическим эффектом и наименьшими токсическими свойствами.

При исследовании антидиабетогенного действия при курсовом введении диабенола было показано, что гранулят таблеток снижал уровень сахара в крови наиболее планомерно, но по силе гипогликемического действия был сопоставим с субстанцией диабенола.

Тест толерантности к глюкозе выявил достоверное снижение показателя площадь под кривой «концентрация глюкозы – время» субстанции и гранулята таблеток диабенола на 40% , на протяжении 28 дней введения. Это свидетельствует о влиянии диабенола на увеличение утилизации глюкозы.

Кроме этого, диабенол достоверно снижал концентрацию аланина при введении субстанции и гранулята таблеток, что может свидетельствовать о ингибировании глюконеогенеза в печени.

При исследовании воздействие диабенола (субстанция и гранулят) на содержание гликированного гемоглобина, установлено влияние на снижение уровня гликозилированного гемоглобина HbA1c, что доказывает влияние диабенола на углеводный обмен.

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

ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА АНТИДИАБЕТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ДИАБЕНОЛА У КРЫС СО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Из ранее проведенных исследований по возможным механизмам действия диабенола (субстанции) был установлен инсулиотропный эффект. Так, в экспериментах по исследованию механизма действия субстанции диабенола было продемонстрировано, что в ответ на его внутривенное введение, наблюдалось увеличение инсулина в крови наркотизированных кошек, сочетающееся с гипогликемическим эффектом, что возможно является доказательством инсулиотропного эффекта, основанного на стимулировании функционально способных β -клеток островков Лангерганса (Г. П. Дудченко, А. А. Спасов, 2000). Следует отметить, что повышение количества гормона приходится на 1-ю фазу секреции инсулина.

Современный уровень научных исследований этиологии и патогенеза СД позволяет находить новые мишени для антидиабетических соединений. В настоящее время разнонаправленность поиска лекарственных средств и условно выделить 4 основных направления: нормализацию биологического действия инсулина и устранение инсулинорезистентности, восстановление физиологической секреции инсулина и снижение продукции глюкозы печенью.

Следует отметить, что не менее важную роль в патогенезе СД имеет снижение секреции инсулина, связанное с прогрессирующим понижением функциональной активности β -клеток поджелудочной железы, сопутствующее развитию инсулинорезистентности. Снижение эффекта инкретинов — один из важных дефектов, приводящий к уменьшению глюкозозависимой секреции инсулина (Рудой А. С., 2016; Шестакова М., 2012; Майоров А. Ю., 2006). В последнее десятилетие благодаря фундаментальным и клиническим исследованиям в данной области развилось новое и перспективное направление в лечении СД 2-го типа, базирующееся на использовании инкретинового эффекта. Выделяют 2 основных группы соединений,

регулирующих энтероинсулярную ось: агонисты GLP-1 рецепторов (GLP-1 миметики, инкретиномиметики) (Hokenson M. J., 2007; Анциферов М. Б., 2009; Dharmalingam M., 2011) и ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (DPP4) (инкретинэнхансеры) (Gallwitz B., 2010). Препараты данных групп либо восполняют дефицит инкретинов, либо тормозят процессы деградации и таким образом стимулируют секрецию инсулина и ингибируют секрецию глюкагона, тормозят процессы апоптоза β -клеток поджелудочной железы и усиливают их регенерацию, что позволяет достичь пролонгированного эффекта и воздействовать на одно из звеньев патогенеза заболевания (Ranganath L.R., 2008).

Рядом авторов была выявлена ДПП-4 ингибирующая активность у диабенола на интактных животных, значение ИК50 составила $150,5 \pm 17,9$ нМ, и соединение уступало вилдаглиптину и ситаглиптину (Романцова Т. И., 2006). Таким образом, предположительным механизмом действия данной субстанции является ингибирование ДПП-4 и модуляция инсулиносекреторной функции поджелудочной железы (Н.Н. Золотов, В.М. Креминская, 2013). Исходя из вышеизложенного, представляется интересным проверить влияние препарата лимиглидола на ингибирование ДПП-4 и на регенерацию β -клеток, при стрептозотоциновой экспериментальном диабете. Глюконеогенез поддерживает оптимальный уровень глюкозы в период между приемами пищи, однако при СД, как вследствие снижения концентрации инсулина, так и из-за резистентности тканей к инсулиновому сигналу, активируется процесс синтеза глюкозы в печени из неуглеводных источников. Следовательно, повышение продукции глюкозы печенью является одним из основных и ведущих факторов в патогенезе СД и требует дополнительной фармакологической коррекции. Следует отметить, что повышение интенсивности глюконеогенеза в печени в 3 раза и более, наблюдающееся при умеренной недостаточности инсулина, связано с тем, что для угнетения глюконеогенеза требуется сравнительно больше количества инсулина, чем для угнетения гликогенолиза (Felig P., Wahren J.,

1971). Регуляция ключевых ферментов углеводного обмена в печени, активация ферментов гликолиза и синтеза гликогена (гликогенсинтазы, гексокиназы, фосфофруктокиназы, пируваткиназы) и ингибирование ферментов глюконеогенеза и гликогенолиза (гликогенфосфоорилазы, фосфоенолпируваткарбоксилазы) (Woodgett J. R. , 2003; Wu C., 2005) служат точкой приложения действия соединений и одним из перспективных направлений поиска и создания нового класса препаратов для лечения СД 2-го типа.

В наших исследованиях была изучена скорость гликолиза и гликогенолиза, а также ингибирующая активность одного из ключевых ферментов гликогенолиза - гликогенфосфоорилазы.

Известно, что после приема пищи снижается постпрандиальная гипогликемия (Зилов А. В., 2010) и вторично к ней постпрандиальная гиперинсулинемия. При связывании α -глюкозидазных ферментов, в просвете тонкого кишечника, (сахароза, мальтоза, изомальтоза и глюкоамилаза) наблюдается блокирование распада дисахаридов и олигосахаридов (сахара и крахмала) до глюкозы и фруктозы. Конкурентное ингибирование α -глюкозидаз полностью подавляет всасывание углеводов в проксимальном отделе кишечника, что приводит к снижению пика постпрандиальной гликемии. Исходя из вышесказанного, логично вытекает необходимость изучения влияния диабенола на α -глюкозидазные ферменты, отвечающие за всасывание углеводов в проксимальном отделе кишечника.

Все вышеизложенные исследования проводились после курсового, 28-дневного введения диабенола крысам со стрептозотоциновым сахарным диабетом.

6.1. Материалы и методы исследования.

Компьютерный прогноз антидиабетической активности диабенола был выполнен с помощью ИТ «Микрокосм» 5.1, системы PASS 10.4, методом докинга в программе AutoDock Vina 1.1.1 (Trott O., 2010) и методом сходства к эталонам. Трехмерные модели белков-мишеней были взяты из баз данных

PDB и ModBase. Структуры референсных препаратов получены из международных поисковых систем по фармакологической активности соединений. В ИТ «Микрокосм» в качестве оценок уровня активности были взяты значения функций принадлежности к классу активных соединений F_{Cons} , F_{Norm} , F_{Risk} , рассчитанные с помощью консервативной, нормальной и рискованной стратегий, соответственно. В системе PASS оценкой уровня активности служили вероятность проявления активности P_a и отношение вероятности проявления активности к вероятности ее отсутствия P_a/P_i . При докинге показателем аффинитета соединений служила энергия образования комплекса «лиганд-белок» δE . В методе сходства к эталонам активность оценивали по среднему значению коэффициента сходства Танимото к референсным препаратам.

Реактивы, применявшиеся в ходе экспериментов: трихлоруксусная кислота (ТХУ) (х.ч., Россия); лактат лития (ч.д., Россия); п-оксидифенил (AcrosOrganics, США), серная кислота (о.с.ч., Сигматек, Россия), медь сернокислая (ч.д.а., Реахим, Россия), ортофосфорная кислота (х.ч., Россия), антрон (Reanal, Венгрия), гликоген (Sigma, США), калия гидроксид и натрия гидроксид (х.ч., Россия), калия дигидрофосфат и калия гидрофосфат (х.ч., Россия), магния хлорид (ч.д.а., Реахимсервис, Россия), соль динатриевая кислоты аденозин-5-дифосфорной (АДФ) и соль динатриевая кислоты аденозин-5-трифосфорной (АТФ) (Reanal, Венгрия); глюкоза (ч.д.а., Экрос, Россия), н-бутанол и этанол 96% (ч., Россия), кислота уксусная (х.ч., Россия). Хроматографические камеры и пластинки со слоем силикогеля (Силуфол, Россия), аланин и нингидрин (Reanal, Венгрия), ацетон, кислота соляная, кислота азотная, меди нитрит (х.ч., Россия), хлоралгидрат (Органика, Россия), натрия цитрат (ч.д., Россия) и кислота лимонная (Диаэм, 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).

Моделировали сахарный диабет внутривенным введением (хвостовая вена) стрептозотоцина в дозе 45 мг/кг (на цитратном буфере, pH=4,5). 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. Каждую неделю проводился тест толерантности к глюкозе для определения нарушения толерантности к глюкозе. Концентрацию С-пептида в плазме крови определяли иммуноферментативным способом (DRG, Австрия).

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-НСl буфера (pH 8,4) и 40 мкл плазмы человека. Анализируемую смесь преинкубировали при 37°C в течение 5 мин. После преинкубации добавляли 100 мкл 1 мМ субстрата реакции Гли-Про-р-нитроанилида (Sigma, США), полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Развитие желтого окрашивания из-за высвобождения 4-нитроанилина определяли при 405 нм, используя прибор для считывания планшетов (ELx800, BioТес, США). В качестве препаратов сравнения были выбраны ситаглиптин (Sigma, США), вилдаглиптин (Новатрис Фарма АГ, Швейцария), дипротин А (Sigma, США). Величину ингибирования рассчитывали по следующей формуле: (контроль – тест/контроль)*100%. Значения ИК50 подсчитывали, используя Graphit 4.0.15 (Erithacus Software, Ltd, UK). Оценку активности ДПП-4 в плазме животных проводили по стандартному протоколу (Sigma) и выражали в нмоль р-нитроанилида, образовавшегося в результате реакции, в мл реакционной смеси в минуту.

Морфологическое исследование было выполнено на крысах, разделенных на следующие группы: контрольная группа (интактные животные); вторая группа – животные с моделью стрептозотоцин-индуцированного СД; третья группа – животные с моделью стрептозотоцин-индуцированного СД, получавшие субстанцию (диабенол в дозе 50 мг/кг).

На 28 сутки животных выводили из эксперимента с последующим гистологическим исследованием ткани поджелудочной железы с разделением на два фрагмента – кишечный и желудочный. Полученный материал фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина (рН 7,4) в течение 24 часов. На роторном микротоме изготавливали срезы толщиной 5-6 мкм и монтировали их на предметные стёкла. Для обзорных целей микропрепараты окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятым гистологическим методикам (Newell K. J., et al., 2001; Киясов А. П., 2001; Коржевский Д. Э., 2005).

Для выявления эндокриноцитов β островков Лангерганса использовали первичные моноклональные антитела к инсулину (клон Ab-6 (INS04 + INS05), LabVision, Великобритания). Иммуногистохимическое исследование проводили в соответствии с протоколами фирм производителей антител без предварительной демаскировки антигенов с использованием системы детекции «UltraVision» (LabVision, Великобритания) и хромогеном – диаминобензидином (с докраской гематоксилином). Достоверность полученных результатов контролировали с помощью позитивных и негативных контролей антигенов, а также негативных контролей антител. В ходе иммуногистохимической реакции определяли удельное количество инсулин-позитивно окрашенных клеток панкреатических островков (Pozzilli P., 2006; Pittenger G. L., 2009) и среднее количество островков стандартизированными методами морфометрии в иммуногистохимии с помощью системы анализа изображений (Петров С. В., Райхлин Н. Т., 2004; Dabbs D. J. 2010). Фотопротоколирование микроскопических изменений производили с использованием комплекса из микроскопа «Axio Scope» (Carl Zeiss, Германия) и цифровой фотокамеры «Power Shot» (Canon, Япония). Морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной программы «Видео ТестМорфо-4» (Россия). Определяли удельное количество В-клеток панкреатических островков по отношению к клеткам островков (%). Результаты обрабатывались методами базисного статистического анализа на

ПК с использованием программ «Видео ТестМорфо-4», Excel Microsoft Office (Microsoft, USA) и STATISTICA 6.0 (Stat Soft Inc., USA). Анализ параметров при нормальном распределении значений проводили с помощью критерия Стьюдента. Значимыми считали различия, если вероятность ошибки $p < 0,05$. 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 мкмольях лактата на мг белка ткани.

Определение гликогена проводилось в печени по методу VanderVies. J (1954). Определение содержания общего белка в гомогенате проводилось по методу (Ткачук В.А., 2014; Дарбре А., 1989), с помощью биуретового реактива.

Для оценки ГФ (гликогенфосфорилазы) ингибиторной активности 100 мкл 50 mM HEPES буфера с pH 7,2 содержащего 100 mM хлорид калия, 2,5 mM хлорид магния, 0,5 mM глюкозо-1-фосфата (Sigma, США), 1 мг/мл гликогена, преинкубировали с мышечной гликогенфосфорилазой α кролика (Sigma, США) и исследуемыми соединениями при 30°C 30 минут. После преинкубации количество высвобожденного неорганического фосфата измеряли через 20 минут после добавления 150 мкл 1 M раствора HCl, содержащего 10 мг/мл молибдата аммония и 0,38 мг/мл малахитового зеленого [L.J. Yu, Y. Chen, 2006]. Развитие окрашивания определяли при 620 нм, используя прибор прибор для считывания планшетов (Infinite M200, Tecan, Австрия). В качестве вещества сравнения был выбран кверцетин (Sigma, США). Соединения и кверцетина (Sigma, США) растворяли в 14% ДМСО до конечной концентрации 0,1 mM добавляли в реакционную смесь. В контрольную смесь без ингибитора вносили ДМСО в аналогичной концентрации.

Ингибирование α -глюкозидазы определяли с помощью метода описанного Elya B.(2012). 1 мг глюкозидазы (*Saccharomyces cerevisiae*, Sigma, США) растворяли в 100 мл фосфатного буфера (pH 6,8). В реакционную смесь,

состоящую 50 мкл соединения или препарата сравнения в различных концентрациях в фосфатном буфере с pH 6,8 и 25 мкл 5 mM p-нитрофенил α -D-глюкопиранозид (Sigma-Aldrich, Швейцария) после предварительной инкубации при 37° C в течение 5 мин, вносили 25 мкл α глюкозидазы (0,15 ед/мл) и инкубировали при 37° C в течение 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 200 мкл 200 mM Na₂CO₃. Активность α -глюкозидазы определяли спектрофотометрически при 400 нм на приборе для считывания планшетов (Infinite M200, Tecan, Австрия) путем измерения количества p-нитрофенола, высвободившегося из p-нитрофенил α -D-глюкопиранозид (Elya B., Basah K, 2012). В качестве препарата сравнения использовали акарбозу (Sigma, США).

Определения активности гликогенфосфорилазы (PYGL) *in vitro*. Для оценки ингибиторной активности соединений в отношении гликогенфосфорилазы 100 мкл 50 mM HEPES буферного раствора (pH 7.2), содержащего 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM глюкозо-1-фосфата (Sigma #G6875, США) и 1 мг/мл гликогена, инкубировали с мышечной гликогенфосфорилазой кролика (Sigma #P1261, США) и 5 мкл раствора исследуемого вещества заданной концентрации при 30°С в течение 30 минут. Затем вносили в реакцию смесь 150 мкл раствора, содержащего 1.05% (NH₄)₂MoO₄ и 0.034% малахитового зеленого. Определяли количество высвобожденного фосфат-аниона через 20 мин при 30°С по величине оптической плотности при длине волны 620 нм (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*. Активность глюкокиназы (ГК человеческой печени рекомбинантная, экспрессированная в *E. coli*, Sigma SRP6045, США) 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). Анализ проводили при 37°C в 96-луночном прозрачном полистиреновом планшете с плоским дном (Costar 9018, США) в конечном инкубируемом объеме 210 мкл. Инкубационная смесь содержала: 25 mM HEPES (pH 7,2), 25 mM KCl, 5 mM D-глюкозы, 1 mM АТФ, 1,8 mM NAD, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, тестируемое соединение или 5% ДМСО, 1.8 ЕД/мл Г6ФДГ и 2 мкг/мл ГК. Тестируемые соединения вносили в 5% ДМСО и предварительно инкубировали с ГК в термостатируемом шейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) в течение 10 мин до достижения температурного равновесия, а затем инициировали реакцию введением 10 мкл раствора D-глюкозы (Salt D., 2006). За меру активности ГК принимали повышение оптической плотности при длине волны 340 нм в течение 20 мин инкубирования после начала реакции. Измерения проводили с помощью микропланшетного ридера Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия). В качестве положительного контроля использовали экспериментальный активатор глюкокиназы MBX-2982 (Ohishi T., 2012).

Реакцию гликирования воспроизводили по методу A. Jedsadayamata (2005). В экспериментальные образцы добавляли 50 мкл раствора изучаемых веществ в различных концентрациях, в контрольные образцы добавляли растворитель в аналогичном объеме. Все экспериментальные образцы инкубировали в течение 24 часов при 60°C. По истечении срока инкубации, проводили определение специфической флуоресценции гликированного бычьего сывороточного альбумина (БСА) на спектрофлуориметре F-7000 (Hitachi, Япония) при длине волны возбуждения 370 нм и испускания 440 нм. В качестве вещества сравнения использовали аминокуанидин.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни, табличного редактора Microsoft Excel 2007 и программы GraphPad Prism 5.0.

6.2. Компьютерный прогноз *in silico* механизма действия диабенола

Для планирования изучения антидиабетогенного действия диабенола первоначально, был определен механизм действия методом *in silico*, и на

основе прогнозных данных проведено экспериментальное изучение механизма действия.

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 (Поройков В.В., 1996), в том числе, ее высокого уровня (Поройков В.В., 2009; Поройков В.В., 2001).

Современный уровень научных исследований этиологии и патогенеза СД позволяет находить новые мишени для антидиабетических соединений. Поэтому для соединения-лидера был выполнен разнонаправленный поиск, который условно можно разделить на 4 основных направления: нормализацию биологического действия инсулина и устранение инсулинорезистентности, восстановление физиологической секреции инсулина, снижение продукции глюкозы печенью и раннюю профилактику осложнений СД (табл. 41).

Таблица 41 – Результаты анализа *in silico* механизма действия диабенола

Мишень	PASS, P_a/P_i	К	MC TestSim, T_{QL}	К	Докинг, ΔE	К	Kmean	Fm
инсулинсекреторная активность	0,98							
DPP-4 inh	2,21	1	0,169	1	-6,20	0	0,67	0,300
PYGL _{cat} inh	0	0	0,118	0	-7,21	1	0,33	0,112
PPAR γ agon	0	0	0,138	0	-6,97	0	0	0,001
HK-4 activ	0,01	0	0,148	0	-7,1	0	0	0,001
JAK2 inh	0,08	0	0,139	0	-6,5	1	0,33	0,112
FBP1	0,01	0	0,172	0	-6,60	0	0	0,001
PARP1	0,21	0	0,208	0	-7,90	1	0,33	0,112
PTP1B	0	0	0,220	0	-7,20	0	0	0,001
PDK4	0,05	0	0,124	1	-6,80	0	0,33	0,112
AMPK	0,08	0	0,101	0	-6,90	0	0	0,001

Нормализацию биологического действия инсулина

Снижение инсулинорезистентности периферических тканей возможно посредством модуляции активности рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом (PPAR), одного из регуляторов метаболизма углеводов, жиров и белков (O'Moore-Sullivan T.M., 2002). Соединения, мишенями которых являются α - и γ -PPAR, имеют комбинированную активность препаратов группы тиазолидиндионов и фибратов, поэтому представляют интерес для поиска новых антидиабетических средств с гиполипидемическими свойствами (Sharma R., 2008).

Физиологическая регуляция действия инсулина контролируется посредством баланса между фосфорилированием и дефосфорилированием инсулинового рецептора. Протеинтирозинфосфатаза 1В (PTP1B) — первый фермент из группы протеинтирозинфосфатаз, у которого была обнаружена способность дефосфорилировать инсулиновый рецептор и свойства регулятора инсулинового сигнального пути по принципу отрицательной обратной связи (Sparks R. B., 2007; Sharma R., 2008). Блокирование данного фермента является оптимальной мишенью для поиска препаратов для лечения СД 2-го типа и ожирения.

Восстановление физиологической секреции инсулина

Следует отметить, что не менее важную роль в патогенезе СД играет снижение секреции инсулина, связанное с прогрессирующим снижением функциональной активности β -клеток поджелудочной железы, сопутствующее развитию инсулинорезистентности (Hinnen D., 2006; Dungan K. M., 2009). Длительность сохранения секреторной функции островков Лангерганса определяет начало инсулинотерапии при СД 2-го типа. Снижение эффекта инкретинов – один из важных дефектов, приводящий к снижению глюкозозависимой секреции инсулина (И.И. Дедова, 2011). Ингибирование DPP4 позволяет преодолеть некоторые проблемы, связанные с клиническим применением GLP-1 и его аналогов: отсутствие пероральных форм и быструю деградацию GLP-1 (Ross A.S, 2010; Gorrell M.D., 2005; Draznin B., 1987). Однако, помимо GLP и GIP, субстратами для фермента являются нейропептид Y, пептид YY, 9 хемокинов, что

обуславливает наличие иммуотропной и психотропной активности у данной группы средств (Gupta R., 2009). DPP-4 входит в состав семейства, которое включает 4 фермента DPP-4, протеинактиватор фибробластов (FAP), дипептидилпептидазу-8, дипептидилпептидазу-9 и 2 белка без ферментативной активности – DPP-4-подобный протеин-6 (DPP-6) и дипептидилпептидазу-10 (Gorrell M.D., 2005).

Соединения, снижающие продукцию глюкозы печенью

Регуляция ключевых ферментов углеводного обмена в печени, активация ферментов гликолиза и синтеза гликогена (гликогенсинтазы, гексокиназы, фосфофруктокиназы, пируваткиназы) и ингибирование ферментов глюконеогенеза и гликогенолиза (гликогенфосфорилазы, фруктозобифосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы, фосфоенолпируват-карбоксилазы) (Herling A. W., 1998; Wu C., 2005; Kahn B. B., 2005; Sanders M. J., 2007; Hardie D. G., 2007; Dang Q., 2008; Heng S., 2010) служат точкой приложения действия соединений и одним из перспективных направлений поиска и создания нового класса препаратов для лечения СД 2-го типа.

Один из современных препаратов данной группы, используемый в клинической практике в настоящее время – метформин, который по последним данным является активатором АМК-киназы (Carling, D., 2004; DeSimone., 2004; Minokoshi Y., 2004; Lindgren K., 2007; Carling, D., 2008; Dang Q., 2011), что вероятно, и определяет его мультитаргетность и плейотропность действия.

Препараты с различными механизмами действия

В данную группу относятся мишени, которые мало изученные на сегодняшний день, но есть косвенные доказательства их действия на антидиабетогенные свойства: JAK2 inh; FBP1; PDK4 (Anderson, N. G., 1990).

Исходя из данных, представленных в табл. 1, хотелось бы отметить несколько мишеней – DPP IV; PYGL_{cat}inh; PARP1, в отношении которых изучаемое вещество проявляло слабую активность. Что касается остальных мишеней, то их значимость не была ярко выражена.

Таким образом, анализ четырьмя методами *in silico* уровня активности гипогликемического соединения в отношении десяти белков-мишеней, релевантных антидиабетической активности, позволил сформировать обоснованные заключения относительно возможных молекулярных механизмов действия указанного вещества.

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

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

6.3. Влияние субстанции диабенола на С-пептида при экспериментальном диабете

Известно, что во время секреции инсулина происходит превращение проинсулина в инсулин и С-пептид посредством β -клеток. С-пептид (рис.30) является показателем синтеза эндогенного инсулина и обмена углеводов, поэтому позволяет оценивать функцию β -клеток поджелудочной железы.

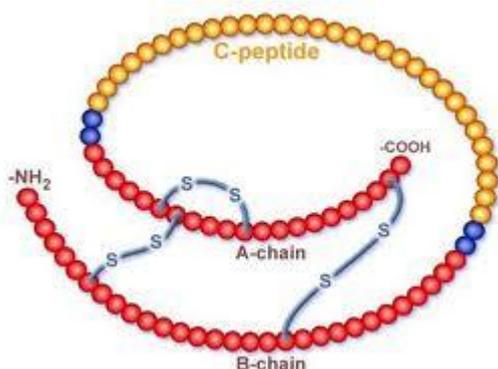


Рис.30 – С- пептид

На 28 день введения наблюдалось снижение уровня С-пептида на 19,48% в группе крыс со стрептозотоциновым диабетом (табл. 42). В группе, получавших диабенол в дозе 50 мг/кг, содержание С-пептида повышалось на 16,68% по отношению к животным с экспериментальным диабетом.

Таблица 42 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на С-пептид у крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом, (28 день введения) ($M \pm m$)

Группы животных	Концентрация С-пептида, нг/мл
интактные	15,71±0,35
диабет	12,65±0,36*
диабет+диабенол	14,76±0,049**

* - достоверно по отношению к контролю, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

** - достоверно по отношению к группе с экспериментальным сахарным диабетом, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$).

6.4. Влияние диабенола на активность ДПП-4

При исследовании способности известных препаратов (вилдаглиптин, ситаглиптин, дипротин А) ингибировать ДПП-4 и гомологичные ферменты плазмы крови человека, выявлено, что зависимость доза – эффект носила сигмовидный характер. Полученные данные показателей ИК50 согласуются с результатами исследований Thomas L. и др. (2008), согласно которым он составляет для ситаглиптина 19 нМ, вилдаглиптина – 62 нМ (табл. 43)

(L. Thomas, M. Echard, 2008). Дипротин А – трипептид (Phe-Pro-Phe), (ингибитор ДПП-4) в данном исследовании по активности значительно уступал вилдаглиптину и ситаглиптину и ингибировал фермент в микромолярных концентрациях. Диабенол (ИК 50=1,67 мМ) значительно уступал по эффективности ингибирования вилдаглиптину, ситаглиптину и дипротину А.

Таблица 43 – ДПП 4 ингибирующая активность вилдаглиптина, ситаглиптина, дипротина А и диабенола

Соединение	ИК 50 (95%, ДИ)
Ситаглиптин	3,39 – 21,50*10 ⁻⁹ М
Вилдаглиптин	6,73 – 24,91*10 ⁻⁹ М
Дипротин А	6,06 – 30,03 *10 ⁻⁶ М
Диабенол	1,35 – 2,05*10 ⁻³ М

В экспериментах *in vivo* (при однократном введении), на интактных животных, было показано, что диабенол изменял активность ДПП-4 в плазме крови на 6 час исследования (табл. 44).

Таблица 44 – Влияние диабенола (в дозе 50 и 500 мг/кг) на активность ДПП-4 в плазме крови крыс при однократном введении ($M \pm m$) внутрь

группы	1 час, нмоль/мл/мин	6 часов, нмоль/мл/мин
интактные	55,83±14,10	62,57±14,56
Диабенол 50 мг/кг	61,86±30,22	8,75±17,90
Диабенол 500 мг/кг	6,59 ±20,40	7,22±20,61

Как следует из данной таблице, при однократном введении диабенола в дозе 50 мг/кг активность ДПП-4 не изменялась, и только к 6 часу отмечалось существенное снижение активности данного фермента.

При курсовом введении субстанции диабенола в десятикратной дозе отмечалось снижение активности ДПП-4, начиная с первого часа. Весьма вероятно, учитывая отсутствие эффекта диабенола в первый час введения и выраженное его влияние на активность фермента в последующем, можно предположить образование активных метаболитов диабенола, ингибирующих ДПП-4.

В последующем, диабенол и препарат сравнения вилдаглиптин вводили перорально в течение 28 дней (табл. 44а). Было установлено, что после введения изучаемых соединений отмечалось снижение активности фермента с максимальным развитием эффекта, начиная с 3 часа.

Таблица 44а – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на активность ДПП-4 у крыс со стрептозотоциновым(45 мг/кг, в/в) диабетом (28 день введения) ($M \pm m$)

Группы	1 час		3 часа		6 часов		9 часов	
	нмоль/мл/мин	$\Delta\%$	нмоль/мл/мин	$\Delta\%$	нмоль/мл/мин	$\Delta\%$	нмоль/мл/мин	$\Delta\%$
Интактные	325,02±1,4	–	292,04±3,9	–	340,10±1,2	–	295,98±1,3	–
Вилдаглиптин 5 мг/кг	313,87±7,0	-3,46	176,40±1,3	-39,6	174,08±5,6	-48,8	274,87±3,8	-7,2
Диабенол 50 мг/кг	336,25±67,35	+3,4	200,33±3,2	-31,5	257,31±3,3	-25,4	267,95±3,2	-9,5

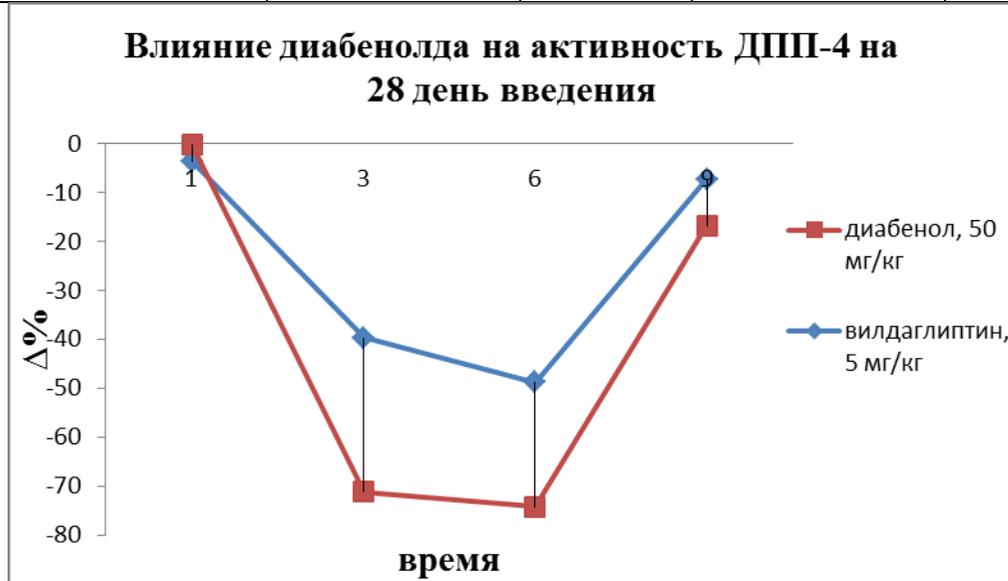


Рис. 30а. – Влияние диабенола на активность ДПП-4

6.5. Морфологические изменения эндокринного аппарата поджелудочной железы под воздействием диабенола.

При морфологическом исследовании в контрольной интактной группе панкреатические островки во всех отделах поджелудочной железы имели округлую или слегка овальную форму и располагались поодиночке или группами из нескольких островков преимущественно рядом с внутридольковыми выводными протоками. Центральные отделы островков Лангерганса состояли преимущественно из инсулин-позитивных клеток с накоплением в цитоплазме большого количества иммунопозитивного материала (рис. 31). Деструктивные и воспалительные изменения отсутствовали.

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 (Fujimoto K., 2009). Панкреатические островки имели округлую, овальную или неправильную форму. Иммунопозитивный материал располагался неравномерно, с преимущественным накоплением в единичных группах клеток панкреатических островков (рис. 2). Количество инсулинпозитивных клеток уменьшалось во всех отделах железы, а в отдельных островках инсулиноциты отсутствовали.

При введении субстанции диабенола 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 В-эндокриноцитов. Визуализировались некробиотические изменения инсулиноцитов (в отдельных островках вплоть до полного отсутствия). В некоторых островках сохранялись единичных разрозненных инсулин-позитивные клетки (рис. 31).

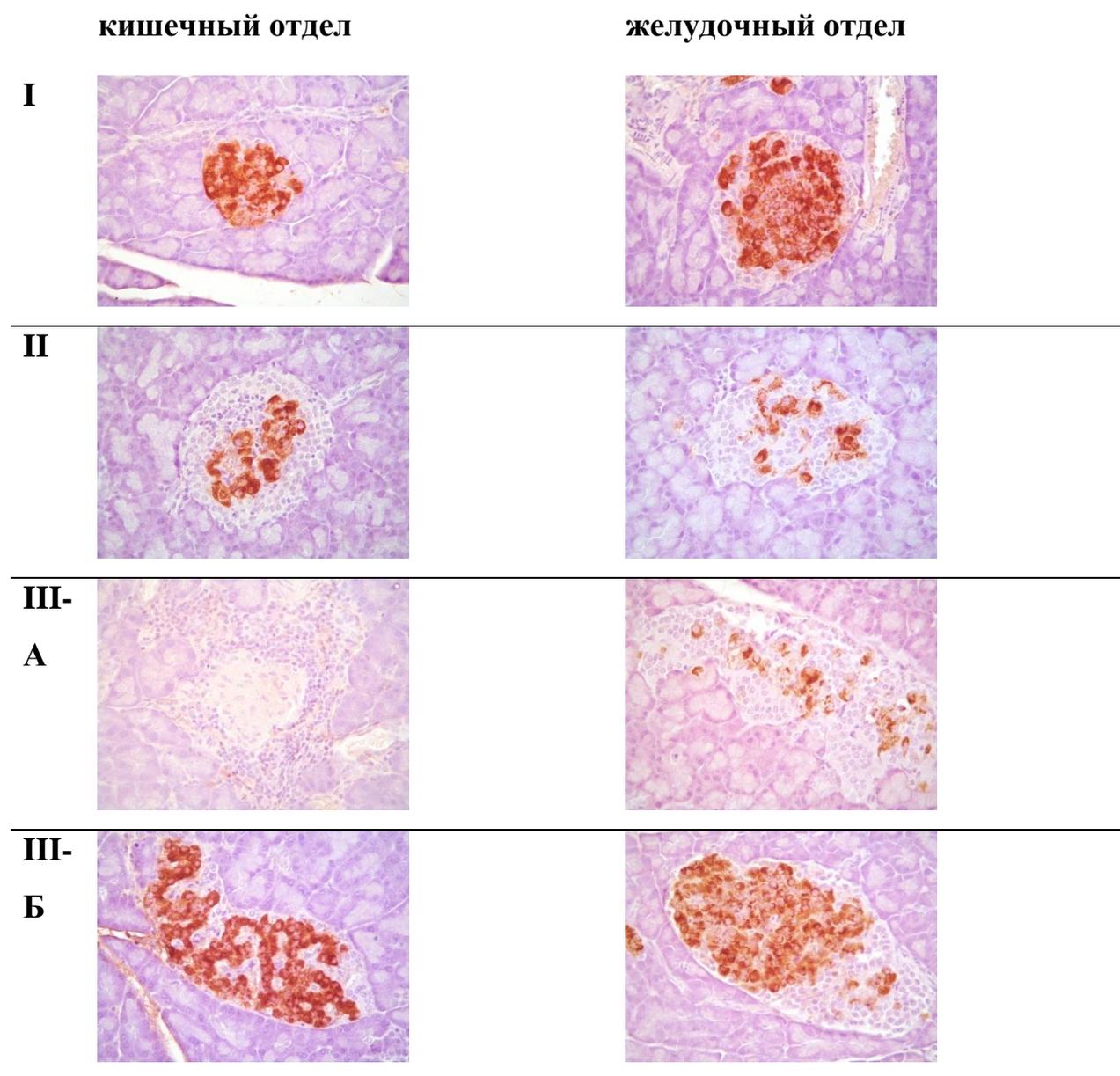


Рис. 31 – Распределение В-клеток по панкреатическим островкам. I – интактный контроль, II - стрептозотоцин-индуцированный СД, III А - стрептозотоцин-индуцированный СД + коррекция (единичные инсулин-позитивные клетки). III Б – стрептозотоцин-индуцированный СД + субстанция. А – кишечный отдел, Б – желудочный отдел.

Первичные антитела к инсулину, визуализация ДАБ с докраской гематоксилином. Начальное увеличение $\times 400$.

Таким образом, 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 В-эндокриноцитов. Показано, что диабетол незначительно препятствовал развитию воспалительных и деструктивных изменений островкового аппарата поджелудочной железы.

6.6. Влияние субстанции и гранулята таблеток диабетолола на показатели углеводного обмена при экспериментальном сахарном диабете

6.6.1. Влияние диабетолола на содержание гликогена в печени крыс

Гликоген представляет собой разветвленный гомополимер глюкозы, в котором остатки глюкозы соединены $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидной связью. Разветвленная структура гликогена облегчает быстрое освобождение углеводных остатков. Наиболее важным ферментом деградации гликогена является гликоген-фосфорилаза, отщепляющая от невосстанавливающего конца цепи остатки глюкозы в виде глюкозо-1-фосфата. Чем больше таких концов, тем больше молекул фосфорилазы могут действовать одновременно. Образование глюкозо-1-фосфата вместо глюкозы имеет то преимущество, что для включения освобожденных остатков глюкозы в гликолиз или ГМП не требуется АТФ. Благодаря структуре гликоген-фосфорилазы, процесс последовательного отщепления останавливается за 4 остатка глюкозы от точки разветвления. Точки ветвления удаляются двумя другими ферментами. Вначале трисахарид боковой цепи переносится к не восстанавливающему концу главной цепи. Затем 1,6-гликозидаза отщепляет остающийся единичный остаток глюкозы в точке ветвления в виде свободной глюкозы, после чего неразветвленная цепь, может вновь расщепляться фосфорилазой. Баланс гликогена в организме показан на рисунке 32.

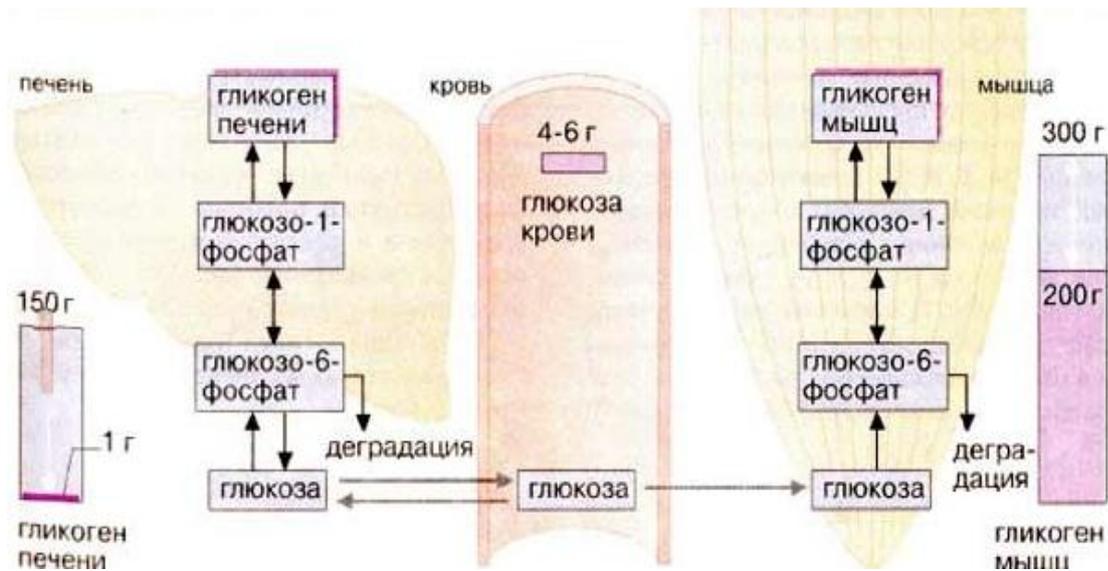


Рис.32 Баланс гликогена в организме.

При снижении чувствительности инсулина в печени, что происходит при стрептозотоциновом диабете, активность ферментов гликогенолиза возрастает, что приводит к снижению уровня гликогена.

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. Это возможно связано с торможением процесса гликогенолиза в печени за счет снижения активности ферментов данного процесса.

Таблица 45 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на концентрацию гликогена в печени крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом, (28 день введения) ($M \pm m$)

группы животных	концентрация гликогена, мг/г ткани
интактные	5,3±1,87
диабет	0,4±0,27*
диабет+диабенол (субстанция)	1,2±0,45**
диабет+диабенол (гранулят таблеток)	0,9±0,2**

* - достоверно по отношению к контролю, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

** - достоверно по отношению к группе с экспериментальным сахарным диабетом, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

6.6.2. Влияние диабенола на скорость гликогенолиза

Гликогенолиз представляет собой процесс расщепления гликогена, приводящий к вовлечению глюкозных остатков этого запасного полисахарида в гликолиз. Глюкозные единицы боковых цепей гликогена вовлекаются в гликолиз в результате последовательного действия двух ферментов гликогенфосфорилазы и фосфоглюкомутазы. Гликогенфосфорилаза катализирует фосфоролитическое расщепление концевой α -(1,4)-гликозидной связи в молекуле гликогена.

Остатки глюкозы отщепляются от концов молекулы гликогена до тех пор, пока на ветвях, идущих от точки ветвления, не останется примерно по четыре остатка глюкозы. Другой фермент (α -[1,4], α -[1,6]-глюкантрансфераза) переносит трехуглеродный фрагмент с одной цепи на другую, открывая (1,6)-связь. Гидролиз этой связи происходит при действии еще одного фермента – α -(1,6)-глюкозидазы, что приводит к отщеплению одной молекулы свободной глюкозы и открывает для действия гликогенфосфорилазы новый участок, состоящий из остатков глюкозы, соединенных α -(1,4)-связями (рис. 33).

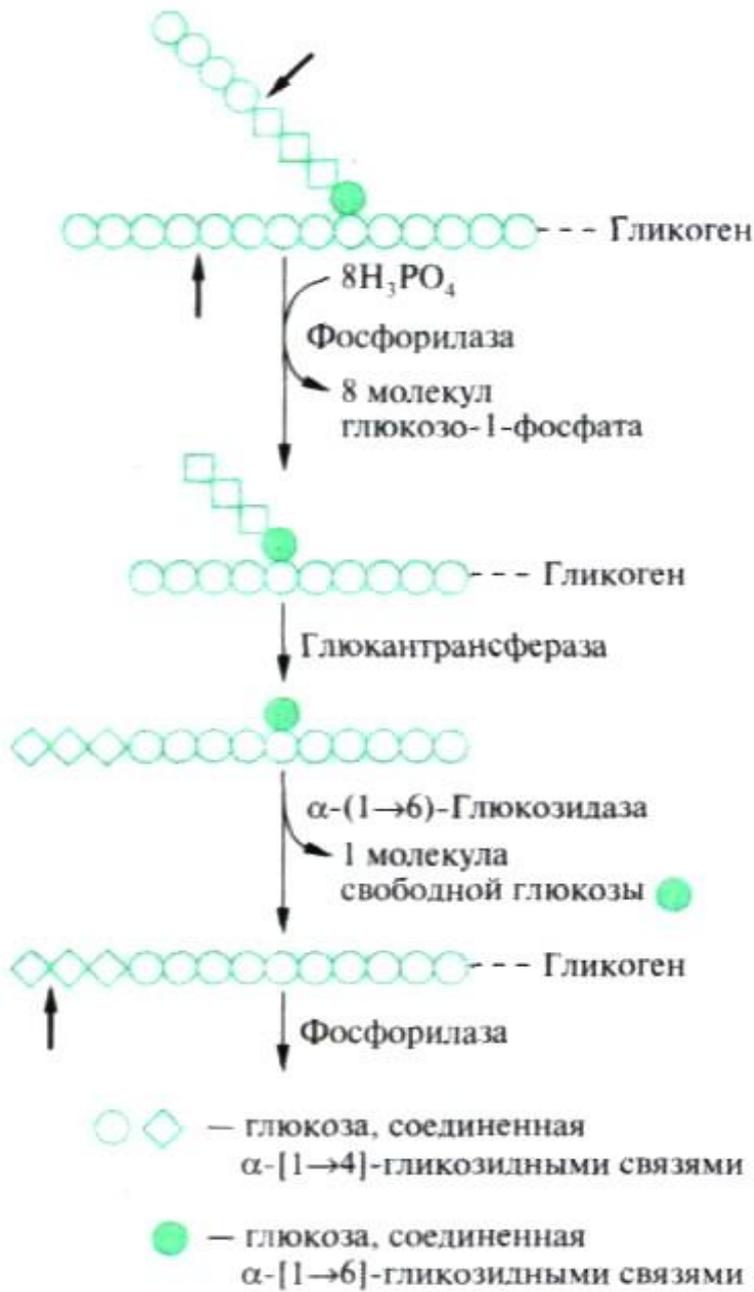


Рис 33. Распад и синтез гликогена

Таблица 46 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на скорость гликогенолиза в печени крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом, (28 день введения) ($M \pm m$)

Исследуемые группы	Гликогенолиз
	$M \pm m$ мкмоль/л в мин. на мг белка
интактные	74,65±8,24
диабет	310,98±28,54*
диабет+диабенол (субстанция)	112,35±15,93**
диабет+диабенол (гранулят таблеток)	93,93±9,35**

* - достоверно по отношению к контролю, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

** - достоверно по отношению к группе с экспериментальным сахарным диабетом, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

После курсового введения диабенола в дозе 50 мг/кг (субстанция и гранулят таблеток) 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.

6.6.3. Влияние диабенола на скорость гликолиза

При проникновении глюкозы в β -клетку с помощью транспортного белка GLUT-2 следует процесс гликолиза (Аметов А.С., 2014; Демидова Т. Ю., 1998).

В аэробных условиях пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК) (Matschinsky F. M., 2009; Matschinsky F. M., 2010), подвергнет пируват окислительному декарбоксилированию с образованием ацетил-КоА и АТФ. Ацетил-КоА окисляется в цикле трикарбоновых кислот до углекислого газа и воды. Высокие концентрации АТФ и накопление ацетил-КоА ингибируют ключевой фермент реакции пируватдегидрогеназу. Следовательно, инсулин ограничивает активность

цикла трикарбоновых кислот. Превращение глюкозы в лактат регулирует необратимая фосфофруктокиназная реакция, в результате которой из фруктозо-6-фосфата образуется фруктозо-1,6-дифосфат и далее триозы, а именно лактат и пируват. Под действием фосфофруктокиназы II образуется также фруктозо-2,6-дифосфат, с повышением уровня которого активируется образование жиров из глюкозы. При снижении концентрации фруктозо-2,6-дифосфата активируется глюконеогенез из триоз (Дедов И.И., Шестакова М.В., 2011).

В анаэробных условиях гликолиз протекает по пути Эмбдена-Мейергофа, который представляет собой сумму последовательно происходящих биохимических реакций, в ходе которых глюкоза превращается в пируват, а затем в лактат (рис. 34).

Таким образом, конечным продуктом анаэробного гликолиза является молочная кислота, которая свободно диффундирует из клеток в кровотоки.

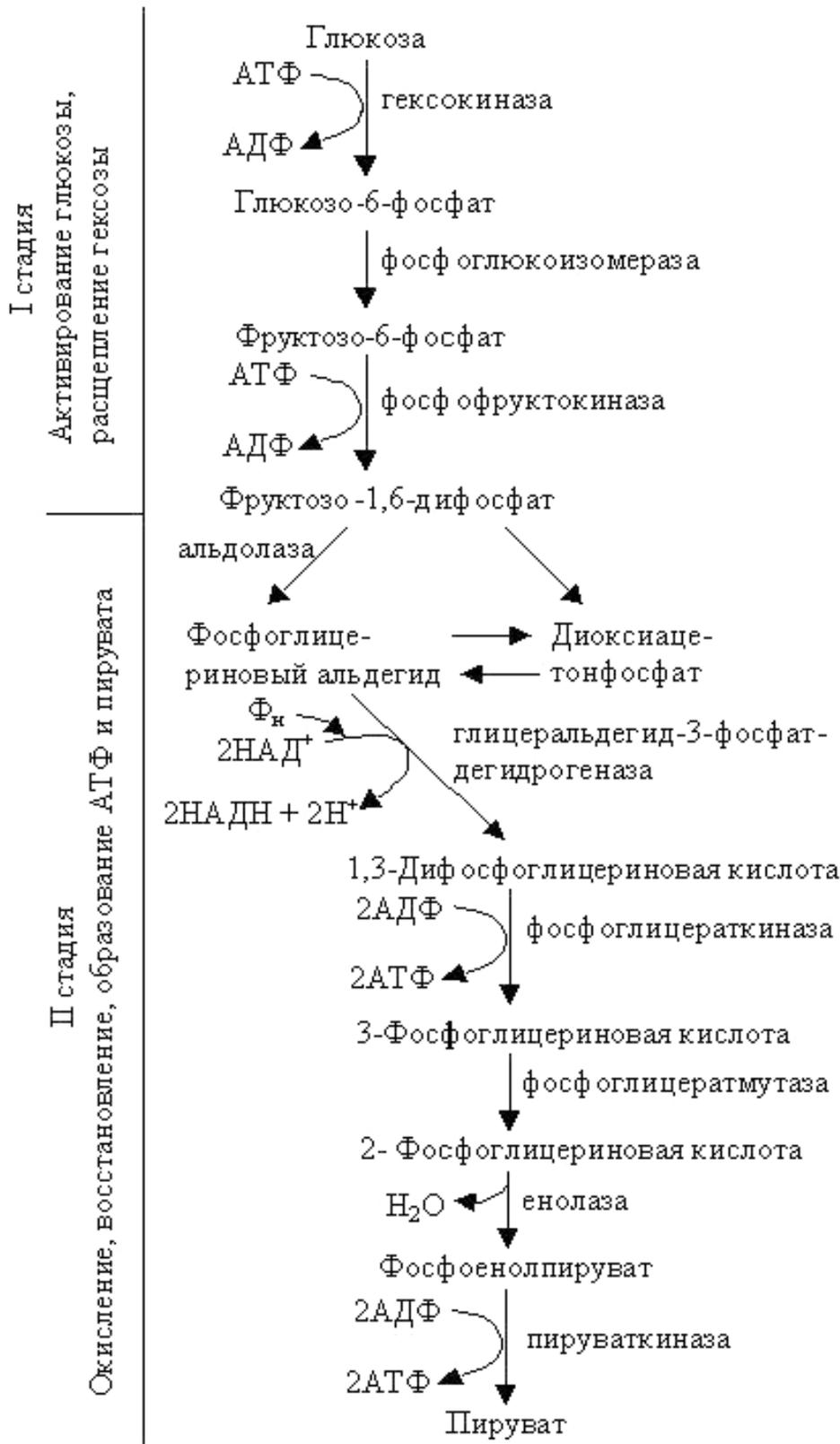


Рис.34 Схема анаэробного гликолиза

Таблица 47 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на скорость гликолиза в печени крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом, (28 день введения) ($M \pm m$)

Исследуемые группы	Гликолиз
	$M \pm m$ мкмоль/л в мин. на мг белка
интактные	16,34±0,78
диабет	8,78±3,83*
диабет+диабенол (субстанция)	11,09±1,4**
диабет+диабенол (гранулят таблеток)	10,24±0,75**

* - достоверно по отношению к контролю, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

** - достоверно по отношению к группе с экспериментальным сахарным диабетом, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

Скорость гликолиза в группе со стрептозотоциновым диабетом снижалась на 53,7% ($p \leq 0,05$) по сравнению с интактной группой. Такие результаты свидетельствуют о том, что в организме животных, больных сахарным диабетом преобладает процесс окисления свободных жирных кислот, что приводит к снижению скорости гликолиза.

После терапии диабенолом (50 мг/кг, субстанция и гранулят таблеток) скорость гликолиза в печени (табл. 47) повышалась в 1,3 и в 1,2 раза соответственно.

6.6.4. Действие диабенола на всасывание углеводов в кишечнике

Изучение действия диабенола на всасывание углеводов в кишечнике проводили путем внутрижелудочного введения акарбозы и сахарозы после пероральной нагрузки крахмалом. 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.

Таблица 48 – Влияние акарбозы и диабенола при внутрижелудочном введении на уровень глюкозы в крови интактных крыс после пероральной нагрузки крахмалом (3 г/кг) ($M \pm m$)

Исследуемые группы	Ед. изм.	Интервалы времени (мин)					
		0	15	30	60	90	120
		Содержание глюкозы в крови					
Контроль (крахмал)	ММ	4,07± 0,24	4,70± 0,22	4,57± 0,20	4,17± 0,07	3,84± 0,16	3,68± 0,15
	%		+15,5	+12,3	+2,5	-5,7	-9,8
Крахмал + акарбоза (5 мг/кг)	ММ	3,77± 0,12	4,07± 0,19*	3,60± 0,10*	3,30± 0,25*	3,13± 0,42	3,0± 0,40
	%		+10	-2,9	-10,8	-15,4	-18,9
Крахмал + диабенол (25 мг/кг)	ММ	3,77± 0,09	4,03± 0,09	3,90± 0,20	4,23± 0,07	4,10± 0,20	4,37± 0,17
	%		+6,1	+2,6	+11,3	+7,9	+15,0

* - достоверно по отношению к контролю, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

** - достоверно по отношению к группе с экспериментальным сахарным диабетом, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

Таблица 49 – Влияние акарбозы и диабенола при внутрижелудочном введении на уровень глюкозы в крови интактных крыс после пероральной нагрузки сахарозой (3 г/кг) ($M \pm m$)

Исследуемые группы	Ед. изм.	Интервалы времени (мин)					
		0	15	30	60	90	120
		Содержание глюкозы в крови					
Контроль (сахароза)	мМ	3,56± 0,08	4,64± 0,20	4,33± 0,09	4,37± 0,17	3,68± 0,06	3,57± 0,09
	Δ%		+30,3	+21,6	+22,8	+3,4	+0,3
Сахароза+ акарбоза (5 мг/кг)	мМ	3,30± 0,06	3,43± 0,35*	3,17± 0,41*	2,93± 0,47*	2,67± 0,48	2,63± 0,37
	Δ%		+3,9	-3,9	-11,2	-19,1	-20,3
Сахароза+ диабенол (25 мг/кг)	мМ	3,25± 0,05	5,0± 0,20	4,65± 0,55*	3,68± 0,03	3,78± 0,03	3,30± 0,10
	Δ%		+53,8	+43,1,6	+13,2	+16,3	+1,5

* - достоверно по отношению к контролю, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

** - достоверно по отношению к группе с экспериментальным сахарным диабетом, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

Таким образом, по результатам исследований установлено панкреотропное и экстрапанкреатическое действие диабенола. Влияние изучаемых веществ на поджелудочную железу возможно связано с усилением секреции инсулина. Экстрапанкреатическое воздействие исследуемых веществ, по-видимому, направлено на улучшение работы транспортных систем глюкозы и замедление процессов деградации инсулина.

6.6.5. Влияние диабенола на активность гликогенфосфорилазы

Предполагая, что механизм действия диабенола может быть связан с регуляцией ключевого фермента углеводного обмена (гликогенфосфорилазы), изучили ингибирующую активность данного фермента.

Таблица 50 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/) на ГФ ингибирующую активность

Соединение	ГФ ингибирующая активность 10-4 М, Δ% ($M \pm m$)
диабенол	9,83±8,73
кверцетин	72,30±4,95*

Примечания: ГФ – гликогенфосфорилаза,

* - данные достоверны по отношению к положительному контролю (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$).

По данным из таблицы 50 видно, что ГФ ингибирующая активность у диабенола отсутствует. Однако можно предположить, что диабенол влияет на другие ферменты гликолиза и гликогенолиза.

6.6.6. Влияние диабенола на ингибирование α -глюкозидазы

В настоящее время, в клинической практике, в качестве сахароснижающих средств применяют ингибиторы α -глюкозидазы (акарбоза) (Аметов А.С., 2014). Данные препараты замедлению всасывания сложных углеводов в тонком отделе кишечника и затрудняют проникновение углеводов в кровь (Аметов А.С., 2014).

В литературе встречается ряд работ, посвященных исследованию производных бензимидазола на ингибирование α -глюкозидазы (Kumar J.A., 2010; Mobinikhaledi A., 2015). В данной работе была проведена оценка влияния на активность ингибирования диабенолом α глюкозидазы.

Таблица 51 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг) на ингибирование α -глюкозидазы

Соединение	α глюкозидазная активность 10-3 М, $\Delta\%$ (M \pm m)
диабенол	5,71 \pm 1,90
акарбоза	48,91 \pm 3,44*

* -данные достоверны по отношению к положительному контролю (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$).

Данные, приведенные в таблице, свидетельствуют о полном отсутствии α глюкозидазной активности диабенола.

6.6.7. Влияние диабенола на активирование глюкокиназы

Известно, что глюкокиназа фермент, который играет ключевую роль в гомеостазе глюкозы, регулирует метаболизм глюкозы в β -клетках поджелудочной железы и гепатоцитах. Глюкокиназа распространена в клетках весьма ограниченно, она сосредоточена главным образом β -клетках поджелудочной железы и паренхимальных клетках печени. К тому же глюкокиназа является ферментом, который лимитирует скорость метаболизма глюкозы в клетках этих двух типов, что, как известно, играет ключевую роль в гомеостазе глюкозы во всем организме (Chipkin SR, 1994). Исследователями отмечена четкая обратная зависимость

между активностью данного фермента и уровнем глюкозы в крови (Ohishi T., 2012).

Данные по изучению активирования глюкокиназы диабенолом представлены в табл. 52.

Таблица 52 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг) на активность глюкокиназы

Соединение	Активирование глюкокиназы, %
диабенол	0,18±4,64
МВХ-2982	-64,14±3,68*

* - данные достоверны по отношению к положительному контролю (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$).

Исходя из анализа полученных данных, можно предположить отсутствие влияния диабенола на активирование фермента глюкокиназы.

6.6.8. Влияние диабенола на антигликирующую активность.

Известно, что одним из путей профилактики поздних осложнений является блокирование гликирования белков. 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 (Vasan S., 2003; Goh, S.-Y., 2008), атеросклероза, остеоартрита, катаракты (Bras, I.D., 2004; Bolton, W.K., 2004; Bras, I.D., 2007), нейродегенеративных заболеваний (Li, J., 2012), что делает актуальным поиск ингибиторов гликирования белков. Однако клинические испытания данного препарата были остановлены в связи с его недостаточной эффективностью и наличием побочных эффектов (гастроинтестинальные симптомы, волчаночно-подобный, гриппоподобный синдромы, васкулит (Freedman, B.I., 2009; Wilkinson-Berka, J.L., 2002; Freeman J. A., 1991).

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 (табл 53).

Таблица 53 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг) на антигликирующую активность

Шифр соединения	Антигликирующая активность (ингибирование флуоресценции гликированного БСА), $\Delta\%$ ($M \pm m$)	
	Концентрация, 10^{-3} М	Концентрация, 10^{-4} М
диабенол	$9,63 \pm 3,88^{**}$	$-0,85 \pm 8,01$
аминогуанидин	$57,83 \pm 0,58^*$	$6,01 \pm 2,12^*$

* - данные достоверны по отношению к положительному контролю (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$).

** - данные достоверны по отношению к показателям аминогуанидина (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$).

6.7. Заключение.

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 повышался в 3 раза (субстанция) и в 1,25 раз (гранулят) соответственно 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 снижения синтеза жирных кислот. Экстрапанкреатическое воздействие диабенола, выявленное при изучении всасывания углеводов в кишечнике связано с потенцированием эффектов инсулина и, по-видимому, направлено на улучшение работы транспортных систем глюкозы и замедление процессов деградации инсулина.

При курсовом введении диабенола отмечалось незначимое увеличение удельного количества β -эндокриноцитов в желудочном и кишечном отделах. Кроме этого, диабенол препятствовал развитию воспалительных и деструктивных изменений островкового аппарата поджелудочной железы. Известно, что инкретиномиметический эффект напрямую связан с увеличением β клеток поджелудочной железы. В ходе курсового введения установлено, что для диабенола периферический механизм гипогликемического действия не связан с влиянием на инкретины (Cernea S., 2011; Portha V., 2011).

Можно сделать заключение о том, что прогноз *in silico* позволяет планировать экспериментальную часть, так как данные совпадают, в частности, влияние на секрецию инсулина и ингибирование ДПП-4 (Шестакова Е. А., 2012; Шварц В., 2008).

Когда было обнаружено, что диабенол *in vitro* ингибирует ДПП-4, выявленный эффект объяснил почему в наших исследованиях резко усиливается секреции

инсулина при введении диабенола, так как одним из возможных механизмов может быть \uparrow инкретинов, путем ингибирования ДПП-4. Мы не изучали влияние предположительных метаболитов диабенола на ДПП *in vitro*, при длительном введении вещества. Мы предполагаем, что при распаде диабенола образуются метаболиты, которые исследовала профессор Смирнова (2005) и которые могут влиять на ДПП-4.

В нашей работе мы рассматривали сначала системный эффект диабенола, а затем его влияние непосредственно на ферменты углеводного обмена. С системной точки зрения, происходили следующие процессы под влиянием диабенола: стабилизация гликолиза и содержание гликогена и \downarrow гликогенолиза в печени. Прямого действия диабенола на первый фермент цепочки распада гликогена нет, исходя из ранее полученного инсулиногенного эффекта, и в подтверждении наших данных можно полагать, что за счет восстановления секреции инсулина происходит нормализация углеводного обмена в печени, что полностью подтверждается литературными данными, так как этот процесс инсулинозависимый.

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.

ГЛАВА 7. ИЗУЧЕНИЕ 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; Гиляровский С. Р., 2010; Дедов И. И., 2015). Следствием диабетической микроангиопатии является нейропатия (Котов С.В., 2000; Александровский Я. А., 2005). Ранее было доказано влияние, как прямое, так и косвенное, различных гемореологических факторов в развитии атеросклеротических осложнений и микрососудистых нарушений (Singh, 2010). Так, при данной патологии повышается агрегация эритроцитов и вязкость крови, что ведет к увеличению адгезии эритроцитов к эндотелиальным клеткам (Муравьев, 2009). Кроме этого, повышается осмотическая резистентности эритроцитов к гемолизу.

Известно, что при данной патологии значительно возрастает вязкость крови и увеличение фракций гемоглобина с заблокированной кислородтранспортной функцией (гликированного) гемоглобина, что в дальнейшем может способствовать ишемии тканей.

Исходя из вышесказанного, была проведена комплексная оценка воздействия диабенола гемостаз крови.

Были изучены следующие гемореологические показатели крови: агрегация тромбоцитов, вязкость крови и механические свойства эритроцитов.

7.1. Материалы и методы исследования.

При проведении экспериментов были использованы следующие стандартные реактивы: АДФ (динатриевая соль-5-дифосфорной кислоты) («Реанал», Венгрия); цитрат натрия (ч.д.а., «Реахим», Россия).

В течение 28 дней, крысам со стрептозотоциновым диабетом (моделирование которого, описано ранее), ежедневно перорально вводили субстанцию диабенола

в дозе 50 мг/кг. После месячного курса введения крыс вводили в наркотизированное состояние, внутрибрюшинным введением хлоралгидрата (400 мг/кг), и из брюшной аорты забирали кровь. Кровь помещали в пластиковые центрифужные пробирки с раствором цитрата натрия (3,8 %) в соотношении 1:9. Далее проводилось измерение гемореологических параметров.

Для изучения влияния диабенола на агрегацию 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]. Записанная информация представляла собой графические кривые, изображающие падение оптической плотности плазмы, обогащенной тромбоцитами. Оценочной величиной интенсивности агрегации служила максимальная амплитуда агрегатограммы.

Для измерения влияния диабенола на вязкость крови был использован анализатор крови реологический АКР-2 (МПИ «Комед» и НИИ физико-химической медицины, Россия). Определение вязкости проводили путем переноса кюветы в стартер и считывания показаний с цифрового табло [Добровольский Н.А., 1998]. Величина вязкости крови выражалась в сантипуазах (сПз). Расчет индекса агрегации эритроцитов проводили путем вычисления отношения вязкости крови при скорости сдвига 10 c^{-1} к вязкости крови при 300 c^{-1} [Dintenfas Lb., 1989].

Определение влияния диабенола на осмотическую резистентность эритроцитов проводилась по методу Katoh [M. Katoh, T. Karasawa, 2001].

Гемолиз (в %) рассчитывали как отношение экстинции опытной пробы к экстинции пробы с водой.

Анализ всех исследуемых параметров при нормальном распределении значений проводили с помощью критерия Стьюдента. Значимыми считали различия, если вероятность ошибки $p \leq 0,05$.

7.2. Воздействие диабенола на агрегацию тромбоцитов.

При исследовании образцов крови, взятых у крыс, наблюдалось увеличение амплитуды агрегации тромбоцитов в 1,5 раза (индукторы АДФ и адреналин) по сравнению с интактными животными. Это объясняется тем, что АДФ активирует фосфолипазы гранулярной и плазматической мембран, что ведет к высвобождению арахидоновой кислоты, которая превращается в лабильный циклический эндопероксид, а затем в TXA_2 [Адиб Ал-Амуш, 2006] стимулирующий реакцию высвобождения и агрегацию тромбоцитов. Известно, что тромбоцитарной реактивности при СД связывают именно с нарушением баланса простагландинов, т.е. с повышением уровня проагреганта и вазоконстриктора TXA_2 и снижением концентрации антиагреганта и вазодилататора простациклина. Одним из механизмов антитромбоцитарного действия данных веществ при СД, возможно, является их способность достоверно подавлять агрегацию тромбоцитов, вызванную АДФ *in vivo* и таким образом снижать уровень TXA_2 . Кроме того, при сахарном диабете АДФ принадлежит одна из главных ролей в инициации процессов агрегации тромбоцитов, которая приводит к повышению поступления внеклеточного Ca^{2+} путем открытия АДФ-зависимых неселективных кальциевых каналов. В таблице 01 показано, что диабенол с индуктором АДФ достоверно снижал агрегацию тромбоцитов на 44,1%.

В ходе исследования выяснилось, что диабенол с индуктором адреналином достоверно снижал агрегацию тромбоцитов на 20,4 %, что объясняется влиянием адреналина на вторую фазу агрегации тромбоцитов (табл. 54).

Эффект адреналина на тромбоциты выражен слабее по сравнению с АДФ, это объясняется тем, что адреналин вызывает агрегацию тромбоцитов без изменения дисковидной формы, взаимодействуя с α - адренорецепторами плазматической мембраны, которые при активации ингибируют аденилатциклазу, но при этом механизм действия адреналина не зависит от образования TXA_2 , реакции высвобождения, а связан с модуляцией мембран и изменением их проницаемости к ионам Ca^{2+} [Адиб Ал-Амуш, 2006].

Таблица 54 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на агрегацию тромбоцитов крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом, (28 день введения) ($M \pm m$)

Индуктор	Уровень амплитуды агрегации тромбоцитов, отн.ед		
	контроль	диабет	диабенол
АДФ	22,1±3,9	34.9±3,7*	19.5±0,28**
адреналин	19.5±1,5	34.9±2,3*	27.8±3,8**

* - достоверно по отношению к контролю, критерий Стьюдента ($p \geq 0,05$)

** - достоверно по отношению к группе с экспериментальным сахарным диабетом, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

7.3. Действие диабенола на вязкость крови.

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 (табл.55).

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 агрегатообразование. 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)

Таблица 55 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на вязкость крови и индексы агрегации эритроцитов крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом, (28 день введения) ($M \pm m$)

Группы животных	Скорость сдвига, сПз						
	300с^{-1}	200с^{-1}	100с^{-1}	50с^{-1}	30с^{-1}	10с^{-1}	ИАЭ
Интактные	$3,7 \pm 0,14$	$3,9 \pm 0,15$	$4,5 \pm 0,18$	$5,2 \pm 0,15$	$6,0 \pm 0,23$	$7,6 \pm 0,45$	$2,0 \pm 0,01$
Диабет	$4,8 \pm 0,14^*$	$5,0 \pm 0,14^*$	$6,3 \pm 0,2^*$	$7,6 \pm 0,26^*$	$9,0 \pm 0,33^*$	$13,1 \pm 0,6^*$	$2,7 \pm 0,05^*$
Диабенол (субстанция)	$3,7 \pm 0,06$	$3,9 \pm 0,06$	$4,6 \pm 0,08$	$5,6 \pm 0,14$	$6,3 \pm 0,2$	$8,1 \pm 0,32$	$2,2 \pm 0,06^{**}$
Диабенол (гранулят таблеток)	$4,6 \pm 0,18$	$5,0 \pm 0,21$	$5,9 \pm 0,13$	$6,3 \pm 0,15$	$7,9 \pm 0,25$	$9,9 \pm 0,23$	$2,0 \pm 0,01^{**}$

* - достоверно по отношению к контролю, критерий Стьюдента ($p \geq 0,05$)

** - достоверно по отношению к группе с экспериментальным сахарным диабетом, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

показатель агрегации эритроцитов был ниже и практически не отличался от показателя контрольной группы.

7.4. Действие диабенола на осмотическую резистентность эритроцитов.

При курсовом введении диабенола в течение 28 дней наблюдалось снижение механических свойств эритроцитов, о чем свидетельствует показатель осмотической резистентности (табл. 56). Так в группе крыс со стрептозотоциновым диабетом процент гемолиза составил 53%, что в 1,8 раз выше интактной группы. Под действием диабенола (пероральное введение в дозе 50 мг/кг) % гемолиза снижался в 1,5 раза по сравнению с группой с экспериментальным диабетом, что свидетельствует о повышении процента устойчивости эритроцитов к гемолизу.

Таблица 56 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на механические свойства эритроцитов крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом, (28 день введения) ($M \pm m$)

Группы животных	Осмотическая резистентность эритроцитов, % гемолиза
интактные	29,48±1,86
диабет	53,17±3,61*
диабенол (субстанция)	35,05±1,77**

* - достоверно по отношению к контролю, критерий Стьюдента ($p \geq 0,05$)

** - достоверно по отношению к группе с экспериментальным сахарным диабетом, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

7.5. Заключение.

В результате исследований, проведенных на животных со стрептозотоциновым диабетом, было показано, что диабенол ингибирует функциональную активность тромбоцитов. Ему присуще выраженная антиагрегантная активность 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 важное значение для разработки препаратов, предназначенных для лечения и снижения частоты развития осложнений при сахарном диабете второго типа.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По определению экспертов Всемирной организации здравоохранения: «Сахарный диабет является проблемой всех возрастов и всех стран». Сахарный диабет 2 типа (СД 2) (Гурьева И. В., 2007; Демидова И. Ю., 2000). представляет собой серьезную медико-социальную проблему, значимость которой обусловлена его высокой распространенностью, сохраняющейся тенденцией к росту числа больных, хроническим течением, высокой инвалидизацией и смертностью больных в результате развития поздних сосудистых осложнений (микро-, макроангиопатии), а также необходимостью создания системы специализированной помощи больным (International Diabetes Federation; 2001). Не менее тревожным является и тот факт, что СД 2 занимает третье место среди непосредственных причин смерти после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. По статистическим данным, каждые 6–7 пациентов из 10 погибают от макроангиопатических осложнений диабета. Причем, наряду с распространенностью СД нарастают и социально-экономические потери, связанные с развитием тяжелых инвалидизирующих осложнений. Фактическая распространенность осложнений СД превышает регистрируемую, и у 40—55% больных они не выявляются. Проспективные исследования показали, что увеличение доли больных СД 1 с уровнем гликогемоглобина $HbA1c < 7,0\%$ у детей с 9,7% до 15,42% ($p \leq 0,005$), у подростков с 7,4% до 12,41% ($p \leq 0,002$), у взрослых с 11,4% до 16,46% ($p \leq 0,01$), у взрослых с СД 2 с 8,74% до 8,04% ($p \leq 0,05$) привело к достоверному снижению распространенности основных осложнений СД (Дедов И.И., 2011). Несмотря на значительные достижения современной антидиабетической фармакотерапии отмечаются различные формы устойчивости к назначаемым препаратам, со сложным генезом развития побочных эффектов (Недогода С.В., 2011; Mazzi R., 2007; Недосугова Л. В., 2006; Стаценко М.Е., 2002). Стадийность и особенности генеза сахарного диабета сказываются на развитии резистентности к лекарственным

препаратам, либо оказывают большое количество отрицательных эффектов (Тюренков И.Н., 2015; Недосугова Л. В., 2013; DPUcker D.J., 2006).

В существующем многообразии лекарственных препаратов (Свеклина Т. С., 2013), применяемых в клинике мало препаратов, влияющих на патогенетические звенья сахарного диабета, кроме того длительная терапия (Рогова Н. В., 2007) любым из существующих препаратов приводит к развитию толерантности, поэтому целесообразность создания новых высокоэффективных и низкотоксичных препаратов остается актуальной. Существующий на сегодняшний день арсенал пероральных сахароснижающих препаратов (см. табл.), предполагает воздействие на основные патогенетические дефекты, развивающиеся при сахарном диабете: препараты, влияющие на чувствительность к инсулину – такие как метформин (Сиофор) (Недосугова Л. В., 2007; Александров А. А., 2008) и тиазолидиндионы (Актос, Авандия); и препараты, стимулирующие секрецию инсулина – секретогены – производные сульфонилмочевины и глиниды. Исходя из патогенеза СД 2, напрашивается вполне логичный вывод о том, что основным стратегическим направлением в лечении СД 2 должно быть воздействие на инсулинорезистентность как главное патогенетическое звено в развитии заболевания. Снижая инсулинорезистентность, или, иными словами, повышая чувствительность к инсулину, уменьшается нагрузка на инсулярный аппарат и сохраняется тем самым его секреторные возможности и снимается негативное влияние гиперинсулинемии на повышение аппетита, прибавку веса, состояние сердечно-сосудистой системы (Аметов А.С., 2014).

Классификация пероральных гипогликемических средств	Секретогены	Постпрандиальные регуляторы гликемии		
Препараты и их синонимы	<p><u>Производные сульфонилмочевины (1* и 2 генерация)</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Карбутамид* (Букарбан) 2. Толбутамид* (Бутамид) 3. Глибенкламид (Манинил) 4. Гликвидон (Глюренорм) 5. Гликлазид (Диабетон) 6. Глипизид (Минидиаб) 7. Глимепирид (Амарил) 	<p><u>Бигуаниды</u></p> <p>8. Метформин (Сиофор, Глюкофаг)</p>	<p><u>Тиазолидиндионы</u></p> <p>9. Розиглитазон (Авандия)</p> <p>10. Пиоглитазон (Пионорм)</p>	<p><u>Ингибиторы α-глюкозидазы, меглитиниды*, комбинированные**</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 11. Акарбоза (Глюкобай) 12. Репаглинид* (Новонорм) 13. Натеглинид* (Старликс) 14. ГлибOMET** (метформин + глибенкламид)
Механизм действия	<p>Стимулируют секрецию эндогенного инсулина β-клетками поджелудочной железы путем блокады АТФ-зависимых K^+-каналов, открытия потенциалзависимых Ca^{2+}-каналов и повышения Ca^{2+} внутри клетки (производные сульфонилмочевины).</p>	<p>Угнетают глюконеогенез в печени, стимулируют гликолиз в периферических тканях, замедляют всасывание глюкозы в ЖКТ, увеличивают связывание инсулина с инсулиновыми рецепторами (метформин, глибOMET). Повышают чувствительность к инсулину мышечной и жировой ткани (Розиглитазон, пиоглитазон). Блокирует α-глюкозидазу, нарушает расщепление полисахаридов до моносахаридов и их всасывание в тонкой кишке (акарбоза). Связываются со специфичным участком АТФ-зависимого K^+-канала (репаглинид, натеглинид).</p>		

В настоящее время существует два подхода к поиску новых веществ с гипогликемической активностью: оптимизация структуры известных лекарственных препаратов для снижения токсичности и увеличение эффективности и мишень-ориентированный поиск среди новых химических структур (Спасов А.А., 2013; Зефирова О. Н., 2000).

Известно, что процесс поиска лекарственных веществ состоит из следующих этапов:

- 1) выявление перспективной базовой структуры (скаффолд);
- 2) виртуальный скрининг и планирование экспериментального скрининга;
- 3) экспериментальный скрининг и выбор соединений-лидеров;
- 4) уточнение методами *in silico* фармакодинамических и фармакокинетических характеристик соединений-лидеров, с целью выбора соединения для последующего углубленного исследования;
- 5) углубленное изучение соединения-лидера;
- 6) выявление *in silico* и *in vivo* возможного механизма действия наиболее активного соединения.

В настоящее время продолжается поиск новых групп гипогликемических веществ. Один из направлений поиска – циклические гуанидины, к которым относят иминобензимидазолы и циклические бензимидазолы (Fei F., 2013; Valerie A., 2000, Scott D. Larsen., 2001, Fumiyoshi Ishikawa., 1978). Ранее проводились исследования в ВолГМУ (на кафедре фармакологии) совместно с НИИ ФОХ «Южный федеральный университет», которые показали, что среди этих веществ есть соединения с высокой гипогликемической активностью. Вследствие этого, направленный поиск позволит найти активные вещества среди циклических гуанидинов, которые в дальнейшем могут войти в состав нового лекарственного препарата для лечения сахарного диабета типа II.

На первом этапе данной работы был сделан поиск базовой структуры путем изучения перспективности различных классов циклических гуанидинов. В рамках консенсусного подхода, который был разработан и

использован на кафедре фармакологии ВолгГМУ, была использована система PASS, изучено наличие активности в ИТ «Микрокосм», проведена оценка уровня активности, сделан подструктурный анализ и применены методы медианного и супремального оценивания. Итогом данных исследований являлся консенсусный анализ перспективности нескольких классов циклических гуанидинов, как источников веществ с гипогликемической активностью (Vassilev P.M., 2014; Poroikov V.V., 2003).

Каждый их проведенных анализов имеет свои особенности, поэтому они дополняют друг друга (имеют свои положительные стороны и недостатки, как и любой метод). Если имеется положительное заключение несколькими методами, которые совпадают, то можно сделать вывод, что ошибка будет минимальна. В данной работе было использовано 6 различных подходов, таким образом, консенсусный анализ проводился на основе расчетов 6 прогнозных оценок. Они отличаются друг от друга, что дает возможность составить достаточно высоко достоверное представление о том, какая структура является наиболее перспективной из тех, которые рассматриваются. Система PASS прогнозирует только уровень активности на основании данных, которые получены другими исследователями, то есть на основании базы данных, сформированной по экспериментальным исследованиям мирового научного сообщества, без верификации, без отбора, без внутреннего противоречия, по принципу - как есть. Учитывая большую базу данных, PASS хорошо прогнозирует наличие активности достаточно разнородных соединений по выборкам достаточно большого объема. В PASS определена противодиабетическая активность по которой был сделан прогноз наличия/отсутствия активности. Однако существуют ограничения данной системы, а именно: прогноз проводится только по наличию активности; PASS прогнозирует только антидиабетическую активность (Поройков В.В, 1999). Антидиабетические вещества могут влиять на устранение последствий сахарного диабета.

Второй подход, который с использован в данной работе это ИТ «Микрокосм» наличие гипогликемической активности производных циклических гуанидинов. Прогноз основывался на базе данных, составленной самостоятельно; все данные были просмотрены, уточнены и подтверждены, и отобраны сахароснижающие вещества по данным многочисленных экспериментов. В основном это были лекарственные пероральные гипогликемические препараты для лечения сахарного диабета типа 2. Таким образом, отличие от системы PASS, которая использует для прогноза базу данных как есть, то здесь проводился достаточно тщательный отбор первичной выборке. Данный прогноз проводился с учетом верифицированной базы данных, поэтому он дополняет прогноз в PASS наличия антидиабетической активности. По этой же выборке были отобраны вещества, обладающие гипогликемической активностью, которые были разделены на две группы: высокая гипогликемическая активность ($\text{Ind}_R \leq 0.82$) и умеренная гипогликемическая активность ($0,82 \leq \text{Ind}_R < 0,90$).

Таким образом, помимо наличия активности, по этой подготовленной выборке, можно прогнозировать и уровень активности. Если вещество является активным, то такое вещество более перспективное. Затем проводился подструктурный анализ применительно к уровню активности в рамках структурно близких соединений, он уточняет результаты, полученные на предыдущем этапе.

Если класс является перспективным в системе PASS, в системе «Микрокосм» и он является значимым по подструктурному анализу, то значит, что данный класс отвечает глобальным закономерностям, характерным для противодиабетических соединений. Подструктурный анализ — это вероятностный метод, поэтому были проведены медианное и супремальное оценивание для расчета средней тенденции. Структура может быть активной, но при ее модификации активность «замораживается», а может быть лабильной для введения заместителей, которые увеличивают ее активность. В идеале, базовая структура должна быть активна и лабильна к

введению заместителе, что и оценивают с помощью супремального анализа. В итоге, если вещество в системе PASS проявляет антидиабетическую активность, в ИТ «Микрокосм» - гипогликемическую активность, медианная оценка показывает средний уровень активности - достаточно высокий, и базовая структура хорошо реагирует на модификации, то значит это действительно перспективное вещество.

Литературный анализ необходим для оценки последних исследований и планирования экспериментального скрининга. Все использованные методы дают разные оценки, что их обобщить надо их стандартизовать, унифицировать. Для этого использовали коэффициент информативности от -5 (отрицательное очень сильное влияние) до +5 (положительное очень сильное влияние).

В системе PASS были выделены 5 классов соединений, которые перспективны, с оценкой 5 (коэффициент информативности). В ИТ «Микрокосм» по результатам прогноза гипогликемической активности оценку 5 имеют только 3 класса.

В результате была сформирована итоговая выборка для экспериментального скрининга (полностью все данные приведены в приложении, табл. 2.3.1п1). Все изученные при скрининге вещества были синтезированы на базе НИИ физической и органической химии Южного федерального университета.

- 1) соединения классов триазино[2,3-а]бензимидазола, триазоло[1,5-а]бензимидазола и N1,N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола (недостаточно изученные ранее);
- 2) 2-амино-бензимидазолы (с целью подтверждения различий между 2-амино и 2-имино-бензимидазолами);
- 3) вещества, сходные с ранее испытанными соединениями, найденными в результате литературного анализа доступной информации о гипогликемической активности производных циклических гуанидинов, исследованных мировым научным сообществом;

4) ряд неактивных по прогнозу веществ, с целью более точной оценки ошибки первого рода.

При рассмотрении перспективности классов в градации активности: умеренная, высокая и низкая, то есть прогнозировалось наличие активности (высокая или умеренная), выраженной активности и высокой активности.

По результатам прогноза разными методами пришли к выводу, что в результате анализа *in silico* различных методов прогноза плюс корреспондированные с литературными данными, перспективными являются несколько классов, указанных выше. На этом этапе нами была найдена базовая структура.

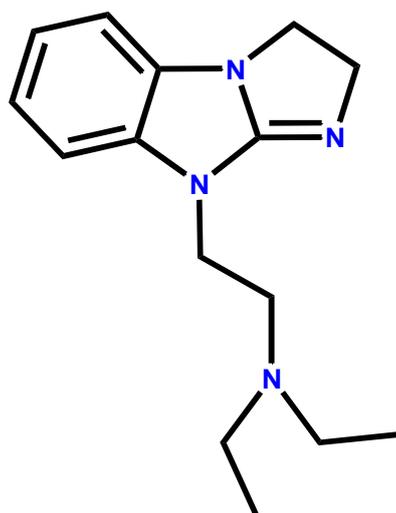
На втором этапе необходимо установить соединения, которые необходимо испытать для получения представления о гипогликемическом потенциале выбранного класса и отобрать среди них лидеров для дальнейшего изучения. Были использованы три группы оценок, пять градаций методов.

Далее был проведен экспериментальный скрининг соединений наиболее перспективных классов. Гипогликемическую активность изучали на крысах при однократном введении в течение 6 часов. Кроме этого, три самые активные соединения были изучены на модели стрептозотоцинового диабета (внутривенное введение (хвостовая вена) стрептозотоцина в дозе 45 мг/кг). Уровень сахара в крови измеряли в течение 12 часов. Скрининг показал, что среди изученных соединений наиболее перспективными классами считаются производные N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-a]бензимидазола и 2-амино-бензимидазола, перспективные представители которых были изучены на модели стрептозотоцинового диабета при однократном пероральном введении.

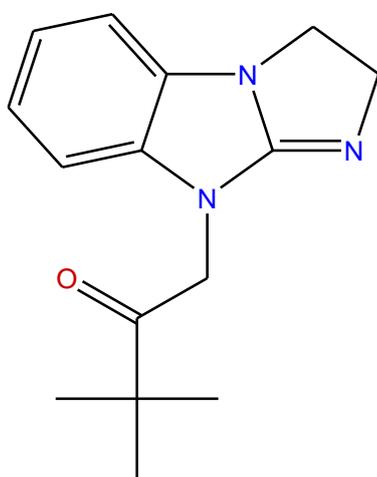
Методом экспериментального скрининга были отобраны три соединения (РУ-254, РУ-663 и РУ-1316), проявившие наиболее выраженную гипогликемическую активность.

В ходе эксперимента на модели стрептозотоцинового диабета было определено, что наиболее сильный гипогликемический эффект и низкая токсичность наблюдались у препарата РУ-254, относящегося к классу производных N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола.

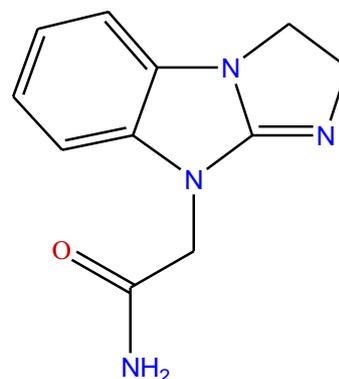
После проведения виртуального скрининга и уточняющего экспериментального скрининга, ранее неиспытанных соединений, появилась новая выборка, которая внутри себя содержит данные прогноза и некоторые добавки для уточнения результатов положительного и отрицательного прогноза. Эти данные подвергались дальнейшему анализу с целью уточнения закономерностей и в итоге выбора соединений-лидеров. Для новой выборки был сделан подструктурный анализ и были определены заместители, влияющие на уровень гипогликемической активности. Фармакофорный анализ был проведен с целью выявления сколько значимых фармакофоров, обеспечивающих высокую гипогликемическую активность. Потенциальный лидер должен принадлежать к перспективному классу, содержать один или больше заместителей, которые характерны для высокоактивных соединений, оно должно содержать некий липофильный признак (заряд молекулы), который характерен для высокоактивных соединений и большое количество фармакофоров, характерных высокоактивным соединениям. Отбирали вещество, которое однозначно по новым полученным данным принадлежит к наиболее перспективному классу. Это соединение содержит один или два заместителя, ответственных за высокий уровень гипогликемической активности, оно содержит как можно больше признаков QL, обеспечивающих высокий уровень гипогликемической активности. После селекции осталось три соединения, отвечающих всем этим признакам: РУ-254, РУ-663 и РУ-1316.



PY-254



PY-663



PY-1316

Далее оценивались *in silico* фармакокинетические характеристики данных веществ: биодоступность, всасываемость, токсичность. Подструктурный анализ влияния заместителей выявил, что диэтилоаминоэтил, отвечающий за высокий уровень гипогликемической активности, входит в структуру PY-254. В результате частотного анализа физико-химических характеристик установлено, что только одно соединение – PY-254 имеет признак (заряд на первом имидазольном кольце конденсированной системы), отвечающий за высокий уровень гипогликемической активности. По результатам подструктурного анализа, частотного анализа и QL-фармакофорного анализа – безусловный лидер, соединение PY-254. Системой Шредингер был сделан уточняющий расчет физико-химических параметров и выявили соответствия всем основным

параметрам. По результатам соответствия параметрам ADMET, соединение РУ-1316 не отвечает совокупности показателей, а вещество РУ-663 имеет большую токсичность, нежели соединение РУ-254.

РУ-254 аккумулирует в себе следующие признаки:

- 1) базовая структура (скаффолд) этого вещества относится к перспективному классу гипогликемических циклических гуанидинов;
- 2) структура этого вещества содержит признак в виде заместителей диэтиламиноэтил, ответственных за высокий уровень гипогликемической активности;
- 3) это вещество обладает физико-химическими характеристиками, в частности зарядовыми характеристиками первого внешнего имдазольного кольца, характерным для высокой гипогликемической активности;
- 4) РУ-254 содержит больше всего QL-признаков фармакофоров (135) наличия высокой активности;
- 5) Обладает комплексом расчетных фармакокинетических характеристик, которые соответствуют понятию «лекарственное подобие».

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

Однако соединения РУ-663 и РУ-1316 характеризуются более низкими значениями расчетных фармакокинетических показателей, существенных для всасывания, транспортировки вещества и его биодоступности в целом. Кроме того, у соединения РУ-663 более высокая токсичность и наименьшее значение условного терапевтического индекса, чем у соединений РУ-663 и

РУ-1316. Следовательно, по основным показателям ADME соединений-лидеров соединение РУ-254 предпочтительнее, чем два других (глава 4).

Кроме этого, есть экспериментальные данные (12-часовой эксперимент), подтверждающие гипогликемическую активность данных соединений (рис. 35).

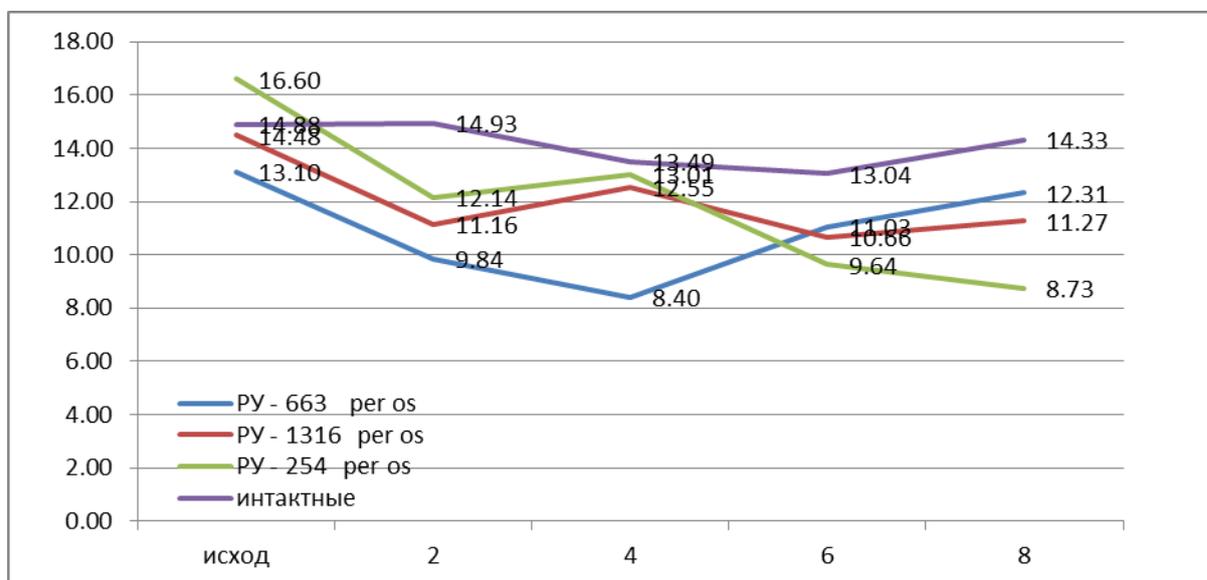


Рис. 35 – Гипогликемическая активность соединений при пероральном введении в дозе 50 мг/кг

Таким образом, выбор соединения-лидера для изучения на модели сахарного диабета показал, что РУ-254 предпочтительнее, чем два других соединения (РУ-663 и РУ-1316).

Были изучены антидиабетогенные свойства диабенола (Рожкова Н. Ю., 2006) в виде субстанции (итальянского производства) и таблетированной лекарственной формы (ОАО «Акрихин»). Диабенол представляет собой гипогликемическое средство, влияющее на дисфункцию β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы. Отмечалось улучшение поглощения глюкозы периферическими тканями в условиях инсулинорезистентности (Дудченко Г.П., 2001). Учитывая патофизиологические механизмы инсулинорезистентности после длительного введения эндогенного инсулина, можно предположить, влияние диабенола на рецепторные механизмы регуляции утилизации глюкозы.

Исходя из исследований (Смирнова Л.А., 2004), в связи с невысокими значениями периода полувыведения, необходимо разработать пролонгированные таблетированные лекарственные формы. Учитывая, тот факт, что абсолютная биодоступность диабенола составляет 15,41% (Смирнова Л.А., 2004), изучение таблетированной лекарственной формы является актуальным.

В результате экспериментального изучения влияния, субстанции и гранулята таблеток, диабенола на уровень глюкозы в крови интактных животных (кролики) было установлено, что исследуемое соединение проявляло стойкий и выраженный гипогликемический эффект. Продолжительность гипогликемического действия составляла 20-22 часа, что совпадает с группой препаратов (метформин «Харман Файнокем», Индия; глибенкламид «HYDERABAD-500082», Индия), применяемой в настоящее время в клинической практике.

Выявлено, что разница в силе гипогликемического эффекта при введении субстанции диабенола в дозах 50 и 100 мг/кг незначительна, поэтому в дальнейших исследованиях была выбрана доза 50 мг/кг, что более рационально, учитывая токсические свойства данной субстанции. При изучении проявления антидиабетогенного действия при однократном введении в разных дозировках была выявлена оптимальная доза (50 мг/кг) с максимальным гипогликемическим эффектом и наименьшими токсическими свойствами.

При исследовании антидиабетогенного действия при курсовом введении диабенола была показана тенденция снижения уровня сахара в крови под влиянием диабенола (субстанция и гранулят таблеток), 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 плавно, но по силе гипогликемического действия сопоставим с субстанцией диабенола.

Тест толерантности к глюкозе выявил достоверное снижение показателя площадь под кривой «концентрация глюкозы-время» субстанции и гранулята таблеток диабенола на 40% , на протяжении 28 дней введения (вводили сахарозу в дозе 5г/кг).

Так, 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.

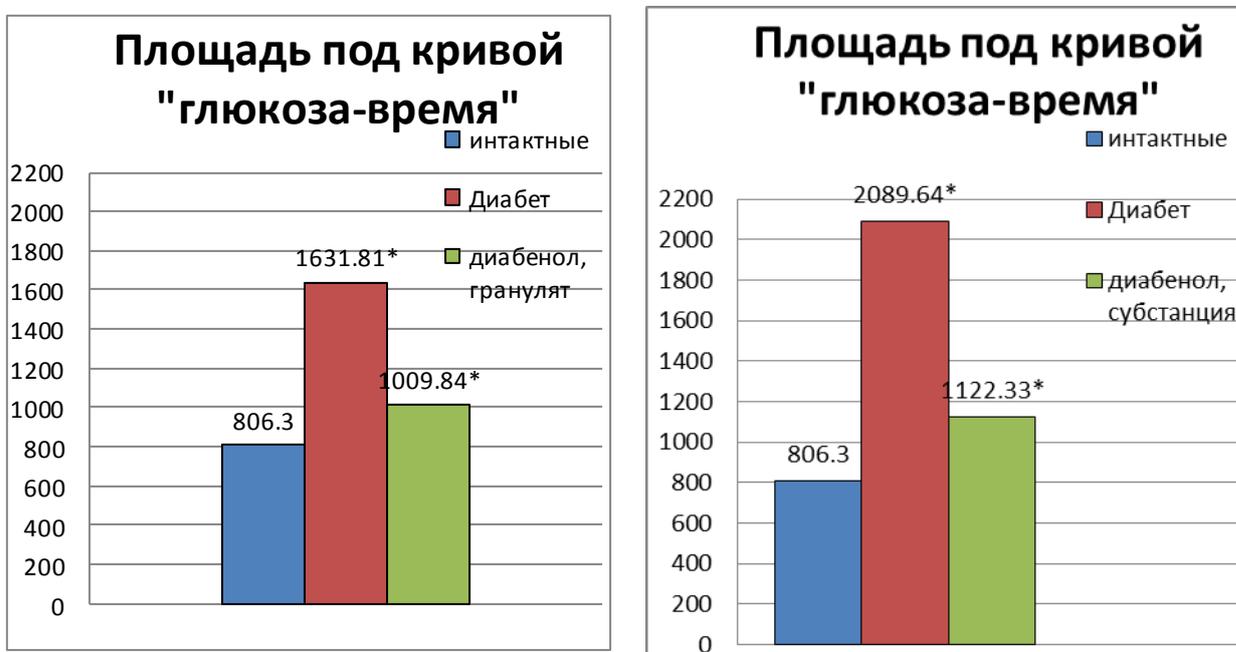


Рис.36 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на площадь под кривой «глюкоза-время» у крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом (14 день введения).

Проведенный ПГТТ на 28 день также показал снижение площади под кривой (рис. 37) «концентрация глюкозы-время». Так как на 14 день данный показатель при введении субстанции и гранулята таблеток диабенола практически не отличался, то на 28 день была посчитана площадь под кривой субстанции диабенола. Величина площади под кривой «глюкоза-время» снижалась на 41 % на фоне введения субстанции диабенола.

На 28 день введения утилизация глюкозы периферическими тканями составила 40% и 52,9% соответственно. Можно сделать вывод о том, что гранулят таблеток сработал немного эффективнее, нежели субстанция и увеличивал утилизацию глюкозы периферическими тканями еженедельно, примерно на 52,3%.

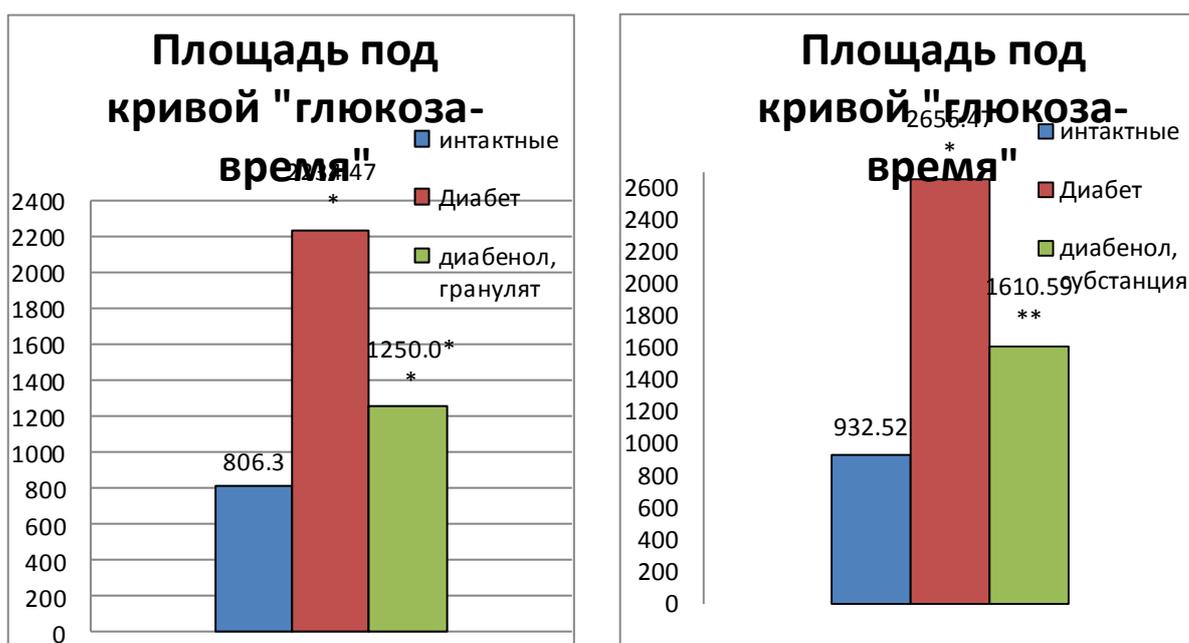


Рис.37 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на площадь под кривой «глюкоза-время» у крыс со стрептозотоциновым (45 мг/кг, в/в) диабетом (28 день введения)

Данные свидетельствует о влиянии диабенола на увеличение утилизации глюкозы.

Известно, что инсулин - это гормональный регулятор гомеостаза глюкозы в организме и его недостаточность (абсолютная, либо

относительная инсулинорезистентность) приводит к дисбалансу процессов поступления глюкозы и ее утилизации периферическими тканями. Большинство авторов склоняются к мнению, что в биохимической основе инсулинорезистентности лежит понижение чувствительности к инсулину транспортных систем и в меньшей степени - внутриклеточного обмена глюкозы (Sevilla L., 1997). Из ранее проведенных исследований по возможным механизмам действия диабенола (субстанции) был установлен инсулинотропный эффект (Дудченко Г.П., 1996). Так, в экспериментах по исследованию механизма действия субстанции диабенола было продемонстрировано, что в ответ на его внутривенное введение, наблюдалось увеличение инсулина в крови наркотизированных кошек, сочетающееся с гипогликемическим эффектом, что возможно является доказательством инсулинотропного эффекта, основанного на стимулировании функционально способных β -клеток островков Лангерганса [Г. П. Дудченко, А. А. Спасов, 2000]. Следует отметить, что повышение количества гормона приходится на 1-ю фазу секреции инсулина.

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. 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 моделировании стрептозотоцинового диабета наблюдалось (на 28 день введения) увеличение гликозилированного гемоглобина HbA1c в 1,6 раз по сравнению с интактной группой (табл. 57). 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.

Таблица 57 – Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг при ежедневном введении внутрь) на показатели углеводного обмена крыс со стрептозотоциновым(45 мг/кг, в/в) диабетом, (28 день введения) (M±m)

Группа животных	Концентрация Hb1c, %	Концентрация гликогена, мг/г ткани	Концентрация С-пептида, нг/мл	Гликогенолиз M±m мкмоль/л в мин. на мг белка	Гликолиз M±m мкмоль/л в мин. на мг белка
интактные	7,62±0,21	5,3±1,87	15,71±0,35	74,65±8,24	16,34±0,78
диабет	12,63±0,24*	0,4±0,27*	12,65±0,36*	310,98±28,54*	8,78±3,83*
диабет+диабенол (субстанция)	8,68±0,14**	1,2±0,45**	14,76±0,49**	112,35±15,93**	11,09±1,4**
диабет+диабенол (гранулят)	–	0,9±0,2**	–	93,93±9,35**	10,24±0,75**

* - достоверно по отношению к контролю, критерий Стьюдента (p>0,05)

** - достоверно по отношению к группе с экспериментальным сахарным диабетом, критерий Стьюдента (p>0,05)

Экстрапанкреатическое воздействие диабенола, выявленное при изучении всасывания углеводов в кишечнике связано с потенцированием эффектов инсулина и, по-видимому, направлено на улучшение работы транспортных систем глюкозы и замедление процессов деградации инсулина (табл. 58).

Таблица 58 – Влияние акарбозы и диабенола при внутрижелудочном введении на уровень глюкозы в крови интактных крыс после пероральной нагрузки крахмалом и сахарозой (3 г/кг) ($M \pm m$)

Исследуемые группы	Ед. изм.	Интервалы времени (мин)					
		0	15	30	60	90	120
		Содержание глюкозы в крови					
Контроль (крахмал)	ММ	4,07± 0,24	4,70± 0,22	4,57± 0,20	4,17± 0,07	3,84± 0,16	3,68± 0,15
	%		+15,5	+12,3	+2,5	-5,7	-9,8
Крахмал + акарбоза (5 мг/кг)	ММ	3,77± 0,12	4,07± 0,19*	3,60± 0,10*	3,30± 0,25*	3,13± 0,42	3,0± 0,40
	%		+10	-2,9	-10,8	-15,4	-18,9
Крахмал + диабемг/кг)	ММ	3,77± 0,09	4,03± 0,09	3,90± 0,20	4,23± 0,07	4,10± 0,20	4,37± 0,17

Контроль (сахароза)	мМ	3,56± 0,08	4,64± 0,20	4,33± 0,09	4,37± 0,17	3,68± 0,06	3,57± 0,09
	%		+30,3	+21,6	+22,8	+3,4	+0,3
Сахароза+ акарбоза (5 мг/кг)	мМ	3,30± 0,06	3,43± 0,35*	3,17± 0,41*	2,93± 0,47*	2,67± 0,48	2,63± 0,37
	%		+3,9	-3,9	-11,2	-19,1	-20,3
Сахароза+ диабенол (25 мг/кг)	мМ	3,25± 0,05	5,0± 0,20	4,65± 0,55*	3,68± 0,03	3,78± 0,03	3,30± 0,10
	%		+53,8	+43,1,6	+13,2	+16,3	+1,5
	%		+6,1	+2,6	+11,3	+7,9	+15,0

* - достоверно по отношению к контролю, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

** - достоверно по отношению к группе с экспериментальным сахарным диабетом, критерий Стьюдента ($p \leq 0,05$)

Глюконеогенез - это естественный метаболический процесс, который поддерживает оптимальный уровень глюкозы между приемами пищи (Аметов А.С., 2014). Регуляция метаболизма углеводов в печени является точкой приложения новых препаратов для лечения сахарного диабета, которые активно разрабатываются в мире. Так метформин ингибирует глюконеогенез в печени и его эффект связан со снижением печеночной инсулинорезистентности. Метформин стимулирует АМФ-активируемую протеинкиназу (Idris I., 2006) и внутриклеточный сигнал истощения запасов энергии, что приводит к повышению захвата глюкозы скелетными мышцами и торможению глюконеогенеза (Long Y.C., 2006). Учитывая, что перспективными направлениями создания новых лекарственных препаратов является регуляция ключевых ферментов углеводного обмена, активация гликолиза и синтеза гликогена, а также ингибирование глюконеогенеза и гликолиза, поэтому было изучено влияние на эти процессы субстанции и таблетированной формы диабенола.

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 (повышался в 3 раза (субстанция) и в 1,25 раз (гранулят) соответственно в сравнении с группой с исходными значениями, 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 в печени, либо изменении активности ферментов синтеза гликогена. Интенсивность гликолиза повышалась в 1,3 и в 1,2 раза соответственно, вероятно из-за снижения синтеза жирных кислот. Гликогенолиз представляет собой процесс расщепления гликогена, приводящий к вовлечению глюкозных остатков этого запасного полисахарида в гликолиз. Глюкозные единицы боковых цепей гликогена

вовлекаются в гликолиз в результате последовательного действия двух ферментов гликогенфосфорилазы и фосфоглюкомутазы. Гликогенфосфорилаза катализирует фосфоролитическое расщепление концевой α -(1,4)-гликозидной связи в молекуле гликогена.

После курсового введения диабенола в дозе 50 мг/кг (субстанция и гранулят таблеток) 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.

После терапии диабенолом (50 мг/кг, субстанция и гранулят таблеток) скорость гликолиза в печени повышалась в 1,3 и в 1,2 раза соответственно. Такие результаты свидетельствуют о том, что в организме животных, больных сахарным диабетом преобладает процесс окисления жирных кислот и преобладание анаэробного процесса, что приводит к снижению скорости гликолиза.

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

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.

Снижение эффекта инкретинов — один из важных дефектов, приводящий к снижению глюкозозависимой секреции инсулина (Дедов И.И., 2010). В последнее десятилетие благодаря фундаментальным и клиническим исследованиям в данной области развилось новое и перспективное направление в лечении СД 2-го типа, базирующееся на использовании инкретинового эффекта. Выделяют 2 основных группы соединений, регулирующих энтероинсулярную ось: агонисты GLP-1 рецепторов (GLP-1 миметики, инкретиномиметики) (Андреева Е. И., 2014) и ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (DPP4) (инкретинэнхансеры) (Gallwitz B., 2010; Gallwitz B., 2011). Препараты данных групп либо восполняют дефицит инкретинов, либо тормозят процессы деградации и таким образом стимулируют секрецию инсулина и ингибируют секрецию глюкагона (Liang R., 2007; Kim R. M., 2008), тормозят процессы апоптоза β -клеток поджелудочной железы и усиливают их ре- генерацию, что позволяет достичь пролонгированного эффекта и воздействовать на одно из звеньев патогенеза заболевания (Ranganath L.R., 2008).

При исследовании способности известных препаратов (вилдаглиптин, ситаглиптин, дипротин А) ингибировать ДПП-4 (Wallace M. B., 2008) и гомологичные ферменты плазмы крови человека, выявлено, что зависимость доза – эффект носила сигмовидный характер. Полученные данные показателей ИК50 согласуются с результатами исследований Thomas L. и др. (2008), согласно которым он составляет для ситаглиптина 19 нМ, вилдаглиптина – 62 нМ

(Thomas L., Echard M., 2008). Дипротин А – трипептид (Phe-Pro-Phe), (ингибитор ДПП-4) в данном исследовании по активности значительно уступал вилдаглиптину и ситаглиптину и ингибировал фермент в микромолярных концентрациях. Диабенол (ИК 50=1,67 мМ) уступал по эффективности ингибирования вилдаглиптину, ситаглиптину и дипротину А.

Диабенол показал невысокий уровень активности, что говорит о том, что ДПП-4 не является основной мишенью фармакологического действия для

вещества (Papazafirogoulou A. K., 2011). При курсовом введении препарата при стрептозотоциновом сахарном диабете диабенол оказывал ингибирующее влияние на активность фермента в плазме крови. Учитывая, что диабенол ингибировал активность ДПП-4 *in vitro* только в больших концентрациях, значительно уступая по силе действия препаратам сравнения, а в условиях *in vivo* на животных максимальный эффект наблюдался к 3 и 6 часу. Можно предположить, что увеличение ингибирующей активности при введении диабенола животным связано с возможным ингибирующим эффектом его метаболитов. Механизм действия диабенола возможно связан с регуляцией ключевого фермента углеводного обмена, а именно ингибирующей активности гликогенфосфоорилазы. По данным полученным в данной работе видно, что ГФ ингибирующая активность у диабенола отсутствует. Однако можно предположить, что диабенол влияет на другие ферменты гликолиза и гликогенолиза. Существует ряд препаратов, которые ингибирует в проксимальном отделе тонкого кишечника фермент альфа-глюкозидазу, который выделяется клетками щеточной каймы. Связываясь конкурентно, обратимо и дозозависимо с альфа-глюкозидазой, препараты предупреждают расщепление сложных пищевых углеводов и дисахаридов (Chiasson J-L, 2002). Поэтому была проведена оценка влияния на активность α глюкозидазы. Данные, полученных в ходе экспериментов, свидетельствуют о полном отсутствии α глюкозидазной активности диабенола.

Поздние осложнения сахарного диабета связаны, прежде всего, с повреждением кровеносных сосудов (диабетические ангиопатии). Основной механизм повреждения тканей - гликирование (гликозилирование) белков, неферментативная реакция глюкозы со свободными аминогруппами белковой молекулы. При этом образуется нестабильная альдиминовая группировка, которая может превращаться в ряд других, более стабильных соединений ("ранние продукты гликозилирования") (Емельянов В.В., 2011). Известно, что одним из путей профилактики поздних осложнений является блокирование неферментативного 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 (табл. 59).

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 повышался в 3 раза (субстанция) и в 1,25 раз (гранулят) соответственно 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.

Таблица 59 –Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг) на основные мишени фармакологического действия диабенола в крови интактных крыс (M±m)

Группа животных	Активность ДПП-4, нмоль/мл/мин	α глюкозидазная активность 10-3 М, Δ% (M±m)	Антигликирующая активность (ингибирование флуоресценции гликированного БСА), Δ% (M±m)концентрация, 10-4 М
интактные	2,40±0,12	–	–
диабет	3,54±0,43*	–	–
диабет+диабенол	3,38±0,28*	5,71±1,90	-0,85±8,01
акарбоза	–	48,91±3,44*	–
аминогуанидин	–	–	6,01±2,12*

* - данные достоверны по отношению к положительному контролю (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$).

** - данные достоверны по отношению к показателям аминогуанидина (критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$).

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 В-эндокриноцитов. Показано, что диабенол незначительно препятствовал развитию воспалительных и деструктивных изменений островкового аппарата поджелудочной железы.

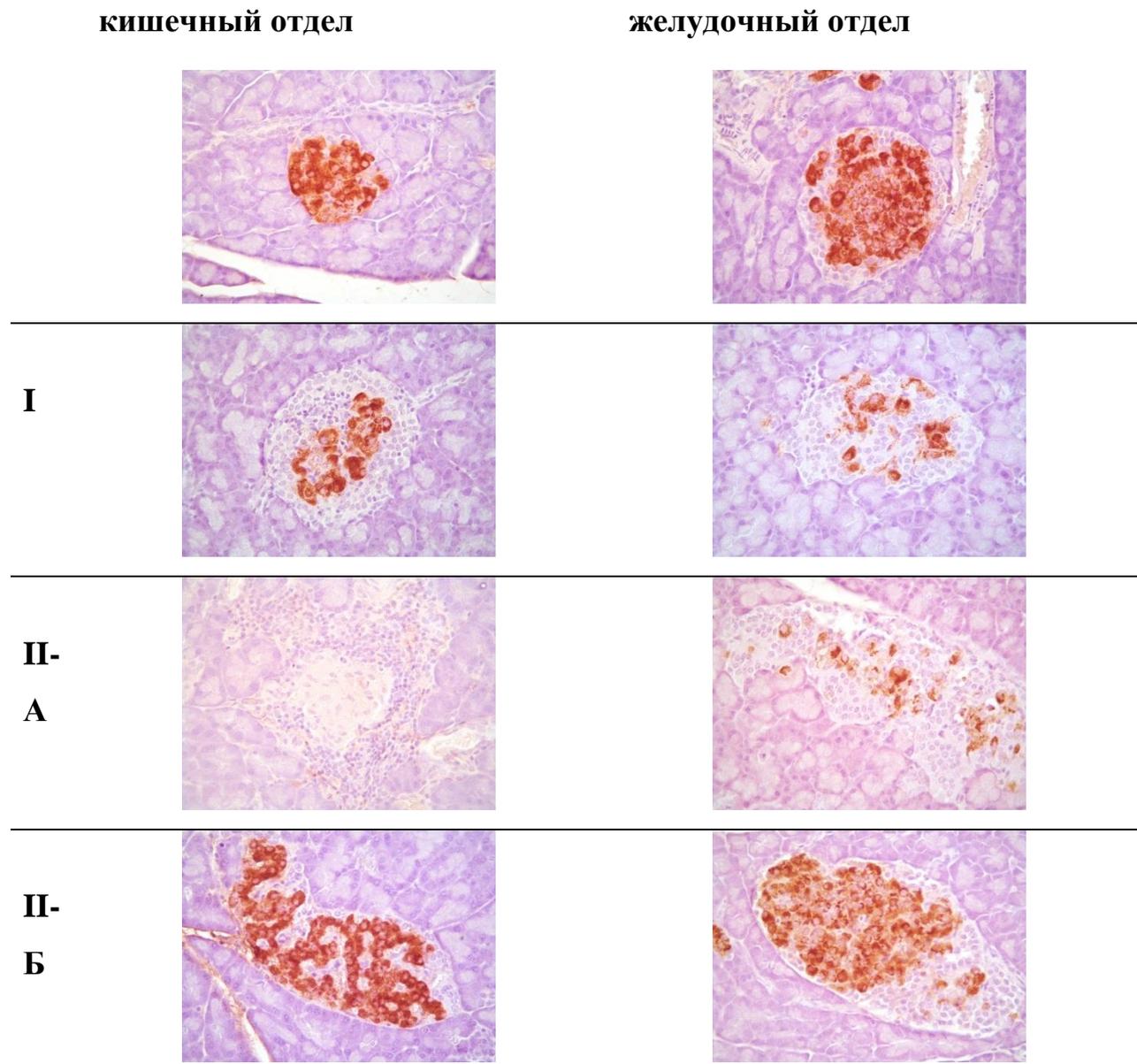


Рис. 38 – Распределение В-клеток по панкреатическим островкам. I – интактный контроль, II - стрептозотоцин-индуцированный СД, III А - стрептозотоцин-индуцированный СД + коррекция (единичные инсулин-позитивные клетки). III Б

– стрептозотоцин-индуцированный СД + субстанция. А – кишечный отдел, Б – желудочный отдел.

Таким образом, по результатам исследований установлено панкреотропное и экстрапанкреатическое действие диабенола. Влияние изучаемых веществ на поджелудочную железу возможно связано с усилением секреции инсулина. Экстрапанкреатическое воздействие исследуемых веществ, в первую очередь связано с потенцированием эффектов инсулина и, по-видимому, направлено на улучшение работы транспортных систем глюкозы и замедление процессов деградации 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 препаратом, 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-ИмиБИ > 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}; НК-4; AMPK; PPAR_g agon; НК-4 activ; FBP1; PTP1B и AMPK маловероятно.

7. В экспериментах *in vitro* установлено, что диабенол ингибирует активность ДПП-4 ($IC_{50}=1,67\text{нМ}$). 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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group et al. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes //N Engl j Med. – 2008. – Т. 2008. – №. 358. – С. 2545-2559.
2. Agrawal R., Jain P., Narayan Dikshit S. Ligand-based pharmacophore detection, screening of potential gliptins and docking studies to get effective antidiabetic agents //Combinatorial chemistry & high throughput screening. – 2012. – Т. 15. – №. 10. – С. 849-876.
3. Ahmad I. et al. N-arylsulfonyl-benzimidazolones as potential hypoglycemic agents //Zeitschrift für Naturforschung B. – 2002. – Т. 57. – №. 3. – С. 349-354.
4. Al- masri I. M., Mohammad M. K., Taha M. O. Discovery of DPP IV inhibitors by pharmacophore modeling and QSAR analysis followed by in silico screening //ChemMedChem. – 2008. – Т. 3. – №. 11. – С. 1763-1779.
5. Anisimova V. A. et al. Synthesis and pharmacological activity N-aryloxyethyl derivatives of 9H-2, 3-dihydroimidazo-and 10H-2, 3, 4, 10-tetrahydropyrimido [1, 2-a] benzimidazoles //Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2006. – Т. 40. – №. 9. – С. 485-488.
6. APYImuPYgan S., Kavitha H. P. Synthesis and potential cytotoxic activity of some new benzoxazoles, imidazoles, benzimidazoles and tetrazoles //Acta pharmaceutica. – 2013. – Т. 63. – №. 2. – С. 253-264.
7. Barker H. A. et al. Isolation and properties of crystalline cobamide coenzymes containing benzimidazole or 5, 6-dimethylbenzimidazole //Journal of Biological Chemistry. – 1960. – Т. 235. – №. 2. – С. 480-488.
8. Baskin I. I., Palyulin V. A., Zefirov N. S. Neural networks in building QSAR models //Artificial Neural Networks: Methods and Applications. – 2009. – С. 133-154.

9. Baskin I., Varnek A. Fragment descriptors in SAR/QSAR/QSPR studies, molecular similarity analysis and in virtual screening //ChemInform. – 2009. – T. 40. – №. 20. – C. i.
10. Baurin N. et al. 2D QSAR consensus prediction for high-throughput virtual screening. An application to COX-2 inhibition modeling and screening of the NCI database //Journal of chemical information and computer sciences. – 2004. – T. 44. – №. 1. – C. 276-285.
11. Beisswenger P., PYggiero-Lopez D. Metformin inhibition of glycation processes //Diabetes & metabolism. – 2003. – T. 29. – №. 4. – C. 6S95-6S103.
12. Bergans N. et al. Molecular mode of inhibition of glycogenolysis in rat liver by the dihydropyridine derivative, BAY R3401: inhibition and inactivation of glycogen phosphorylase by an activated metabolite //Diabetes. – 2000. – T. 49. – №. 9. – C. 1419-1426.
13. Bersuker I. B. Pharmacophore identification and antidiabetic activity prediction in the class of guanidino-and aminoguanidinoacetic acid compounds //Cur. Pharm. Design—2003—9—P. – 2003. – C. 1575-1606.
14. Bharatam P. V. et al. Modeling and informatics in designing anti-diabetic agents //Current pharmaceutical design. – 2007. – T. 13. – №. 34. – C. 3518-3530.
15. Bhatt A. et al. CoMSIA study on substituted aryl alkanolic acid analogs as GPR40 agonists //Chemical biology & dPYg design. – 2011. – T. 77. – №. 5. – C. 361-372.
16. Bickel C. A. et al. Dysregulation of renal salt and water transport proteins in diabetic Zucker rats //Kidney international. – 2002. – T. 61. – №. 6. – C. 2099-2110.
17. Bickerton G. R. et al. Quantifying the chemical beauty of dPYgs //Nature chemistry. – 2012. – T. 4. – №. 2. – C. 90-98.
18. Bolton W. K. et al. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy //American journal of nephrology. – 2004. – T. 24. – №. 1. – C. 32-40.

19. Bottino R. et al. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment //Diabetes. – 2004. – T. 53. – №. 10. – C. 2559-2568.
20. Bras I. D. et al. Evaluation of advanced glycation end-products in diabetic and inherited canine cataracts //Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. – 2007. – T. 245. – №. 2. – C. 249-257.
21. Bras I. D. et al. Evaluation of Advanced Glycation End-Products in Diabetic and Inherited Canine Cataracts //Investigative Ophthalmology & Visual Science. – 2004. – T. 45. – №. 13. – C. 1690-1690.
22. Brenk R. et al. Lessons learnt from assembling screening libraries for dPYg discovery for neglected diseases //ChemMedChem. – 2008. – T. 3. – №. 3. – C. 435-444.
23. Broto P., Moreau G., Vandycke C. Molecular stPYctures: perception, autocorrelation descriptor and sar studies: system of atomic contributions for the calculation of the n-octanol/water partition coefficients //European journal of medicinal chemistry. – 1984. – T. 19. – №. 1. – C. 71-78.
24. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications //Nature. – 2001. – T. 414. – №. 6865. – C. 813-820.
25. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications //Diabetes. – 2005. – T. 54. – №. 6. – C. 1615-1625.
26. Capasso G. et al. Acid-base transport in Henle's loop: the effects of reduced renal mass and diabetes //Journal of nephrology. – 2006. – T. 19. – №. 2. – C. S11.
27. Caprio S. et al. Improvement of metabolic control in diabetic patients during mebendazole administration: preliminary studies //Diabetologia. – 1984. – T. 27. – №. 1. – C. 52-55.
28. Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control //Trends in biochemical sciences. – 2004. – T. 29. – №. 1. – C. 18-24.

29. Carling D., Sanders M. J., Woods A. The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases //International journal of obesity. – 2008. – T. 32. – C. S55-S59.
30. Cernea S., Raz I. Therapy in the early stage: incretins //Diabetes care. – 2011. – T. 34. – №. Supplement 2. – C. S264-S271.
31. Chang Y. et al. Regulatory effects of micronutrient complex on the expression of Th1 and Th2 cytokines in diabetic C57BL mice //Wei sheng yan jiu= Journal of hygiene research. – 2005. – T. 34. – №. 1. – C. 64-66.
32. Chen D. et al. A nonpeptidic agonist of glucagon-like peptide 1 receptors with efficacy in diabetic db/db mice //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – T. 104. – №. 3. – C. 943-948.
33. Cheng A. Y., Fantus I. G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus //Canadian Medical Association Journal. – 2005. – T. 172. – №. 2. – C. 213-226.
34. Chipkin S. R., Kelly K. L., Pyderman N. B. Hormone-fuel interrelationships: fed state, starvation, and diabetes mellitus //Joslin's Diabetes. – 1994. – C. 97-115.
35. Combettes M., Kargar C. Newly approved and promising antidiabetic agents //Therapie. – 2007. – T. 62. – №. 4. – C. 293-310.
36. Costantino L., Barlocco D. Privileged structures as leads in medicinal chemistry //Current medicinal chemistry. – 2006. – T. 13. – №. 1. – C. 65-85.
37. Cramer R. D., Patterson D. E., Bunce J. D. Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins //Journal of the American Chemical Society. – 1988. – T. 110. – №. 18. – C. 5959-5967.
38. Crino A. et al. A randomized trial of nicotinamide and vitamin E in children with recent onset type 1 diabetes (IMDIAB IX) //European Journal of Endocrinology. – 2004. – T. 150. – №. 5. – C. 719-724.

39. Cristianini N., Shawe-Taylor J. An introduction to support vector machines. – 2000.
40. Cumbie B. C., Hermayer K. L. Current concepts in targeted therapies for the pathophysiology of diabetic microvascular complications //Vascular health and risk management. – 2007. – T. 3. – №. 6. – C. 823.
41. Dang Q. et al. Discovery of phosphonic diamide prodPYgs and their use for the oral delivery of a series of fPYctose 1, 6-bisphosphatase inhibitors //Journal of medicinal chemistry. – 2008. – T. 51. – №. 14. – C. 4331-4339.
42. Dang Q. et al. FPYctose-1, 6-bisphosphatase inhibitors. 2. Design, synthesis, and stPYcture– activity relationship of a series of phosphonic acid containing benzimidazoles that function as 5'-adenosinemonophosphate (AMP) mimics //Journal of medicinal chemistry. – 2009. – T. 53. – №. 1. – C. 441-451.
43. Dang Q. et al. Oxazole phosphonic acids as fPYctose 1, 6-bisphosphatase inhibitors with potent glucose-lowering activity //MedChemComm. – 2011. – T. 2. – №. 4. – C. 287-290.
44. DeSimone R. W. et al. Privileged stPYctures: applications in dPYg discovery //Combinatorial chemistry & high throughput screening. – 2004. – T. 7. – №. 5. – C. 473-493.
45. Dewar M. J. S. et al. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model.[Erratum to document cited in CA103 (2): 11627f] //Journal of the American Chemical Society. – 1993. – T. 115. – №. 12. – C. 5348-5348.
46. Dharmalingam M., Sriram U., BaPYah M. P. Liraglutide: A review of its therapeutic use as a once daily GLP-1 analog for the management of type 2 diabetes mellitus //Indian journal of endocrinology and metabolism. – 2011. – T. 15. – №. 1. – C. 9.
47. Di L., Kerns E. H. DPYg-like properties: concepts, stPYcture design and methods from ADME to toxicity optimization. – Academic Press, 2015.

48. Dinparast L. et al. Design, synthesis, α -glucosidase inhibitory activity, molecular docking and QSAR studies of benzimidazole derivatives //Journal of Molecular Structure. – 2016. – T. 1114. – C. 84-94.
49. Draznin B. et al. The existence of an optimal range of cytosolic free calcium for insulin-stimulated glucose transport in rat adipocytes //Journal of Biological Chemistry. – 1987. – T. 262. – №. 30. – C. 14385-14388.
50. DPYcker D. J., Nauck M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes //The Lancet. – 2006. – T. 368. – №. 9548. – C. 1696-1705.
51. Duarte C. D., Barreiro E. J., Fraga C. A. M. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates //Mini reviews in medicinal chemistry. – 2007. – T. 7. – №. 11. – C. 1108-1119.
52. Dungan K. M., Buse J. B., Ratner R. E. Effects of therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus with a peptide derived from islet neogenesis associated protein (INGAP) //Diabetes/metabolism research and reviews. – 2009. – T. 25. – №. 6. – C. 558-565.
53. Ecelbarger C. A. et al. Expression of salt and urea transporters in rat kidney during cisplatin-induced polyuria //Kidney international. – 2001. – T. 60. – №. 6. – C. 2274-2282.
54. Efendic S., Kindmark H., Berggren P.O. // J. Intern. Med.-1991-V.229-
55. Fei F., Zhou Z. New substituted benzimidazole derivatives: a patent review (2010–2012) //Expert opinion on therapeutic patents. – 2013. – T. 23. – №. 9. – C. 1157-1179.
56. Fisher R. A. The use of multiple measurements in taxonomic problems //Annals of eugenics. – 1936. – T. 7. – №. 2. – C. 179-188.
56. Fleming A., Rosenberg L. Prospects and challenges for islet regeneration as a treatment for diabetes: a review of islet neogenesis associated protein //Journal of diabetes science and technology. – 2007. – T. 1. – №. 2. – C. 231-244.

57. Franke R., Meisske W. Discriminant-analytic stPYcture-effect relationship of qualitative biological data. Virostatic effect of isatin-beta-isothiosemicarbazones //Acta biologica et medica Germanica. – 1976. – T. 35. – №. 1. – C. 73.
58. Frecer V. Theoretical prediction of dPYg-receptor interactions //DPYg metabolism and dPYg interactions. – 2011. – T. 26. – №. 3. – C. 91-104.
59. Free S. M., Wilson J. W. A mathematical contribution to stPYcture-activity studies //Journal of Medicinal Chemistry. – 1964. – T. 7. – №. 4. – C. 395-399.
60. Freedman B. I. et al. Design and baseline characteristics for the aminoguanidine Clinical Trial in Overt Type 2 Diabetic Nephropathy (ACTION II) //Controlled clinical trials. – 1999. – T. 20. – №. 5. – C. 493-510.
61. Freeman J. A., Skapura D. M. Algorithms, Applications, and Programming Techniques. – Addison-Wesley Publishing Company, USA, 1991.
62. Friesner R. A. et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy //Journal of medicinal chemistry. – 2004. – T. 47. – №. 7. – C. 1739-1749.
63. Fujimoto K., Polonsky K. S. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic β - cell survival //Diabetes, Obesity and Metabolism. – 2009. – T. 11. – №. s4. – C. 30-37.
64. Gallwitz B. GLP-1 agonists and dipeptidyl-peptidase IV inhibitors //Diabetes- Perspectives in DPYg Therapy. – Springer Berlin Heidelberg, 2011. – C. 53-74.
65. Gallwitz B. The evolving place of incretin-based therapies in type 2 diabetes //Pediatric Nephrology. – 2010. – T. 25. – №. 7. – C. 1207-1217.
66. Gasteiger J., Engel T. (ed.). Chemoinformatics: a textbook. – John Wiley & Sons, 2006.
67. Ghatak S. et al. Linagliptin: a novel xanthine-based dipeptidyl peptidase-4 inhibitor for treatment of type II diabetes mellitus //Current diabetes reviews. – 2011. – T. 7. – №. 5. – C. 325-335.
68. Ghose A. K. et al. Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-stPYcture-directed quantitative stPYcture-activity relationships. 2. Modeling

- dispersive and hydrophobic interactions //Journal of chemical information and computer sciences. – 1987. – T. 27. – №. 1. – C. 21-35.
69. Ghose A. K., Viswanadhan V. N., Wendoloski J. J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for dPYg discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known dPYg databases //Journal of combinatorial chemistry. – 1999. – T. 1. – №. 1. – C. 55-68.
70. Gleeson M. P. Generation of a set of simple, interpretable ADMET PYles of thumb //Journal of medicinal chemistry. – 2008. – T. 51. – №. 4. – C. 817-834.
71. Goh S. Y., Cooper M. E. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2008. – T. 93. – №. 4. – C. 1143-1152.
72. Goswami B., Singh A. K. Pharmacological activities of benzimidazole derivatives-Overview //IJSID. – 2012. – T. 2. – №. 1. – C. 121-136.
73. Gracia A. M. Obesity as disease and as social problem //Gaceta medica de Mexico. – 2009. – T. 146. – №. 6. – C. 389-396.
74. Grzeszczak W. Linagliptyna—nowy inhibitor dipeptydylopeptydazy IV //Clinical Diabetology. – 2011. – T. 12. – №. 5. – C. 161-169.
75. Hanifi-Moghaddam P. et al. An association of autoantibody status and sePYm cytokine levels in type 1 diabetes //Diabetes. – 2003. – T. 52. – №. 5. – C. 1137-1142.
76. Hansch C., Fujita T. p - σ - π Analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical stPYcture //Journal of the American Chemical Society. – 1964. – T. 86. – №. 8. – C. 1616-1626.
77. Hardie D. G. AMP-activated protein kinase as a dPYg target //Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2007. – T. 47. – C. 185-210.
78. Heng S., Harris K. M., Kantrowitz E. R. Designing inhibitors against fPYctose 1, 6-bisphosphatase: Exploring natural products for novel inhibitor scaffolds //European journal of medicinal chemistry. – 2010. – T. 45. – №. 4. – C. 1478-1484.

79. Herling A. W. et al. Pharmacodynamic profile of a novel inhibitor of the hepatic glucose-6-phosphatase system // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 1998. – Т. 274. – №. 6. – С. G1087-G1093.
80. Hess H. H., Derr J. E. Assay of inorganic and organic phosphoPYC in the 0.1–5 nanomole range // *Analytical biochemistry*. – 1975. – Т. 63. – №. 2. – С. 607-613.
81. Hinnen D. et al. Incretin mimetics and DPP-IV inhibitors: new paradigms for the treatment of type 2 diabetes // *The Journal of the American Board of Family Medicine*. – 2006. – Т. 19. – №. 6. – С. 612-620.
82. Hokenson M. J. et al. Glucagon-like peptide 1 (glp-1) pharmaceutical formulations : заяв. пат. 11/735,957 США. – 2007.
83. Hu Y. et al. Effects of nicotinamide on prevention and treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats // *Chinese medical journal*. – 1996. – Т. 109. – №. 11. – С. 819-822.
84. Huijberts M. S. P., Schaper N. C., Schalkwijk C. G. Advanced glycation end products and diabetic foot disease // *Diabetes/metabolism research and reviews*. – 2008. – Т. 24. – №. S1.
85. I. Cheng, G. Fantus // *CMAJ*. – 2005. – V. 172, № 2. – P.213–226.
86. Idris I., Donnelly R. Protein kinase C β inhibition: a novel therapeutic strategy for diabetic microangiopathy // *Diabetes and Vascular Disease Research*. – 2006. – Т. 3. – №. 3. – С. 172-178.
87. Ikeda H. Discovery of The Thiazolidinediones Class and its Distinct Futures. Insulin Resistance, Dyslipidemia, and Type 2 Diabetes. Opportunities Offered by the Thiazolidinediones. 36th Annual Meeting of the European Association for The Study of Diabetes // *36th Annual Meeting of the European Association for The Study of Diabetes. Report*. – 2000. – Т. 3.
88. International Diabetes Federation. *Diabetes and Cardiovascular Disease: Time to act*. – International Diabetes Federation, 2001.

89. Ishikawa F. et al. Cyclic guanidines. I. Synthesis of hypoglycemic 1-substituted 2-imino-1, 3-diazacycloalkanes //Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 1978. – T. 26. – №. 12. – C. 3658-3665.
90. Ishikawa M. et al. Discovery of novel 2-(pyridine-2-yl)-1H-benzimidazole derivatives as potent glucokinase activators //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2009. – T. 19. – №. 15. – C. 4450-4454.
91. Izenman A. J. Modern multivariate statistical techniques //Regression, classification and manifold learning. – 2008.
92. Jagtap P. G. et al. Discovery of potent poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors from the modification of indeno [1, 2-c] isoquinolinone //Journal of medicinal chemistry. – 2005. – T. 48. – №. 16. – C. 5100-5103.
93. Kahn B. B. et al. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism //Cell metabolism. – 2005. – T. 1. – №. 1. – C. 15-25.
94. Kamal A., Sattur P. B. A One-Pot Synthesis of Ring-fused 1, 3, 5-Triazine-2, 4 (3H)-diones: Reactions with Chlorocarbonyl Isocyanate //Synthesis. – 1985. – T. 1985. – №. 09. – C. 892-893.
95. Kim R. M. et al. Discovery of potent, orally active benzimidazole glucagon receptor antagonists //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2008. – T. 18. – №. 13. – C. 3701-3705.
96. Klebe G., Abraham U., Mietzner T. Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of dPYg molecules to correlate and predict their biological activity //Journal of medicinal chemistry. – 1994. – T. 37. – №. 24. – C. 4130-4146.
97. Kohonen T. Self-organizing maps, volume 30 of Springer Series in Information Sciences. – 1995.
98. Kosasayama A. et al. Cyclic Guanidines. IV. Synthesis of Hypoglycemic N-Benzhydryl Bicyclic Guanidines //Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 1979. – T. 27. – №. 4. – C. 841-847.

99. Kosasayama A. et al. Cyclic Guanidines. V. Synthesis of Hypoglycemic 2, 2-and 3, 3-Diphenylimidazo [1, 2-a][1, 3]-diazacycloalkane Derivatives //Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 1979. – T. 27. – №. 4. – C. 848-857.
100. Kumar J. A. et al. New antihyperglycemic, α -glucosidase inhibitory, and cytotoxic derivatives of benzimidazoles //Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry. – 2010. – T. 25. – №. 1. – C. 80-86.
101. Larsen S. D. et al. Synthesis and biological activity of analogues of the antidiabetic/antiobesity agent 3-guanidinopropionic acid: discovery of a novel aminoguanidinoacetic acid antidiabetic agent //Journal of medicinal chemistry. – 2001. – T. 44. – №. 8. – C. 1217-1230.
102. Leave C. Neural Networks: Algorithms, Applications and Programming Techniques //Journal of the Operational Research Society. – 1992. – T. 43. – №. 11. – C. 1106-1106.
103. Li F. et al. Low-dose poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor-containing combination therapies reverse early peripheral diabetic neuropathy //Diabetes. – 2005. – T. 54. – №. 5. – C. 1514-1522.
104. Li J. et al. Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: mechanisms and perspective //Journal of the neurological sciences. – 2012. – T. 317. – №. 1. – C. 1-5.
105. Liang R. et al. Design and synthesis of conformationally constrained tri-substituted ureas as potent antagonists of the human glucagon receptor //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2007. – T. 17. – №. 3. – C. 587-592.
106. Lindgren K. et al. Regulation of the muscle- specific AMP- activated protein kinase $\alpha 2\beta 2\gamma 3$ complexes by AMP and implications of the mutations in the $\gamma 3$ - subunit for the AMP dependence of the enzyme //FEBS Journal. – 2007. – T. 274. – №. 11. – C. 2887-2896.
107. Lipinski C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in dPYg discovery and development settings //Advanced dPYg delivery reviews. – 1997. – T. 23. – №. 1-3. – C. 3-25.

108. Long Y. C., Zierath J. R. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation //The Journal of clinical investigation. – 2006. – T. 116. – №. 7. – C. 1776-1783.
109. Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient //Journal of Diabetes Research. – 2007. – T. 2007.
110. Lue L. F. et al. Receptor for advanced glycation end products: its role in Alzheimer's disease and other neurological diseases. – 2009.
111. Madsen P. et al. Human glucagon receptor antagonists with thiazole cores. A novel series with superior pharmacokinetic properties //Journal of medicinal chemistry. – 2009. – T. 52. – №. 9. – C. 2989-3000.
112. Mahnensmith R. L., Aronson P. S. The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes //Circulation research. – 1985. – T. 56. – №. 6. – C. 773-788.
113. Manna R. et al. Nicotinamide treatment in subjects at high risk of developing IDDM improves insulin secretion //The British journal of clinical practice. – 1991. – T. 46. – №. 3. – C. 177-179.
114. Manson J. A. E. et al. A prospective study of maturity-onset diabetes mellitus and risk of coronary heart disease and stroke in women //Archives of internal medicine. – 1991. – T. 151. – №. 6. – C. 1141-1147.
115. Martin W. H. et al. Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – T. 95. – №. 4. – C. 1776-1781.
116. Matschinsky F. M. Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy //Nature reviews DPYg discovery. – 2009. – T. 8. – №. 5. – C. 399-416.
117. Matschinsky F. M., Porte D. Glucokinase activators (GKAs) promise a new pharmacotherapy for diabetics //F1000 Med Rep. – 2010. – T. 2. – C. 43.

118. Mega C. et al. Sitagliptin prevents aggravation of endocrine and exocrine pancreatic damage in the Zucker Diabetic Fatty rat-focus on amelioration of metabolic profile and tissue cytoprotective properties //Diabetology & metabolic syndrome. – 2014. – T. 6. – №. 1. – C. 42.
119. Meijer L., Flajolet M., Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3 //Trends in pharmacological sciences. – 2004. – T. 25. – №. 9. – C. 471-480.
120. Merz Jr K. M., Ringe D., Reynolds C. H. (ed.). DPYg design: stPYcture-and ligand-based approaches. – Cambridge University Press, 2010.
121. Merz Jr K. M., Ringe D., Reynolds C. H. (ed.). DPYg design: stPYcture-and ligand-based approaches. – Cambridge University Press, 2010.
122. Metz S. A. Lipoxygenase inhibitors reduce insulin secretion without impairing calcium mobilization //Endocrinology. – 1987. – T. 120. – №. 6. – C. 2534-2546.
123. Metz S.A. // Am. J. Med.-1 988-V.85-Suppl. 5A-P.9.
124. Minokoshi Y. et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus //Nature. – 2004. – T. 428. – №. 6982. – C. 569-574.
125. Minoura H. et al. Pharmacological characteristics of a novel nonthiazolidinedione insulin sensitizer, FK614 //European journal of pharmacology. – 2004. – T. 494. – №. 2. – C. 273-281.
126. Mishra D., Singh S. www. jpronline. info //Journal of Pharmacy Research Vol. – 2010. – T. 3. – №. 2. – C. 371-378.
127. Mobinikhaledi A., Asghari B., Jabbarpour M. Design and synthesis of new benzimidazole and pyrimidine derivatives as α -glucosidase inhibitor //Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. – 2015. – T. 14. – №. 3. – C. 723.
128. Mobinikhaledi A., Asghari B., Jabbarpour M. Design and synthesis of new benzimidazole and pyrimidine derivatives as α -glucosidase inhibitor //Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR. – 2015. – T. 14. – №. 3. – C. 723.

129. Murcia-Soler M. et al. QSAR analysis of hypoglycemic agents using the topological indices //Journal of chemical information and computer sciences. – 2001. – T. 41. – №. 5. – C. 1345-1354.
130. Nandi S., C Bagchi M. Importance of kier-Hall topological indices in the QSAR of anticancer dPYg design //Current computer-aided dPYg design. – 2012. – T. 8. – №. 2. – C. 159-170.
131. Naresh B. M. Computational Study on Protein-Ligand Interactions for Anti-Diabetic: In silico Study. – N.-Y.: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012. – 172 p.
132. Neuhold L. A. Human brain proteome. – Academic Press, 2004. – T. 61.
133. Niskanen L. et al. Hyperglycemia and compositional lipoprotein abnormalities as predictors of cardiovascular mortality in type 2 diabetes: a 15-year follow-up from the time of diagnosis //Diabetes care. – 1998. – T. 21. – №. 11. – C. 1861-1869.
134. Noll J.; Pouyssegur J.// Am. J. Physiol.-1 995-N2-Pt.1 -P.283-296.
135. Ohishi T., Yoshida S. The therapeutic potential of GPR119 agonists for type 2 diabetes //Expert opinion on investigational dPYgs. – 2012. – T. 21. – №. 3. – C. 321-328.
136. Opitz D., Maclin R. Popular ensemble methods: An empirical study //Journal of Artificial Intelligence Research. – 1999. – T. 11. – C. 169-198.
137. Owen O. E. et al. Mebendazole and insulin secretion from isolated rat islets //Metabolism. – 1985. – T. 34. – №. 6. – C. 567-570.
138. Owen O. E. et al. Mebendazole and insulin secretion from isolated rat islets //Metabolism. – 1985. – T. 34. – №. 6. – C. 567-570.
139. Papazafiropoulou A. K., Kardara M. S., Pappas S. I. Role of Incretin, Incretin Analogues and Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors in the Pathogenesis and Treatment of Diabetes Mellitus. – INTECH Open Access Publisher, 2011.

140. Philip F., John W. Influence of endogenous insulin secretion on splanchnic glucose and amino acid metabolism in man //J Clin Invest. – 1971. – Т. 50. – №. 8. – С. 1702-1711.
141. Pittenger G. L., Taylor-Fishwick D., Vinik A. I. The role of islet neogenesis-associated protein (INGAP) in pancreatic islet neogenesis //Current Protein and Peptide Science. – 2009. – Т. 10. – №. 1. – С. 37-45.
142. Portha B., Tourrel-Cuzin C., Movassat J. Activation of the GLP-1 receptor signalling pathway: a relevant strategy to repair a deficient beta-cell mass //Experimental diabetes research. – 2011. – Т. 2011.
143. Pozzilli P. et al. Vitamin E and nicotinamide have similar effects in maintaining residual beta cell function in recent onset insulin-dependent diabetes (the IMDIAB IV study) Eur J Endocrinol 137 (3) 234-239, doi: 10.1530/eje.0.1370234 //Brain Pathology. – 2006. – Т. 9. – С. 119.
144. Puzyn T., Leszczynski J., Cronin M. T. (ed.). Recent advances in QSAR studies: methods and applications. – Springer Science & Business Media, 2010. – Т. 8.
145. QikProp: Rapid ADME predictions of dPYg candidates: Официальный сайт компании Schrödinger, LLC, 2015. – URL: <http://www.schrodinger.com/QikProp>.
146. Qtait A., Karaman R. Antihyperglycemic DPYgs //Commonly used dPYgs-uses, side effects, bioavailability and approaches to improve it. – 2015. – С. 173.
147. Qureshi S. A. et al. A novel glucagon receptor antagonist inhibits glucagon-mediated biological effects //Diabetes. – 2004. – Т. 53. – №. 12. – С. 3267-3273.
148. Rahbar S. et al. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation //Clinica chimica acta. – 2000. – Т. 301. – №. 1. – С. 65-77.
149. Rahbar S., Figarola J. L. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts //Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2003. – Т. 419. – №. 1. – С. 63-79.

150. Ranganath L. R. The entero-insular axis: implications for human metabolism //Clinical chemistry and laboratory medicine. – 2008. – T. 46. – №. 1. – C. 43-56.
151. Ray K. K. et al. Effect of intensive control of glucose on cardiovascular outcomes and death in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis of randomised controlled trials //The Lancet. – 2009. – T. 373. – №. 9677. – C. 1765-1772.
152. Riddle M. C., Rosenstock J. Oral monotherapy and combination therapy. – 2004.
153. Robertson R. P. et al. β -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes //Diabetes. – 2004. – T. 53. – №. suppl 1. – C. S119-S124.
154. Ross S. A., Ekoe J. M. Incretin agents in type 2 diabetes //Canadian Family Physician. – 2010. – T. 56. – №. 7. – C. 639-648.
155. Ross S. A., Ekoe J. M. Incretin agents in type 2 diabetes //Canadian Family Physician. – 2010. – T. 56. – №. 7. – C. 639-648.
156. Pyggiero-Lopez D. et al. Reaction of metformin with dicarbonyl compounds. Possible implication in the inhibition of advanced glycation end product formation //Biochemical pharmacology. – 1999. – T. 58. – №. 11. – C. 1765-1773.
157. VizPalomo F.; Toledo T. // Med. Hypotheses.-1993-V.41-P.1 86-189.
158. Rybalkin S. D. et al. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function //Circulation research. – 2003. – T. 93. – №. 4. – C. 280-291.
159. Salt D. Sigma quality control test procedure Enzymatic Assay of glucokinase (EC 2.7.1.2) PRINCIPLE: P. 7–10.
160. Salvadori S. et al. Role of benzimidazole (Bid) in the δ -opioid agonist pseudopeptide H-Dmt-Tic-NH-CH₂-Bid (UFP-502) //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2008. – T. 16. – №. 6. – C. 3032-3038.

161. Sanders M. J. et al. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade //Biochemical Journal. – 2007. – T. 403. – №. 1. – C. 139-148.
162. Sandler S., Andersson A. Stimulation of cell replication in transplanted pancreatic islets by nicotinamide treatment //Transplantation. – 1988. – T. 46. – №. 1. – C. 30-31.
163. Saqib U., Siddiqi M. I. 3D-QSAR studies on triazolopiperazine amide inhibitors of dipeptidyl peptidase-IV as anti-diabetic agents //SAR and QSAR in Environmental Research. – 2009. – T. 20. – №. 5-6. – C. 519-535.
164. Senzaki H. et al. Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates β -adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure //The FASEB Journal. – 2001. – T. 15. – №. 10. – C. 1718-1726.
165. Shaikh I. N. et al. Synthesis and In- vivo Evaluation of Carbonyl- amide Linkage Based New Benzimidazole Derivatives //Archiv der Pharmazie. – 2012. – T. 345. – №. 1. – C. 65-72.
166. Shingalapur R. V. et al. Derivatives of benzimidazole pharmacophore: Synthesis, anticonvulsant, antidiabetic and DNA cleavage studies //European journal of medicinal chemistry. – 2010. – T. 45. – №. 5. – C. 1753-1759.
167. Simó R., Hernández C. Tratamiento de la diabetes mellitus: objetivos generales y manejo en la práctica clínica //Revista Española de Cardiología. – 2002. – T. 55. – №. 8. – C. 845-860.
168. Sjöholm Å. Liraglutide therapy for type 2 diabetes: overcoming unmet needs //Pharmaceuticals. – 2010. – T. 3. – №. 3. – C. 764-781.
169. Somsak L. et al. Glucose analog inhibitors of glycogen phosphorylases as potential antidiabetic agents: recent developments //Current pharmaceutical design. – 2003. – T. 9. – №. 15. – C. 1177-1189.
170. Spada A., Philippe J. Metformin role in the treatment of type 2 diabetes in 2008 //Revue medicale suisse. – 2008. – T. 4. – №. 160. – C. 1392-4, 1396-7.

171. Sparks R. B. et al. Benzothiazole benzimidazole (S)-isothiazolidinone derivatives as protein tyrosine phosphatase-1B inhibitors //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2007. – T. 17. – №. 3. – C. 736-740.
172. Stratton I. M. et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study //Bmj. – 2000. – T. 321. – №. 7258. – C. 405-412.
173. Su H. et al. Boc, a non-peptidic glucagon-like peptide-1 receptor agonist, invokes sustained glycemic control and weight loss in diabetic mice //PLoS One. – 2008. – T. 3. – №. 8. – C. e2892.
174. Suh S. W. et al. Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316,819 ([RR*, S*]-5-chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl) propyl]-1H-indole-2-carboxamide) //Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2007. – T. 321. – №. 1. – C. 45-50.
175. Szabó C. et al. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors ameliorate nephropathy of type 2 diabetic Leprdb/db mice //Diabetes. – 2006. – T. 55. – №. 11. – C. 3004-3012.
176. Taha M. O. et al. Docking-based comparative intermolecular contacts analysis as new 3-D QSAR concept for validating docking studies and in silico screening: NMT and GP inhibitors as case studies //Journal of chemical information and modeling. – 2011. – T. 51. – №. 3. – C. 647-669.
177. Takahashi K. M., Takino J., Yamagishi S. Involvement of the toxic AGEs (TAGE)-RAGE system in the pathogenesis of diabetic vascular complications: a novel therapeutic strategy //Current dPYg targets. – 2010. – T. 11. – №. 11. – C. 1468-1482.
178. Takahashi K. et al. The design and optimization of a series of 2-(pyridin-2-yl)-1H-benzimidazole compounds as allosteric glucokinase activators //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2009. – T. 17. – №. 19. – C. 7042-7051.

179. Thakare P. B., Ansari A. J. Synthesis and antiulcer, antisecretory activity of some new substituted 2-(Pyrimidinyl Sulfinyl) benzimidazole derivatives //International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. – 2011. – T. 2. – №. 2. – C. 695-700.
180. Thakare P. B., Ansari A. J. Synthesis and antiulcer, antisecretory activity of some new substituted 2-(Pyrimidinyl Sulfinyl) benzimidazole derivatives //International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. – 2011. – T. 2. – №. 2. – C. 695-700.
181. Thomas M. C., Forbes J. M., Cooper M. E. Advanced glycation end products and diabetic nephropathy //American journal of therapeutics. – 2005. – T. 12. – №. 6. – C. 562-572.
182. Thompson A., Kanamarlapudi V. Type 2 diabetes mellitus and glucagon like peptide-1 receptor signalling //Clin Exp Pharmacol. – 2013. – T. 3. – №. 138. – C. 2161-1459.1000138.
183. Tikhonova I. G. et al. CoMFA and homology-based models of the glycine binding site of N-methyl-d-aspartate receptor //Journal of medicinal chemistry. – 2003. – T. 46. – №. 9. – C. 1609-1616.
184. Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading //Journal of computational chemistry. – 2010. – T. 31. – №. 2. – C. 455-461.
185. Vasan S., Foiles P., Founds H. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product–protein crosslinks //Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2003. – T. 419. – №. 1. – C. 89-96.
186. Vassiliev P. M. et al. Consensus DPYg Design Using IT Microcosm //Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine. – Springer Netherlands, 2014. – C. 369-431
187. Veber D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of dPYg candidates //Journal of medicinal chemistry. – 2002. – T. 45. – №. 12. – C. 2615-2623.

188. Vinodkumar R. et al. Synthesis, anti-bacterial, anti-asthmatic and anti-diabetic activities of novel N-substituted-2-(4-phenylethynyl-phenyl)-1H-benzimidazoles and N-substituted 2-[4-(4,4-dimethyl-thiochroman-6-yl-ethynyl)-phenyl]-1H-benzimidazoles //European journal of medicinal chemistry. – 2008. – T. 43. – №. 5. – C. 986-995.
189. Viswanadhan V. N. et al. Atomic physicochemical parameters for three dimensional stPYcture directed quantitative stPYcture—activity relationships. IV: Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics //Journal of Chemical Information and Computer Sciences. – 1989. – T. 29. – №. 3. – C. 163-172.
190. Wallace M. B. et al. StPYcture-based design and synthesis of benzimidazole derivatives as dipeptidyl peptidase IV inhibitors //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2008. – T. 18. – №. 7. – C. 2362-2367.
191. Waly M. A., Abou Dohara M. I. Syntheses and Characterization of the Pyrimido [1, 2-a][1, 3, 5] triazinthione as a New Ring System and Antibacterial Agent //Polish journal of chemistry. – 2009. – T. 83. – №. 9. – C. 1601-1607.
192. Welsch M. E., Snyder S. A., Stockwell B. R. Privileged scaffolds for library design and dPYg discovery //Current opinion in chemical biology. – 2010. – T. 14. – №. 3. – C. 347-361.
193. Wildman S. A., Crippen G. M. Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions //Journal of chemical information and computer sciences. – 1999. – T. 39. – №. 5. – C. 868-873.
194. Wilkinson-Berka J. L. et al. ALT-946 and aminoguanidine, inhibitors of advanced glycation, improve severe nephropathy in the diabetic transgenic (mREN-2) 27 rat //Diabetes. – 2002. – T. 51. – №. 11. – C. 3283-3289.
195. Woodgett J. R. Physiological roles of glycogen synthase kinase-3: potential as a therapeutic target for diabetes and other disorders //Current DPYg Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders. – 2003. – T. 3. – №. 4. – C. 281-290.

196. Wu C. et al. Reduction of hepatic glucose production as a therapeutic target in the treatment of diabetes //Current DPYg Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders. – 2005. – Т. 5. – №. 1. – С. 51-59.
197. Yonemura Y. et al. Amelioration of diabetes mellitus in partially depancreatized rats by poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors: evidence of islet B-cell regeneration //Diabetes. – 1984. – Т. 33. – №. 4. – С. 401-404.
198. Zhou S. S. et al. Nicotinamide overload may play a role in the development of type 2 diabetes //World J Gastroenterol. – 2009. – Т. 15. – №. 45. – С. 5674-5684.
199. Абусуев С. А. Дедов ИИ, Шестакова МВ «Диабетическая нефропатия» Москва, «Универсум Паблишинг», 2000 г., 240 с //Сахарный диабет. – 2000. – №. 3.
200. Александров А. А. Метформин и сердечно сосудистые осложнения сахарного диабета //Русский мед. журнал. – 2008. – Т. 16. – №. 11. – С. 1544.
201. Александровский Я. А. Сахарный диабет //Эксперименты и гипотезы/ЯА Александровский. – 2005.
202. Аметов А. С. Регуляция секреции инсулина в норме и при сахарном диабете 2 типа: роль инкретинов //РМЖ. – 2006. – Т. 14. – С. 26.
203. Аметов А. С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения //М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2012. – Т. 704.
204. Аметов А. С. Сахарный диабет и сердечно-сосудистые заболевания //Человек и Лекарство – 2014. – С. 52.
205. Аметов А. С., Бращенкова А. В. Роль и место инкретинов в достижении всестороннего гликемического контроля //Русский медицинский журнал. – 2011. – Т. 19. – №. 27.
206. Аметов А. С., Дедов И. И. Эндокринология–вчера, сегодня, завтра //Русский медицинский журнал. – 2005. – Т. 13. – №. 6. – С. 230.

207. Аметов А. С., Карпова Е. В. Инкретиномиметики-новый этап в лечении сахарного диабета 2-го типа //Русский медицинский журнал. – 2010. – Т. 18. – №. 23.
208. Аметов А. С., Карпова Е. В. Новая возможность достижения цели лечения пациентов с сахарным диабетом 2 типа //Русский медицинский журнал. – 2008. – Т. 28. – С. 1854-7.
209. Аметов А. С., Карпова Е. В. Эффективное и безопасное управление сахарным диабетом 2 типа при помощи ингибиторов ДПП-4 //Сахарный диабет. – 2010. – №. 2.
210. Андреева Е. И., Унанова И. А., Андреева Е. А. Инкретиномиметики: взгляд на эффективность и безопасность //Международный научно-исследовательский журнал. – 2014.
211. Анисимова В. А. и др. Синтез и биологическая активность 9-диалкиламиноэтил-2-окси (диокси) фенилимидазо [1, 2-а] бензимидазола //Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – Т. 40. – №. 10. – С. 3-10.
212. Анисимова В. А. и др. Синтез и биологическая активность N-ацилметилзамещенных 9Н-2, 3-дигидроимидазоИ 10Н-2, 3, 4, 10-тетрагидропиримидо [1, 2-а] бензимидазолов и продуктов их восстановления //Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – Т. 40. – №. 5. – С. 27-33.
213. Анисимова В. А. и др. Синтез и фармакологическая активность 10-алкиламиноэтил-2, 3, 4, 10-тетрагидропиримидо [1, 2-а] бензимидазолов //Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 46. – №. 6. – С. 3-8.
214. Анисимова В. А. и др. Синтез и фармакологическая активность 2и 3-(аминометил) имидазо [1, 2-а] бензимидазолов //Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38. – №. 10. – С. 16-19.
215. Анисимова В. А. и др. Синтез и фармакологическая активность 3-(ароил) и 3-(гетароил) имидазо [1, 2-а] бензимидазолов //Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т. 36. – №. 12. – С. 3-8.

216. Анисимова В. А. и др. Синтез и фармакологическая активность 3-(ароил) и 3-(гетароил) имидазо [1, 2-а] бензимидазолов //Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т. 36. – №. 12. – С. 3-8.
217. Анисимова В. А. и др. Синтез и фармакологическая активность 3-(ароил) и 3-(гетароил) имидазо [1, 2-а] бензимидазолов //Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т. 36. – №. 12. – С. 3-8.
218. Анисимова В. А. и др. Синтез и фармакологическая активность 9-R-2-галогенфенилимидазо [1, 2-а] бензимидазолов //Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 44. – №. 7. – С. 7-13.
219. Анисимова В. А. и др. Синтез и фармакологическая активность амидов 2, 3-дигидроимидазои 2, 3, 4, 10-тетрагидропиримидо [1, 2-а]-бензимидазолил-N-уксусных кислот //Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т. 46. – №. 11. – С. 15-20.
220. Анисимова В. А. и др. Синтез и фармакологическая активность ароилметилзамещенных трициклических бензимидазольных систем, содержащих гидроксигруппы в ароильном радикале //Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 41. – №. 3. – С. 9-13.
221. Анисимова В. А. и др. Синтез и фармакологическая активность хлоридов 3-(N, N-дизамещенных) ацетамидов-1-R-2-аминобензимидазолия //Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 46. – №. 9. – С. 6-10.
222. Анисимова В. А. и др. Синтез и фармакологическая активность хлоридов 3-(N, N-дизамещенных) ацетамидов-1-R-2-аминобензимидазолия //Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 46. – №. 9. – С. 6-10.
223. Анисимова В. А., Спасов А. А., Толпыгин И. Е. с соавт. Синтез и фармакологическая активность 1-диалкил (алкил) аминоэтил-2, 3-дигидроимидазо [1, 2-а] бензимидазолов //Хим.-фарм. журн. – 2010. – Т. 44. – №. 5. – С. 8-12.
224. Анциферов М. Б., Дорофеева Л. Г. Инкретиномиметики в терапии сахарного диабета 2-го типа //Леч. врач. – 2009. – №. 3. – С. 14-21.

225. Анциферов М. Б., Дорофеева Л. Г. Перспективы применения первого аналога человеческого глюкагоноподобного пептида-1, лираглутида, в терапии пациентов с сахарным диабетом типа 2 //Фарматека. – 2009. – №. 3. – С. 7-23.
226. Балаболкин М. И. Инсулинорезистентность и ее значение в патогенезе нарушений углеводного обмена и сахарного диабета типа 2 //Сахарный диабет. – 2002. – №. 1.
227. Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Креминская В. М. Влияние метформина на показатели перекисного окисления липидов у больных сахарным диабетом 2 типа //Клин, фармакол. и терапия. – 2001. – №. 4-С. – С. 89-90.
228. Балаболкин М. И., Креминская В. М. Эффективность и место сиофора (метформина) в терапии сахарного диабета 2 типа //Сахарный диабет. – 2001. – №. 1.
229. Барлоу Р. Введение в химическую фармакологию //М.: Издатинлит. – 1959. – С. 54.
230. Бацанов С. С. Структурная рефрактометрия. – 1976.
231. Бернштейн Л. М. Антидиабетический бигуанид метформин и онкологическая заболеваемость //Сахарный диабет. – 2010. – Т. 3. – С. 45-48.
232. Благосклонная Я. В., Бабенко А. Ю., Красильникова Е. И. Сахарный диабет типа II (инсулиннезависимый) //Новые Санкт-Петербургские врачебные ведомости. – 2001. – №. 3. – С. 17-23.
233. Буркерт У., Эллинджер Н. Л. Молекулярная механика: Пер. с англ. – Мир, 1986.
234. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН, 2011, № 1 (77), часть 2
235. В.А.Анисимова, М.В.Левченко, Г.В.Ковалев, А.А.Спасов, Г.П.Дудченко, С.Г.Антонян, Н.В.Бессуднова, Р.Е.Либинзон. Синтез и фармакологическая активность некоторых 2,3-дигидроимидазо[1,2-

- а]бензимидазолов и промежуточных продуктов их синтеза. Химико-фармацевтический журнал. Том 21, стр.313-319. М-«Медицина»-1987.
236. Васильев П. М. и др. Компьютерный прогноз и экспериментальная проверка антиоксидантной активности новых химических соединений с использованием QSAR-зависимостей //Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2005. – №. 2 (14).
237. Васильев П. М. и др. Подструктурный анализ гипогликемической активности производных циклических гуанидинов //Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – №. 3 (51).
238. Васильев П. М., Спасов А. А. Применение компьютерной информационной технологии для прогноза фармакологической активности структурно разнородных химических соединений //Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2005. – №. 1 (13).
239. Васильев П. М., Спасов А. А. Языки фрагментарного кодирования структуры соединений для компьютерного прогноза биологической активности //Российский химический журнал. – 2006. – Т. 50. – №. 2. – С. 108-127.
240. Васильев П.М., Кочетков А.Н. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ ИТ «Микрокосм» № 2011618547 от 31.10.2011. – М., Российское агентство по патентам и товарным знакам (Роспатент).
241. Верткин А. Л. и др. Место метаболического синдрома в сердечно-сосудистом континууме //Лечащий врач. – 2008. – №. 3. – С. 71-74.
242. Волчегорский И. А. и др. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма //Челябинск. – 2000. – Т. 167.

243. Воронкова М.П. Противодиабетические свойства гимневоых кислот// диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук/ГОУ ВПО ВолгГМУ, Волгоград, 2009.
244. Гальберштам Н. М. и др. Нейронные сети как метод поиска зависимостей структура-свойство органических соединений //Успехи химии. – 2003. – Т. 72. – №. 7. – С. 706-727.
245. Гальберштам Н. М. и др. Нейронные сети как метод поиска зависимостей структура-свойство органических соединений //Успехи химии. – 2003. – Т. 72. – №. 7. – С. 706-727.
246. Гиляровский С. Р., Кузьмина И. М. Современная тактика снижения риска развития осложнений сердечно-сосудистых заболеваний с помощью применения метформина //Лечащий врач. – 2010. – №. 4. – С. 92-94.
247. Глориозова Т. А. и др. Тестирование компьютерной системы предсказания спектра биологической активности PASS на выборке новых химических соединений //Химико фармацевтический журнал. – 1998. – №. 12. – С. 33.
248. Голендер В. Е., Розенблит А. Б. Вычислительные методы конструирования лекарств. – Зинатне, 1978.
249. Горелик А. Л. Методы распознавания: учеб. пособие для студентов вузов, обучающихся по специальности" Автоматизир. системы обраб. информации и упр." направления подгот. дипломир. специалистов" Информатика и вычисл. техника" //М.: Высшая школа. – 2004.
250. Гурьева И. В. Общее руководство Международной Диабетической Федерации по сахарному диабету 2 типа (краткое изложение) //Сахарный диабет. – 2007. – №. 4.
251. Дедов И. И. и др. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Под редакцией ИИ Дедова, МВ Шестаковой (7-й выпуск) //Сахарный диабет. – 2015. – Т. 18. – №. 1S.

252. Дедов И. И. и др. Инициация и интенсификация сахароснижающей терапии у больных сахарным диабетом 2 типа: обновление консенсуса совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов (2015 г.) //Сахарный диабет. – 2015. – Т. 18. – №. 1.
253. Дедов И. И. и др. Инициация и интенсификация сахароснижающей терапии у больных сахарным диабетом 2 типа: обновление консенсуса совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов (2015 г.) //Сахарный диабет. – 2015. – Т. 18. – №. 1.
254. Дедов И. И. и др. Инициация и интенсификация сахароснижающей терапии у больных сахарным диабетом 2 типа: обновление консенсуса совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов (2015 г.) //Сахарный диабет. – 2015. – Т. 18. – №. 1.
255. Дедов И. И. и др. Консенсус совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов по инициации и интенсификации сахароснижающей терапии у больных сахарным диабетом 2 типа //Сахарный диабет. – 2011. – №. 4.
256. Дедов И. И. и др. Консенсус совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов по инициации и интенсификации сахароснижающей терапии у больных сахарным диабетом 2 типа //Сахарный диабет. – 2011. – №. 4.
257. Дедов И. И. и др. Материалы IV Всероссийского диабетологического конгресса //Москва. – 2008. – С. 35-36.
258. Дедов И. И. и др. Результаты реализации подпрограммы «Сахарный диабет» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями 2007–2012 годы» //Сахарный диабет. – 2013. – №. 2S.

259. Дедов И. И. и др. Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика //М.: ООО Изд-во «Медицинское информационное агентство. – 2011.
260. Дедов И. И. и др. Состояние инсулинорезистентности в эволюции сахарного диабета 2 типа. – 2009.
261. Дедов И. И. и др. Фармакоэкономическая оценка терапии пациентов с сахарным диабетом 2 типа на базе ФГБУ Эндокринологический научный центр //Сахарный диабет. – 2012. – Т. 3. – С. 101-109.
262. Дедов И. И. и др. Фармакоэкономическое моделирование отдаленных результатов лечения сахарного диабета 2 типа у пациентов, получавших современные аналоги инсулина по сравнению с терапией пероральными сахароснижающими препаратами //Сахарный диабет. – 2010. – №. 1.
263. Дедов И. И., Петеркова В. А., Кураева Т. Л. Российский консенсус по терапии сахарного диабета у детей и подростков //Сахарный диабет. – 2010. – №. 5.
264. Дедов И. И., Шестакова М. В. Сахарный диабет: острые и хронические осложнения //М.: МИА. – 2011. – Т. 1. – С. 350.
265. Дедов И. И., Шестакова М. В., Сунцов Ю. И. Сахарный диабет в России: проблемы и решения //М.-2008.-14 с. – 2008.
266. Демидова И. Ю., Глинкина И. В., Перфилова А. Н. Сахарный диабет 2 типа: патогенез и лечение //Врач. – 2000. – №. 1. – С. 16-19.
267. Демидова И. Ю., Игнатова Н., Рейдис И. Метформин (сиофор): механизм действия и клиническое применение //Клиническая эндокринология. – 1998. – Т. 1. – С. 3-27.
268. Демидова И. Ю., Чазова Т. Е. Использование ингибиторов альфа-глюкозидаз для профилактики сахарного диабета 2 у лиц с нарушенной толерантностью к глюкозе //Фарматека. – 2003. – Т. 10. – №. 3. – С. 26-30.
269. Демидова Т. Ю., Аметов А. С. Патогенез инсулиннезависимого сахарного диабета //Рус. мед. жури. – 1998. – Т. 6. – №. 12. – С. 84-88.

270. Дрейпер Н., Смит Г. Прикладной регрессионный анализ //М.: Издательский дом «Вильямс». – 2007. – Т. 70.
271. Дудченко Г.П. и др. Создание гипогликемических препаратов с антиагрегантными свойствами на основе конденсированных производных бензимидазола // Вестник Волгоградской медицинской академии. - 1995. - №. 1. - С. 33-36.
272. Дудченко Г.П.и др. Влияние препарата диабенол на секрецию инсулина // Вестник Волгоградской медицинской академии. - 2000. - №. 6. - С. 46-49.
273. Зефирова О. Н., Зефиров Н. С. Медицинская химия (medicinal chemistry). II. Методологические основы создания лекарственных препаратов //Вестн. Моск. ун-та. Сер. – 2000. – Т. 2. – С. 103-108.
274. Зилов А. В., Моргунова Т. Б., Терехова А. Л. Частота гипогликемий и сердечно-сосудистых нарушений на фоне терапии препаратами сульфонилмочевины по сравнению с другими секретогогами: систематический обзор //Сахарный диабет. – 2010. – №. 2.
275. Ингибиторы обратной транскриптазы, скрининг виртуальный, and молекулярные поля непрерывные. "одноклассовый подход: модели для виртуального скрининга нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы вич-1 на основе концепции непрерывных молекулярных полей //Известия академии наук. – 2011. – №. 11. – С. 2371.
276. Инчина В. И. и др. Некоторые фармакологические эффекты производного 3-оксипиридина и бензимидазола на фоне экспериментального диабета и экзогенной гиперхолестеринемии //Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2011. – №. 1.
277. Инчина В. И. и др. Некоторые фармакологические эффекты производного 3-оксипиридина и бензимидазола на фоне экспериментального диабета и экзогенной гиперхолестеринемии //Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. –

2011. – №. 1.

278. Иоффе Б. В. Рефрактометрические методы химии. – 1983.
279. Карпов Ю. А., Шубина А. Т. Метформин как средство патогенетической терапии больных с метаболическим синдромом и сахарным диабетом второго типа //Русский медицинский журнал. – 2010. – №. 12. – С. 1312-1320.
280. Киякбаев Г. К., Шелепин А. А. Эндокринология для кардиолога //М.: РУДН. – 2005.
281. Кларк Т. Компьютерная химия. – 1990.
282. Комиссаров И. В. Элементы теории рецепторов в молекулярной фармакологии. М //Медицина. – 1969. – Т. 69.
283. Корн Г., Корн Т. Справочник по математике для научных работников и инженеров. – 1973.
284. Косолапов в. А. И др. Антиоксидантные свойства производного пирролобензимидазола--соединения ру-792--в эксперименте //бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – т. 155. – №. 4. – с. 453-456.
285. Ленская К. В., Спасов А. А., Чепляева Н. И. Инновационные направления поиска лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета типа 2 //Вестник волгоградского государственного медицинского университета. – 2011. – №. 4 (40).
286. Лукьянчиков В. С., Зверева И. В. Патогенез и профилактика сосудистых осложнений при метаболическом синдроме и сахарном диабете 2 типа //Русский медицинский журнал. – 2009. – Т. 17. – №. 10.
287. Майоров А. Ю. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом 2011 г.: основные изменения //ФАРМАТЕКА. – 2006. – №. 11.

288. Минкин В. И., Симкин Б. Я., Миняев Р. М. Теория строения молекул. – М. : Феникс, 1997.
289. Мкртумян А. М. и др. Параметры эндотелиальной функции инсулинорезистентности больных метаболическим синдромом до и после снижения массы тела //Ожирение и метаболизм. – 2008. – №. 1.
290. Мкртумян А. М. Патофизиологический подход в лечении сахарного диабета 2 типа //Лечащий врач. – 2008. – Т. 3. – С. 92-5.
291. Молитвослова Н. А., Никонова Т. В. Сахарный диабет 2 типа, склонный к кетозу //Сахарный диабет. – 2009. – №. 3.
292. Недогода С. В. Нефропротекция при сахарном диабете 2 типа: Уроки исследования ADVANCE. - 2011.
293. Недосугова Л. В. и др. Влияние метформина на выраженность окислительного стресса у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа //Проблемы эндокринологии. – 2007. – Т. 53. – №. 1. – С. 1-7.
294. Недосугова Л. В. Новые подходы к терапии сахарного диабета 2 типа //Русский медицинский журнал. – 2006. – Т. 14. – №. 13. – С. 989-994.
295. Недосугова Л. В. Современная стратегия сахароснижающей терапии при сахарном диабете типа 2: роль и место комбинированной терапии //Русский медицинский журнал. – 2013. – Т. 21. – №. 12.
296. Общеввропейский патент Nouveaux derives du benzimidazole, leur procede de preparation et les composition pharmaceutiques qui les contiennent // №93401204.8 (приоритет 14 июля 1993 (соавт. В.А. Анисимова, А.А. Спасов).
297. Папулов Ю. Г., Папулов Р. Ю., Чулкова Л. В. История химии: область науки и учебная дисциплина //М. Изд-во МГУ. – 2001. – С. 227-233.
298. Патрик, Э. Основы теории распознавания образов / Э. Патрик; пер. с англ.; под ред. Б. Р. Левина. – М.: Сов. радио, 1980. – 408 с.
299. Петров В. И., Рогова Н. В., Михайлова Д. О. Фармакоэкономический анализ эффективности комплексной терапии больных с сахарным диабетом

- 2-го типа //Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2010. – №. 1 (33).
300. Подачина С. В. Постпрандиальная гликемия и сердечно-сосудистые заболевания у больных сахарным диабетом 2 типа //эффективная фармакотерапия. – 2015. – №. 17. – С. 24-27.
301. Полторак В. В. и др. Международный эндокринологический журнал 5 (37) 2011.
302. Полторак В. В., Горбенко Н. И., Сакало Е. А. Профилактика сахарного диабета 1 типа: патофизиологическое обоснование, стратегия и клиническая реализация //Український медичний часопис. – 1970.
303. Поройков В. В. и др. Компьютерное прогнозирование биологической активности природных соединений и их производных //Современные аспекты химии гетероциклов/Под. ред. ВГ Карцева.—М.: МБФНП. – 2010. – С. 142-148.
304. Поройков В. В. и др. Лекарства, действующие на несколько молекулярных мишеней в организме: возможности компьютерного прогнозирования //Психофармакология и биологическая наркология. – 2009. – Т. 7. – №. 4. – С. 2-1905–2-1905.
305. Поройков В. В. и др. Оптимизация синтеза и фармакологического исследования веществ на основе компьютерного прогнозирования их спектров биологической активности //Хим.-фармац. журнал.-1996.-Т30. – 1996. – №. 9. – С. 20-23.
306. Поройков В. В., Филимонов Д. А. Компьютерный прогноз биологической активности химических соединений как основа для поиска и оптимизации базовых структур новых лекарств //Азотистые гетероциклы и алкалоиды.— М.: Иридиум-пресс. – 2001. – Т. 1. – С. 123-129.
307. Рогова Н. В., Бутранова О. И. Фармакоэпидемиологическое исследование терапии сахарного диабета типа 2 в лечебных учреждениях г. Волгограда //Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2007. – №. 4 (24).

308. Рожкова Н. Ю. и др. Диабенол-новое противодиабетическое лекарственное средство //Пермский медицинский журнал. – 2006. – Т. 23. – №. 6.
309. Романцова Т. И. Ингибитор дипептидилпептидазы-IV ситаглиптин: новые возможности терапии сахарного диабета 2 типа //Ожирение и метаболизм. – 2006. – №. 4.
310. Рудой А. С., Черныш О. В. Метаболический синдром: современный взгляд на проблему. – 2016.
311. Рудой А. С., Черныш О. В., Пашкевич П. П. Особенности лечения сахарного диабета типа 2. – 2016.
312. Сабанов В. И., Дьяченко Т. С., Бердник Е. Ю. Эпидемиология сахарного диабета II типа в Волгоградской области //Вестник Росздравнадзора. – 2012. – №. 2.
313. Саприна Т. В. и др. Эффективность аналогов глюкагоноподобного пептида 1 экзенатида для достижения метаболического контроля и коррекции массы тела у пациентов с сахарным диабетом типа 2 //Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – Т. 10. – №. 6.
314. Свеклина Т. С., Таланцева М. С., Барсуков А. В. Метаболический синдром и воспаление: актуальные вопросы патогенеза //Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – №. 3.
315. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2011618547. ИТ «Микрокосм» / Васильев П.М., Кочетков А.Н. (Россия). – № 201616643; заявл. 02.09.2011; зарег. 31.10.2011; опубл. 20.03.2012, Официальный бюллетень «Программы для ЭВМ. БД. ТИМС», № 1(78), 2012, с. 209.
316. Симонов А. М., Анисимова В. А., Борисова Т. А. Исследование в области производных имидазо-[1, 2-а] бензимидазола VI*. Получение производных имидазо [1, 2-а] бензимидазола из 1-алкил-, 1-аралкил-2-

- иминобензимидазолин-3-уксусных кислот и их эфиров //Химия гетероциклических соединений. – 1973. – №. 1. – С. 111-114.
317. Смирнова О. М. Комбинированная терапия сахарного диабета типа 2 //Проблемы эндокринологии. – 2005. – Т. 51. – №. 3. – С. 7-10.
318. Соколов, Ю.А. Прогнозирование биологической активности соединений с использованием квантово-химических методов / Ю.А. Соколов. – Минск: Белорусская наука, 2008. – 311 с.
319. Спасов А. А. и др. Антисеротониновая активность производных трициклических бензимидазольных систем //Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – Т. 40. – №. 11. – С. 23-26.
320. Спасов А. А. и др. Антитромботическая активность гипогликемических средств // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2011. – Т. 10. – №. 2. – С. 95-98.
321. Спасов А. А. и др. Гистаминовые рецепторы (молекулярно-биологические и фармакологические аспекты) //АА Спасов, МВ Черников, ПМ Васильев [и др.]-Волгоград: ВолГМУ. – 2007.
322. Спасов А. А. и др. Материалы IV Всероссийского диабетологического конгресса //Москва. – 2008. – С. 336.
323. Спасов А. А. и др. Спектр фармакологической активности и токсикологические свойства производных бензимидазола //Химико-фармацевтический журнал. – 1999. – Т. 33. – №. 5. – С. 6-17.
324. Спасов А. А. и др. Спектр фармакологической активности и токсикологические свойства производных бензимидазола //Химико-фармацевтический журнал. – 1999. – Т. 33. – №. 5. – С. 6-17.
325. Спасов А. А. и др. Фундаментальные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа //Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – Т. 68. – №. 2.

326. Спасов А. А., Ленская К. В., Васильев П. М. Гипогликемический потенциал производных бензимидазола //Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49. – №. 8. – С. 3-7.
327. Спасов А. А., Самохина М. П., Буланов А. Е. Антидиабетогенные свойства гимнемы лесной (обзор) //Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 42. – №. 11. – С. 22-26.
328. Стаценко М. Е. и др. этиология, патогенез, клиника, дифференциальный диагноз, принципы лечения. – 2002.
329. Строков И. А., Строков К. И., Солуянова Т. В. От тиамин к бенфотиамину: современные подходы к лечению диабетической полиневропатии //Фарматека. – 2006. – Т. 122. – №. 7.
330. Сунцов Ю. И. Современные сахароснижающие препараты, используемые в России при лечении сахарного диабета 2 типа //Сахарный диабет. – 2012. – №. 1.
331. Ткачук В. А., Воротников А. В. Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину //Сахарный диабет. – 2014. – №. 2.
332. Тюренков И. Н. и др. Десять новых мишеней для разработки лекарственных средств для лечения сахарного диабета 2 типа и метаболического синдрома //Сахарный диабет. – 2015. – Т. 18. – №. 1.
333. Тюренков И. Н. и др. Десять новых мишеней для разработки лекарственных средств для лечения сахарного диабета 2 типа и метаболического синдрома //Сахарный диабет. – 2015. – Т. 18. – №. 1.
334. Филимонов Д. А., Лагунин А. А., Поройков В. В. Компьютерная оценка свойств химических соединений с использованием неполной эмпирической информации. – 1998.
335. Филимонов Д. А., Поройков В. В. Прогноз спектра биологической активности органических соединений //Российский химический журнал. – 2006. – Т. 50. – №. 2. – С. 66-75.

336. Филимонов Д. А., Поройков В. В., Караичева Е. И. Компьютерное прогнозирование спектра биологической активности соединений по их структурной формуле: система PASS //Эксперим. клинич. фармакология. – 1995. – Т. 58. – №. 2. – С. 56.
337. Филимонов Д.А., Поройков В.В., Глориезова Т.А., Лагунин А.А. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ PASS № 2006613275 от 15.09.2006. – М., Российское агентство по патентам и товарным знакам (Роспатент).
338. Хиллсон Р. Практика лечения диабета //Р. Хиллсон. М.: Олимп-Бизнес.- 2000.-342 с. – 2000.
339. Чепурнова М.В., М.П. Воронкова, Н.И.Чепляева. Комбинированная терапия сахарного типа 2 типа. Ж-л Вестник ВолгГМУ: приложение (Материалы II Всероссийского научно-практического семинара для молодых ученых «Методологические аспекты экспериментальной и клинической фармакологии») – стр. 26, 2010.
340. Шаймарданова Г. С., Камбург Р. А., Евстигнеева Р. П. Сергеева НВ Имидазол и его производные как биологически активные вещества //Химико-фармацевтический журнал. – 1992. – №. 3. – С. 31-37.
341. Шаймарданова Г. С., Камбург Р. А., Евстигнеева Р. П. Сергеева НВ Имидазол и его производные как биологически активные вещества //Химико-фармацевтический журнал. – 1992. – №. 3. – С. 31-37.
342. Шварц В. Применение ингибиторов дипептидилпептидазы-4 для лечения сахарного диабета 2-го типа //Пробл эндокринолог. – 2008. – Т. 54. – №. 4. – С. 39-45.
343. Шестакова Е. А., Галстян Г. Р. Ингибиторы дипептидилпептидазы-4: сравнительный анализ представителей группы //Проблемы эндокринологии. – 2012. – Т. 58. – №. 1.

344. Шестакова М. В., Викулова О. К. Современные возможности фармакотерапии сахарного диабета 2 типа при помощи аналогов глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) // Сахарный диабет. – 2007. – №. 1.
345. Шестакова М., Викулова О. Инновации в диагностике и лечении сахарного диабета типа 2 // Врач. – 2012. – Т. 8. – С. 2-6.

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

Кластерный анализ гипогликемической активности производных циклических гуанидинов

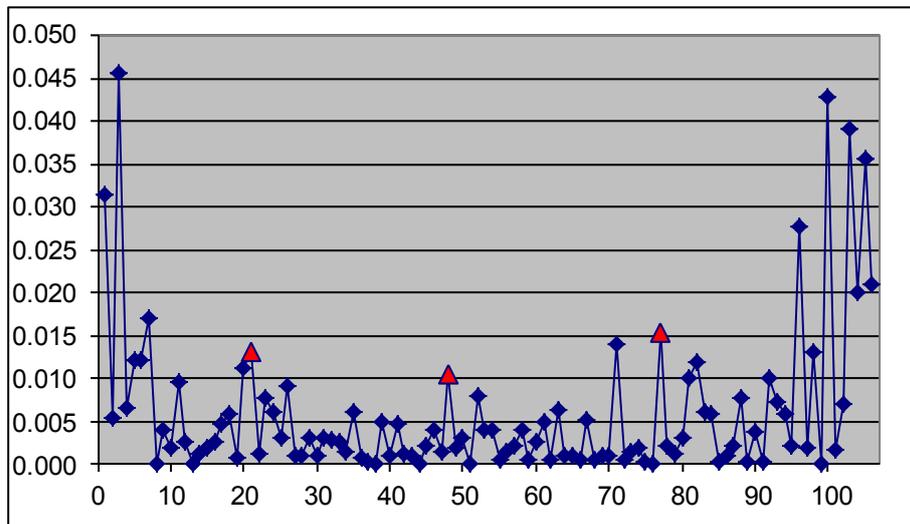
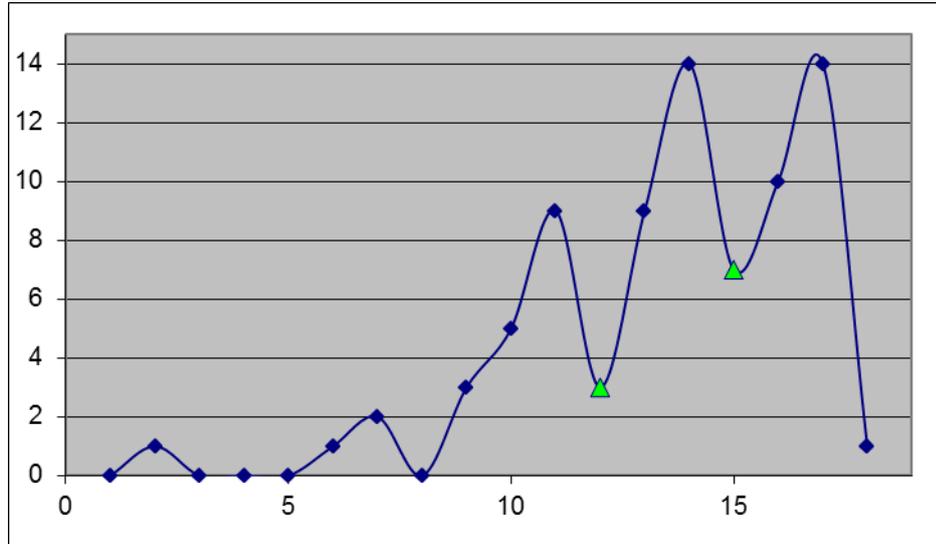
(все полные циклические гуанидины (полностью и частично встроенные))

Шифр	Индекс	Балл	D
РУ-0271	0.528	-2	
РУ-0254	0.636	-3	0.108
РУ-0504	0.667	-2	0.031
РУ-0663	0.672	-2	0.005
РУ-0854	0.718	-3	0.046
РУ-0252	0.725	-2	0.007
РУ-0871	0.737	-2	0.012
РУ-0860	0.749	-2	0.012
РУ-0255	0.766	-2	0.017
РУ-0284	0.766	-3	0.000
РУ-0669	0.770	-2	0.004
РУ-0559	0.772	-3	0.002
РУ-0553	0.781	-2	0.010
РУ-0017	0.784	-3	0.003
РУ-0322	0.784	-2	0.000
РУ-0662	0.785	-2	0.001
РУ-0671	0.787	-2	0.002
РУ-0873	0.789	-1	0.002
РУ-0840	0.794	-2	0.005
РУ-0668	0.800	-2	0.006
РУ-0552	0.801	-1	0.001
РУ-0863	0.812	1	0.011
РУ-0063	0.825	-2	0.013

PY-0321	0.826	-2	0.001
PY-0554	0.834	-2	0.008
PY-0013	0.840	-2	0.006
PY-0505	0.843	-2	0.003
PY-0506	0.852	-2	0.009
PY-0841	0.853	-2	0.001
PY-0665	0.854	-2	0.001
PY-0848	0.857	-2	0.003
PY-0502	0.858	-2	0.001
PY-0670	0.861	-2	0.003
PY-0672	0.864	0	0.003
PY-0659	0.867	1	0.003
PY-0507	0.868	-2	0.001
PY-0673	0.874	0	0.006
PY-0555	0.875	-1	0.001
PY-0517	0.875	-2	0.000
PY-0667	0.875	-2	0.000
PY-0304	0.880	-1	0.005
PY-0855	0.881	0	0.001
PY-0896	0.886	1	0.005
PY-0853	0.887	-2	0.001
PY-0550	0.888	-1	0.001
PY-0551	0.888	-1	0.000
PY-0451	0.890	-2	0.002
PY-0514	0.894	-1	0.004
PY-0664	0.896	-2	0.002
PY-0511	0.906	-1	0.010
PY-0693	0.908	-1	0.002
PY-0253	0.911	-2	0.003

PY-0283	0.911	-3	0.000
PY-0510	0.919	-1	0.008
PY-0512	0.923	-1	0.004
PY-0847	0.927	-1	0.004
PY-0309	0.928	-1	0.001
PY-0503	0.929	-1	0.001
PY-0837	0.931	-1	0.002
PY-0516	0.935	-1	0.004
PY-0890	0.935	1	0.000
PY-0295	0.938	0	0.003
PY-0513	0.943	0	0.005
PY-0690	0.944	-1	0.001
PY-0769	0.950	-1	0.006
PY-0851	0.951	-1	0.001
PY-0515	0.952	0	0.001
PY-0666	0.952	-2	0.000
PY-0661	0.957	2	0.005
PY-0597	0.958	1	0.001
PY-0852	0.959	0	0.001
PY-0509	0.960	0	0.001
PY-0856	0.974	0	0.014
PY-0256	0.975	-2	0.001
PY-0714	0.976	2	0.001
PY-0846	0.978	-1	0.002
PY-0694	0.978	0	0.000
PY-0692	0.978	0	0.000
PY-0320	0.994	-1	0.015
PY-0355	0.996	-1	0.002
PY-0850	0.997	0	0.001

PY-0660	1.000	1	0.003
PY-0770	1.010	0	0.010
PY-0865	1.022	0	0.012
PY-0859	1.028	1	0.006
PY-0691	1.034	0	0.006
PY-0874	1.034	1	0.000
PY-0876	1.035	1	0.001
PY-0898	1.037	1	0.002
PY-0620	1.045	1	0.008
PY-0864	1.045	-2	0.000
PY-0307	1.049	1	0.004
PY-0870	1.049	-3	0.000
PY-0857	1.059	1	0.010
PY-0310	1.066	-1	0.007
PY-0858	1.072	1	0.006
PY-0897	1.074	1	0.002
PY-0324	1.102	-2	0.028
PY-0302	1.104	-1	0.002
PY-0312	1.117	-1	0.013
PY-0314	1.117	-2	0.000
PY-0308	1.159	2	0.043
PY-0457	1.161	2	0.002
PY-0674	1.168	1	0.007
PY-0305	1.207	0	0.039
PY-0875	1.227	2	0.020
PY-0306	1.263	0	0.036
PY-0323	1.284	-1	0.021
PY-0862	1.340	3	0.056



Анализ перспективности классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" гипогликемической активности по выборке известных противодиабетических препаратов
(все циклические полные гуанидины (без пуринов))

Химический класс	Всего	Active	Active, %	Pa	Pna	z	Pr	Index
2-АмБИ -	86	52	60.5	0.6023	0.3977	2.6759	0.0037	4.0
2-ИмБИ	124	73	58.9	0.5873	0.4127	2.7402	0.0031	4.0
2-АмБИ+2-ИмБИ	210	125	59.5	0.5943	0.4057	3.8609	0.0001	5.0
N ¹ ,N ⁹ -ДгИмБИ	4	4	100.0	0.8333	0.1667	2.1651	0.0152	3.0
N ¹ ,N ⁹ -ИмБИ	2	1	50.0	0.5000	0.5000	-0.1768	0.5702	-0.2
N ¹ -ДгИмБИ	22	22	100.0	0.9583	0.0417	6.2787	0.0000	5.0
N ¹ -ИмБИ	121	55	45.5	0.4553	0.5447	1.3708	0.0852	-2.0
N ⁹ -ДгИмБИ	78	73	93.6	0.9250	0.0750	10.7122	0.0000	5.0
N ⁹ -ИмБИ	484	142	29.3	0.2942	0.7058	12.8140	0.0000	-5.0
ПрмБИ	87	60	69.0	0.6854	0.3146	4.9094	0.0000	5.0
ТрзиБИ	7	6	85.7	0.7778	0.2222	2.2392	0.0126	3.0
ТрзоБИ	20	10	50.0	0.5000	0.5000	-0.0754	0.5300	-0.2
Всего	1036							

Анализ перспективности классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" наличия гипогликемической активности по выборке

испытанных веществ этого класса

(все циклические полные гуанидины (без пуринов))

Chem Class	All	Active, e	Active, %	Pa	Pna	z	Pr	Index
BI 2-Amino-	86	13	15,1	0,159 1	0,8409	9,0077	0,000 0	-5,0
BI 2-Imino-	124	113	91,1	0,904 8	0,0952	12,819 3	0,000 0	5,0
BI 2- Amino(Imino)-	210	126	60,0	0,599 1	0,4009	4,0551	0,000 0	5,0
ImPerimid	1	1	100,0	0,666 7	0,3333	0,6124	0,270 1	0,2
N1,N9- Dihydro- ImBI	4	4	100,0	0,833 3	0,1667	2,1651	0,015 2	3,0
N1,N9-ImBI	2	2	100,0	0,750 0	0,2500	1,2374	0,108 0	1,0
N1-Dihydro- ImBI	22	14	63,6	0,625 0	0,3750	1,6599	0,048 5	3,0
N1-ImBI	121	113	93,4	0,926 8	0,0732	13,357 2	0,000 0	5,0
N9-Dihydro- ImBI	78	54	69,2	0,687 5	0,3125	4,7039	0,000 0	5,0
N9-ImBI	484	474	97,9	0,977 4	0,0226	29,749 6	0,000 0	5,0

PyrimBI	87	74	85,1	0,842	0,1573	9,1068	0,000	5,0
				7			0	
TriazinBI	7	5	71,4	0,666	0,3333	1,2964	0,097	2,0
				7			4	
TriazolBI	20	17	85,0	0,818	0,1818	4,1458	0,000	5,0
				2			0	
	10	884	85,3					
	36							

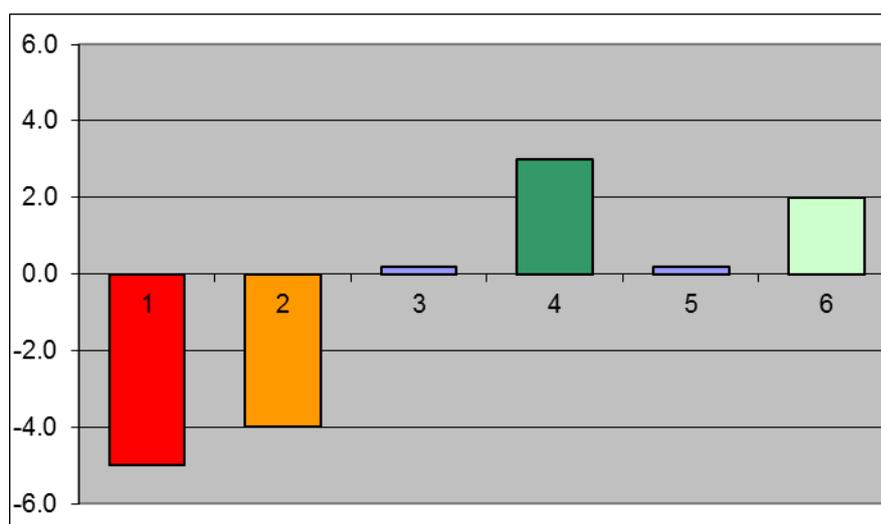
Анализ перспективности классов циклических полных гуанидинов по результатам прогноза в ИТ "Микрокосм" выраженной гипогликемической активности по выборке испытанных веществ этого класса
(все циклические полные гуанидины (без пуринов))

Chem Class	All	Active	Active, %	Pa	Pna	Po	z	Pr	Index
BI 2-Amino-	86	11	12,8	0,1364	0,8636	0,5000	4,7865	0,0000	-5,0
BI 2-Imino-	124	24	19,4	0,1984	0,8016	0,5000	4,7561	0,0000	-5,0
BI 2- Amino(Imino)-	210	35	16,7	0,1698	0,8302	0,5000	6,7747	0,0000	-5,0
ImPerimid	1	0	0,0	0,3333	0,6667	0,5000	0,2041	0,4191	-0,2
N1,N9-Dihydro- ImBI	4	4	100,0	0,8333	0,1667	0,5000	1,0104	0,1562	1,0
N1,N9-ImBI	2	2	100,0	0,7500	0,2500	0,5000	0,5303	0,2979	0,2
N1-Dihydro- ImBI	22	13	59,1	0,5833	0,4167	0,5000	0,5052	0,3067	0,2
N1-ImBI	121	27	22,3	0,2276	0,7724	0,5000	4,2399	0,0000	-5,0
N9-Dihydro- ImBI	78	55	70,5	0,7000	0,3000	0,5000	2,4903	0,0064	4,0
N9-ImBI	484	100	20,7	0,2078	0,7922	0,5000	9,0933	0,0000	-5,0
PyrimBI	87	69	79,3	0,7865	0,2135	0,5000	3,7851	0,0001	5,0
TriazinBI	7	2	28,6	0,3333	0,6667	0,5000	0,5893	0,2778	-0,2
TriazolBI	20 1036	1 308	5,0 29,7	0,0909	0,9091	0,5000	2,6382	0,0042	-4,0

Подструктурный анализ влияния типа ядра на высокую гипогликемическую
активность производных циклических гуанидинов

(все полные циклические гуанидины (полностью и частично встроенные))

110	11	22	3	36	8	30
	2- Amino- benzimi- dazole	N9- Imidazobenz- imidazole	N1- Imidazobenz- imidazole	N9-2,3- dihydro- Imidazobenz- imidazole	N1-2,3- dihydro- Imidazobenz- imidazole	Pyrimidoben- zimidazole
Ph	0,1125	0,3056	0,6068	0,5985	0,5558	0,5848
Pnh	0,8875	0,6944	0,3932	0,4015	0,4442	0,4152
Z	3,1497	2,3466	0,5757	1,7748	0,4087	1,3716
Pr	0,0008	0,0095	0,2824	0,0380	0,3414	0,0851
Индекс значим ости	-5,0	-4,0	0,2	3,0	0,2	2,0



Анализ перспективности классов циклических полных гуанидинов как источников веществ с гипогликемической активностью

(индексы информативности по данным эксперимента и по прогнозу)

№	Chem Class	PASS Active	MC Drugs Active	MC ImBI			Statistic			Average
				Active	High or Mod	High	SubAn	Mediane	Supremum	
1	BI 2-Amino-	-5	4	-5	-5	3	-5	-2	2	-1,63
2	BI 2-Imino-	5	4	5	-5	4	—	—	—	2,60
4	N1,N9- Dihydro-ImBI	-1	3	3	1	3	—	—	—	1,80
5	N1-Dihydro- ImBI	-3	5	3	0	0	0	2	3	1,25
6	N1-ImBI	5	-2	5	-5	1	0	—	—	0,67
7	N9-Dihydro- ImBI	5	5	5	4	1	3	1	4	3,50
8	N9-ImBI	5	-5	5	-5	4	-4	1	4	0,63
9	PyrimBI	5	5	5	5	4	2	2	3	3,88
10	TriazinBI	-2	3	2	0	0	—	—	—	0,60
11	TriazolBI	-3	0	5	-4	1	—	—	—	-0,20

Влияние производных имидазобензимидазола на уровень глюкозы в плазме крови интактных животных			
I. Производные 2-амино-бензимидазола			
№ п/п	Шифр	Балл, Изменение уровня глюкозы в крови крыс	
		4 часа	6 часов
1.	АЖИ - 1	0,64	0,83**
2.	АЖИ – 2	0,7	1,00
3.	АЖИ – 3	0,81	0,92
4.	АЖИ – 4	0,94	0,87
5.	АЖИ – 5	1,19	0,93**
6.	АЖИ – 6	1,15	1,06**
7.	АЖИ – 7	1,36*, **	1,07**
8.	АЖИ – 8	0,99	1,06
9.	АЖИ – 9	1,00	1,07**
10.	АЖИ – 10	0,91	1,12
11.	АЖИ – 11	0,91	0,96
12.	АЖИ – 12	0,83	0,93
13.	АЖИ – 13	1,06**	1,05
14.	АЖИ – 15	0,9*	0,86
15.	метформин	0,9	0,66**
16.	контроль	3,96	3,15
II. Производные 2-имино-бензимидазола			
17.	АЦИ-1	1,1**	0,86*, **
18.	АЦИ-2	1,06**	1,05
19.	АЦИ-3	1,03**	0,9*
20.	АЦИ-4	0,92**	0,99

21.	АЦИ-5	1,08**	0,76*
22.	АЦИ-6	0,95	0,9*, **
23.	АЦИ-7	1,06**	0,54*, **
24.	АЦИ-8	Гибель, 100%	
25.	АЦИ-9	0,81	0,9**
26.	АЦИ-10	0,95**	0,94**
27.	АЦИ-11	0,94**	0,62*, **
28.	АЦИ-12	0,75*	0,86**
29.	АЦИ-14	0,8*	0,82**
30.	АЦИ-15	0,99**	0,79*
31.	АЦИ-16	0,97**	1,03
32.	АЦИ-17	1,01**	0,94
33.	АЦИ-18	1,02**	1,09**
34.	метформин	0,9	0,66**
35.	контроль	3,96	3,15
III. Производные N9-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола			
36.	РУ - 0254	0,81**, *	0,75*
37.	РУ - 1180	0,96**	1,12
38.	РУ - 1213	0,93**, *	0,9**
39.	РУ - 1217	0,76	1,26*
40.	РУ - 1219	0,91**, *	0,88**, *
41.	РУ - 1221	0,7*	1,00
42.	РУ - 1293	0,95**	0,73**, *
43.	РУ - 1294	1,1**, *	0,91
44.	РУ - 1295	0,86**	1,05
45.	РУ - 1297	0,96**	0,89**

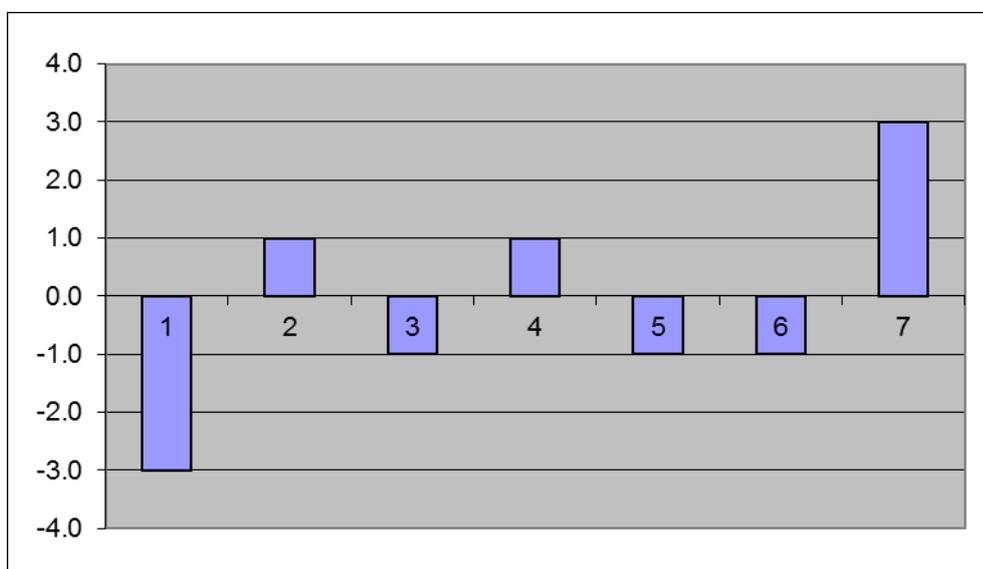
46.	РУ - 1299	1,13**	1,09**
47.	РУ - 1301	1,13**, *	1,08**, *
48.	РУ - 1303	0,96**	1,09**
49.	РУ - 1309	гибель, 100%	
50.	РУ - 1311	1,1**, *	1,08**, *
51.	РУ - 1312	1,27**, *	1,18**, *
52.	РУ - 1316	0,7*	0,88**
53.	РУ - 1317	0,85**, *	0,99**
54.	РУ - 0623	0,78**	0,94
55.	РУ - 0634	0,96**	0,86
56.	РУ - 0770	1,06**	0,91*
57.	РУ - 0769	0,97**	0,88
58.	РУ - 0856	0,86	0,94
59.	РУ - 0855	0,96**	0,87*
60.	РУ - 0887	0,77	0,78**, *
61.	метформин	0,75*	0,68
62.	контроль	4,13	4,23
IV. Производные 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола			
63.	РФ-101	0,96**	0,88
64.	РФ-102	0,98**	0,73
65.	РФ-103	0,95**	0,81
66.	РФ-104	0,87	1,04
67.	РФ-105	0,89**	0,84*
68.	РУ -669	1,04**	0,93
69.	РУ -853	0,91	0,89
70.	РУ -1144	0,75	0,63**
71.	РУ -1214	0,89**,*	1,04**,*

72.	РУ -1216	0,95*** *	0,84*** *
73.	РУ -1218	0,98*** *	1,11*** *
74.	РУ -1220	0,67	0,82**
75.	РУ -1222	0,75**	0,96**
76.	РУ -1224	0,73	0,89**
77.	РУ -1298	1,09**	0,92**
78.	РУ -1300	0,99**	1,18**
79.	РУ -1302	0,96**	0,89**
80.	РУ -1304	1,00**	1,1**
81.	РУ -1308	0,97**	1,06**
82.	РУ -1310	гибель, 100%	
83.	РУ -1314	0,93**	0,67*
84.	РУ -1315	0,95**	0,83
85.	РУ -1318	0,88*** *	0,93**
86.	метформин	2,89	3,87
87.	интактные	3,94	3,99
V. Производные N1-имидазо[1,2-а]бензимидазола			
88.	РУ-270	1,13	1,14**
89.	РУ-271	1,1*	1,08**
90.	РУ-355	0,87	1,14**
91.	метформин	3,01	3,64
92.	интактные	3,44	3,67
VI. Производные N1-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола			
93.	РУ-504	1,13**	0,98**
94.	РУ-505	1,03	0,98**

95.	РУ-506	0,94**	0,88**
96.	РУ-508	0,98**	1,0**
97.	РУ-516	0,98**	0,76**
98.	РУ-1163	1,0**	1,1
99.	РУ-1209	0,88**	0,84**
100.	метформин	2,90	3,28
101.	интактные	3,44	3,67

Подструктурный анализ высокой гипогликемической активности
 производных циклических гуанидинов класса 2,3-дигидро-N⁹-
 имидазобензимидазола
 (уровень активности "высокий или умеренный" – Ind_R < 0.90)

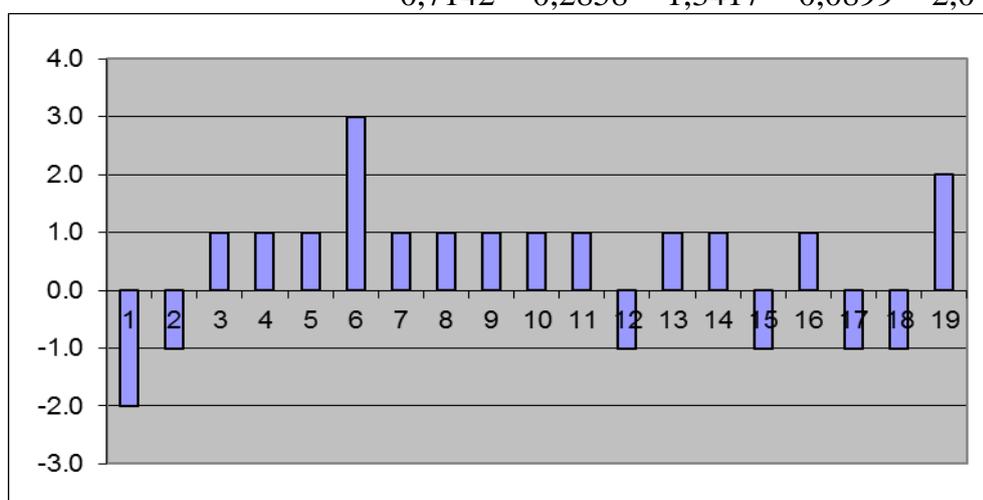
Признак	Ph	Pnh R2	Z	Pr	Общий
-CH ₂ OC ₆ H ₅	0,2000	0,8000	1,7393	0,0410	-3,0
R3					
-C ₂ H ₅ ; этил	0,7500	0,2500	1,2374	0,1080	1,0
-(CH ₂) ₂ NC ₄ H ₈ O; морфолиноэтил	0,2500	0,7500	1,2374	0,1080	-1,0
-CH ₂ CO(4-C ₆ H ₄ Br);	0,7500	0,2500	1,2374	0,1080	1,0
Солевой остаток					
2HCl; дигидрохлорид	0,3846	0,6154	1,0786	0,1404	-1,0
2HBr; дигидробромид	0,2500	0,7500	1,2374	0,1080	-1,0
I-	0,8000	0,2000	1,7393	0,0410	3,0



Подструктурный анализ высокой гипогликемической активности
производных циклических гуанидинов класса 2,3-дигидро-N⁹-
имидазобензимидазола

(уровень активности "высокий" – Ind_R < 0.82)

Признак	Ph	Pnh	Z	Pr	Общий
R2					
-CH ₂ OC ₆ H ₅	0,2407	0,7593	1,3211	0,0932	-2,0
R3					
-C ₂ H ₅ ; этил	0,2910	0,7090	0,9048	0,1828	-1,0
-CH ₂ C ₆ H ₅ ; бензил	0,7258	0,2742	1,0346	0,1504	1,0
-CH ₃ ; метил	0,6381	0,3619	0,8767	0,1903	1,0
-(CH ₂) ₂ NC ₅ H ₁₀ ; пиперидиноэтил	0,6381	0,3619	0,8767	0,1903	1,0
-(CH ₂) ₂ N(C ₂ H ₅) ₂ ; диэтиламиноэтил	0,7064	0,2936	1,8055	0,0355	3,0
-CH ₂ CO(α-C ₁₀ H ₇);	0,7258	0,2742	1,0346	0,1504	1,0
-CH ₂ CH(OH)(t-C ₄ H ₉);	0,7258	0,2742	1,0346	0,1504	1,0
-CH ₂ COOC ₂ H ₅ ;	0,7258	0,2742	1,0346	0,1504	1,0
-CH ₂ COOC ₄ H ₉ ;	0,7258	0,2742	1,0346	0,1504	1,0
-CH ₂ CONH ₂ ;	0,7258	0,2742	1,0346	0,1504	1,0
-(CH ₂) ₂ NC ₄ H ₈ O; морфолиноэтил	0,2910	0,7090	0,9048	0,1828	-1,0
-CH ₂ COC ₆ H ₃ O ₂ CH ₂	0,7258	0,2742	1,0346	0,1504	1,0
-CH ₂ COC ₆ H ₄ NO ₂	0,7258	0,2742	1,0346	0,1504	1,0
-CH ₂ CO(4-C ₆ H ₄ Br);	0,2910	0,7090	0,9048	0,1828	-1,0
Солевой остаток					
2HNO ₃	0,7258	0,2742	1,0346	0,1504	1,0
HCl; гидрохлорид	0,4171	0,5829	1,2213	0,1110	-1,0
2HBr; дигидробромид	0,2910	0,7090	0,9048	0,1828	-1,0
I-	0,7142	0,2858	1,3417	0,0899	2,0



Гипогликемическая активность производных циклических полных
гуанидинов (данные по Ind_R)

Шифр	Индекс	Класс
ACI-0001	0,86	BI 2-Imino-
ACI-0002	1,05	BI 2-Imino-
ACI-0003	0,90	BI 2-Imino-
ACI-0004	0,98	BI 2-Imino-
ACI-0005	0,76	BI 2-Imino-
ACI-0006	0,90	BI 2-Imino-
ACI-0007	0,54	BI 2-Imino-
ACI-0007	0,62	BI 2-Imino-
ACI-0009	0,78	BI 2-Imino-
ACI-0010	0,94	BI 2-Imino-
ACI-0011	0,62	BI 2-Imino-
ACI-0012	0,75	BI 2-Imino-
ACI-0014	0,76	BI 2-Imino-
ACI-0015	0,80	BI 2-Imino-
ACI-0016	1,04	BI 2-Imino-
ACI-0017	0,95	BI 2-Imino-
ACI-0018	1,09	BI 2-Imino-
AZH-0001	0,64	BI 2-Amino-
AZH-0001	0,75	BI 2-Amino-
AZH-0002	0,70	BI 2-Amino-
AZH-0003	0,81	BI 2-Amino-
AZH-0004	0,87	BI 2-Amino-
AZH-0005	0,93	BI 2-Amino-
AZH-0006	1,06	BI 2-Amino-
AZH-0007	1,07	BI 2-Amino-
AZH-0008	0,99	BI 2-Amino-
AZH-0009	1,00	BI 2-Amino-
AZH-0010	0,91	BI 2-Amino-
AZH-0011	0,91	BI 2-Amino-
AZH-0012	0,83	BI 2-Amino-
AZH-0013	1,05	BI 2-Amino-
AZH-0015	0,86	BI 2-Amino-
RF-0101	0,88	PyrimBI
RF-0102	0,73	PyrimBI
RF-0103	0,81	PyrimBI
RF-0104	0,92	PyrimBI
RF-0105	0,84	PyrimBI
RU-0013	0,84	N9-ImBI
RU-0017	0,78	N9-ImBI
RU-0063	0,83	N9-ImBI
RU-0189	1,06	N9-ImBI

RU-0217	0,93	N9-ImBI
RU-0218	1,00	N9-ImBI
RU-0246	1,21	N9-ImBI
RU-0252	0,72	N9-Dihydro-ImBI
RU-0253	0,91	N9-Dihydro-ImBI
RU-0254	0,64	N9-Dihydro-ImBI
RU-0255	0,77	N9-Dihydro-ImBI
RU-0256	0,97	N9-Dihydro-ImBI
RU-0270	1,06	N1-ImBI
RU-0271	0,53	N1-ImBI
RU-0283	0,91	N9-Dihydro-ImBI
RU-0284	0,77	N9-ImBI
RU-0295	0,94	N9-ImBI
RU-0302	1,10	BI 2-Amino-
RU-0304	0,88	BI 2-Amino-
RU-0305	1,21	BI 2-Amino-
RU-0306	1,26	BI 2-Amino-
RU-0307	1,05	BI 2-Amino-
RU-0308	1,16	BI 2-Amino-
RU-0309	0,93	BI 2-Amino-
RU-0310	1,07	BI 2-Amino-
RU-0312	1,12	BI 2-Amino-
RU-0314	1,12	BI 2-Amino-
RU-0320	0,99	BI 2-Imino-
RU-0321	0,83	N9-Dihydro-ImBI
RU-0322	0,78	N9-Dihydro-ImBI
RU-0323	1,28	N9-Dihydro-ImBI
RU-0324	1,10	N9-Dihydro-ImBI
RU-0353	0,89	N1-ImBI
RU-0354	0,81	N1-ImBI
RU-0355	1,00	N1-ImBI
RU-0451	0,89	N9-ImBI
RU-0457	1,16	N9-ImBI
RU-0458	0,90	N9-ImBI
RU-0467	0,82	N9-ImBI
RU-0502	0,86	N9-ImBI
RU-0503	0,93	N9-ImBI
RU-0504	0,67	N1-Dihydro-ImBI
RU-0505	0,98	N1-Dihydro-ImBI
RU-0506	0,88	N1-Dihydro-ImBI
RU-0507	0,87	N1-Dihydro-ImBI
RU-0508	0,53	N1-Dihydro-ImBI
RU-0509	0,96	N9-ImBI
RU-0510	0,92	N9-ImBI

RU-0511	0,91	N9-ImBI
RU-0512	0,92	N9-ImBI
RU-0513	0,94	N9-ImBI
RU-0514	0,89	N9-ImBI
RU-0515	0,95	N1-Dihydro-ImBI
RU-0516	0,76	N1-Dihydro-ImBI
RU-0517	0,88	N1-Dihydro-ImBI
RU-0519	0,60	N9-ImBI
RU-0520	0,70	N9-ImBI
RU-0523	0,91	N9-ImBI
RU-0524	1,23	N9-ImBI
RU-0529	0,77	N9-ImBI
RU-0550	0,89	PyrimBI
RU-0551	0,89	PyrimBI
RU-0552	0,80	PyrimBI
RU-0553	0,78	PyrimBI
RU-0554	0,83	PyrimBI
RU-0555	0,87	PyrimBI
RU-0556	0,83	PyrimBI
RU-0557	0,81	N1,N9-Dihydro-ImBI
RU-0558	0,83	N1,N9-Dihydro-ImBI
RU-0559	0,77	N1,N9-Dihydro-ImBI
RU-0560	0,79	N1,N9-Dihydro-ImBI
RU-0597	0,96	N1-ImBI
RU-0615	1,10	N9-ImBI
RU-0620	1,04	N9-ImBI
RU-0623	0,78	N9-Dihydro-ImBI
RU-0624	1,05	N9-Dihydro-ImBI
RU-0634	0,86	N9-Dihydro-ImBI
RU-0659	0,87	N9-Dihydro-ImBI
RU-0660	1,00	N9-Dihydro-ImBI
RU-0661	0,96	N9-Dihydro-ImBI
RU-0662	0,79	N9-Dihydro-ImBI
RU-0663	0,67	N9-Dihydro-ImBI
RU-0664	0,90	N9-Dihydro-ImBI
RU-0665	0,85	N9-Dihydro-ImBI
RU-0666	0,95	N9-Dihydro-ImBI
RU-0667	0,88	N9-Dihydro-ImBI
RU-0668	0,80	N9-Dihydro-ImBI
RU-0669	0,93	PyrimBI
RU-0670	0,86	PyrimBI
RU-0671	0,79	PyrimBI
RU-0672	0,86	PyrimBI
RU-0673	0,87	PyrimBI

RU-0674	1,17	PyrimBI
RU-0690	0,94	N9-ImBI
RU-0691	1,03	N9-ImBI
RU-0692	0,98	N9-ImBI
RU-0693	0,91	N9-ImBI
RU-0694	0,98	N9-ImBI
RU-0714	0,98	N9-ImBI
RU-0769	0,88	N9-Dihydro-ImBI
RU-0770	0,91	N9-Dihydro-ImBI
RU-0837	0,93	PyrimBI
RU-0840	0,79	PyrimBI
RU-0841	0,85	PyrimBI
RU-0846	0,98	PyrimBI
RU-0847	0,93	PyrimBI
RU-0848	0,86	PyrimBI
RU-0850	1,00	PyrimBI
RU-0851	0,95	PyrimBI
RU-0852	0,96	PyrimBI
RU-0853	0,89	PyrimBI
RU-0854	0,72	PyrimBI
RU-0855	0,87	N9-Dihydro-ImBI
RU-0856	0,86	N9-Dihydro-ImBI
RU-0857	1,06	N9-Dihydro-ImBI
RU-0858	1,07	N9-Dihydro-ImBI
RU-0859	1,03	N9-Dihydro-ImBI
RU-0860	0,75	N9-Dihydro-ImBI
RU-0862	1,34	N9-Dihydro-ImBI
RU-0863	0,81	N9-Dihydro-ImBI
RU-0864	1,05	N9-Dihydro-ImBI
RU-0865	1,02	N9-Dihydro-ImBI
RU-0866	1,04	N9-ImBI
RU-0870	1,05	PyrimBI
RU-0871	0,74	PyrimBI
RU-0873	0,79	PyrimBI
RU-0874	1,03	N9-Dihydro-ImBI
RU-0875	1,23	N9-Dihydro-ImBI
RU-0876	1,04	N9-Dihydro-ImBI
RU-0890	0,94	PyrimBI
RU-0891	1,03	N9-Dihydro-ImBI
RU-0895	1,03	N9-Dihydro-ImBI
RU-0896	0,89	PyrimBI
RU-0897	1,07	PyrimBI
RU-0898	1,04	PyrimBI
RU-0899	0,90	BI 2-Imino-

RU-1144	0,63	PyrimBI
RU-1163	1,00	N1-Dihydro-ImBI
RU-1180	0,96	N9-Dihydro-ImBI
RU-1209	0,84	N1-Dihydro-ImBI
RU-1217	0,76	N9-Dihydro-ImBI
RU-1220	0,67	PyrimBI
RU-1221	0,70	N9-Dihydro-ImBI
RU-1222	0,75	PyrimBI
RU-1224	0,73	PyrimBI
RU-1293	0,73	N9-Dihydro-ImBI
RU-1297	0,89	N9-Dihydro-ImBI
RU-1298	0,92	PyrimBI
RU-1299	1,09	N9-Dihydro-ImBI
RU-1300	0,99	PyrimBI
RU-1301	1,08	N9-Dihydro-ImBI
RU-1302	0,87	PyrimBI
RU-1303	0,89	N9-Dihydro-ImBI
RU-1304	0,96	PyrimBI
RU-1306	1,30	PyrimBI
RU-1307	1,00	N9-Dihydro-ImBI
RU-1308	0,97	PyrimBI
RU-1311	1,08	N9-Dihydro-ImBI
RU-1312	1,18	N9-Dihydro-ImBI
RU-1316	0,65	N9-Dihydro-ImBI
RUS-0073	0,89	N4-TriazolBI
RUS-0074	0,83	N4-TriazolBI
RUS-0075	0,77	N4-TriazolBI
RUS-0076	0,88	N4-TriazolBI
RUS-0077	0,64	N4-TriazolBI
RUS-0078	0,82	N4-TriazolBI
RUS-0079	0,83	N4-TriazolBI
RUS-0080	0,89	N4-TriazolBI
RUS-0081	0,89	N4-TriazolBI
RUS-0082	0,84	TriazinBI
RUS-0083	0,82	TriazinBI
RUS-0090	0,82	TriazinBI
RUS-0092	0,82	ThiazolBI

Частотный анализ по электронным параметрам высокой гипогликемической активности производных циклических гуанидинов класса
2,3-дигидро-N⁹имидазо-бензимидазола
(уровень активности "высокий" – Ind_R < 0.82)

Признак	Ph	Pnh	Z	Pr	Общий
R2					
M(Q) ₂ < 0.020	0,3620	0,6380	0,9763	0,1645	-1,0
0.111 ≤ M(Q) ₂ < 0.156	0,6119	0,3881	1,3409	0,0900	2,0
0.117 ≤ M Q ₂ < 0.141	0,3620	0,6380	0,9763	0,1645	-1,0
0.141 ≤ M Q ₂ < 0.165	0,7426	0,2574	1,1729	0,1204	1,0
Min(Q+) ₂ < 0.060	0,2975	0,7025	0,8571	0,1957	-1,0
0.060 ≤ Min(Q+) ₂ < 0.084	0,2975	0,7025	0,8571	0,1957	-1,0
0.109 ≤ Min(Q+) ₂ < 0.133	0,5904	0,4096	1,1812	0,1188	1,0
-0.216 ≤ Min(Q-) ₂ < -0.168	0,2975	0,7025	0,8571	0,1957	-1,0
-0.211 ≤ Q(Het1) ₂ < -0.152	0,2975	0,7025	0,8571	0,1957	-1,0
R3					
M(Q) ₃ < -0.041	0,2975	0,7025	0,8571	0,1957	-1,0
-0.006 ≤ M(Q) ₃ < 0.030	0,3986	0,6014	1,6529	0,0492	-3,0
0.030 ≤ M(Q) ₃ < 0.066	0,6863	0,3137	1,5270	0,0634	2,0
M(Q) ₃ ≥ 0.066	0,7984	0,2016	2,3138	0,0103	3,0
0.043 ≤ M Q ₃ < 0.09	0,7426	0,2574	1,1729	0,1204	1,0
Max(Q+) ₃ < 0.156	0,2882	0,7118	1,7837	0,0372	-3,0
0.156 ≤ Max(Q+) ₃ < 0.284	0,5541	0,4459	0,8563	0,1959	1,0
Max(Q-) ₃ < -0.096	0,2474	0,7526	1,2604	0,1038	-1,0
-0.096 ≤ Max(Q-) ₃ < -0.075	0,6689	0,3311	1,1430	0,1265	1,0
0.018 ≤ Min(Q+) ₃ < 0.043	0,1478	0,8522	2,4545	0,0071	-4,0
0.069 ≤ Min(Q+) ₃ < 0.095	0,6179	0,3821	1,2839	0,0996	2,0
-0.311 ≤ Min(Q-) ₃ < -0.229	0,5612	0,4388	0,8607	0,1947	1,0
-0.384 ≤ Q(Het1) ₃ < -0.299	0,3598	0,6402	1,3467	0,0890	-2,0
-0.299 ≤ Q(Het1) ₃ < -0.214	0,5749	0,4251	1,0531	0,1461	1,0
-0.059 ≤ Q(Het2) ₃ < 0.167	0,2975	0,7025	0,8571	0,1957	-1,0
Q(Het3) ₃ ≥ 0.071	0,2975	0,7025	0,8571	0,1957	-1,0
Конденсированная система					
-0.092 ≤ M(Q) _{CS} < -0.080	0,3335	0,6665	1,2644	0,1030	-1,0

$\text{Max}(Q^+)_{CS} \geq 0.240$	0,7394	0,2606	1,5807	0,0570	2,0
$\text{Min}(Q^+)_{CS} < 0.014$	0,2474	0,7526	1,2604	0,1038	-1,0
$0.014 \leq \text{Min}(Q^+)_{CS} < 0.021$	0,2537	0,7463	2,2444	0,0124	-3,0
$0.029 \leq \text{Min}(Q^+)_{CS} < 0.037$	0,7834	0,2166	2,5390	0,0056	4,0
$\text{Min}(Q^+)_{CS} \geq 0.037$	0,8267	0,1733	2,0721	0,0191	3,0
$-0.185 \leq Q(N9)_{CS} < -0.163$	0,2975	0,7025	0,8571	0,1957	-1,0
$Q(N4)_{CS} < -0.232$	0,6964	0,3036	1,8442	0,0326	3,0
$-0.232 \leq Q(N4)_{CS} < -0.185$	0,4280	0,5720	0,9335	0,1753	-1,0
$-0.185 \leq Q(N4)_{CS} < -0.139$	0,2118	0,7882	1,6089	0,0538	-2,0
$-0.386 \leq Q(\text{Imid2})_{CS} < -0.262$	0,2975	0,7025	0,8571	0,1957	-1,0

Солевой остаток

$Q(\text{AcR}) < -0.213$	0,6863	0,3137	1,5270	0,0634	2,0
$-0.166 \leq Q(\text{AcR}) < -0.119$	0,2975	0,7025	0,8571	0,1957	-1,0
$Q(\text{AcR}) \geq -0.074$	0,3335	0,6665	1,2644	0,1030	-1,0