

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Захарьяшева Ольга Юрьевна

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АКТИВАТОРОВ ГЛЮКОКИНАЗЫ
– НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ
ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

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

Спасов Александр Алексеевич

Научный консультант:

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник

Васильев Павел Михайлович

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. АКТИВАТОРЫ ГЛЮКОКИНАЗЫ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КЛАСС ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	14
1.1 Основные группы препаратов для лечения сахарного диабета 2 типа.....	14
1.2 Роль глюкокиназы печени и поджелудочной железы в обмене глюкозы..	21
1.3 Изменения конформации глюкокиназы.....	23
1.4 Значение глюкокиназы в регуляции массы β -клеток	24
1.5 Изменение активности глюкокиназы при сахарном диабете	25
1.6 Мутации гена глюкокиназы	25
1.7 Активаторы глюкокиназы – новое, перспективное направление терапии сахарного диабета 2 типа.....	28
1.8 Заключение.....	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	35
2.1 Правила и рекомендации к проведению экспериментальных исследований	35
2.2 Перечень используемых реактивов и веществ.....	35
2.3 Список используемого оборудования и программного обеспечения.....	39
2.4 Экспериментальные животные	40
2.5 Методы компьютерной обработки информации	41
2.6 Скрининговые модели и методы для изучения фармакологических свойств новых производных азотсодержащих гетероциклических соединений.....	49
2.7 Методы оценки зависимости фармакологической активности изучаемых соединений от их химической структуры.....	50
2.8 Методы исследования антидиабетической активности соединений при хроническом введении.....	51
2.9 Метод изучения влияния активаторов глюкокиназы на процессы регенерации β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы при	

стрептозотоцин-индуцированном диабете с помощью метода флуоресцентной микроскопии	57
2.10 Исследование влияния соединений на механизмы развития поздних осложнений сахарного диабете.....	60
2.11 Методы исследования токсикологических свойств соединений	67
2.12 Методы статистической обработки.....	70
ГЛАВА 3. ПОИСК И КОНСЕНСУСНЫЙ ПРОГНОЗ СОЕДИНЕНИЙ С ГЛЮКОКИНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ IN SILICO	72
3.1 Формирование базы данных по структуре новых соединений	72
3.2 Создание банка данных по структуре и уровню активности известных активаторов глюкокиназы	72
3.3 Консенсусный прогноз соединений с глюкокиназной активностью <i>in silico</i>	74
3.4 Заключение.....	88
ГЛАВА 4. ПОИСК НОВЫХ АКТИВАТОРОВ ГЛЮКОКИНАЗЫ IN VITRO	90
4.1 Поиск новых активаторов глюкокиназы в тест-системе <i>in vitro</i>	90
4.2 Влияние наиболее активных соединений на активность глюкокиназы в зависимости от концентрации <i>in vitro</i>	100
4.3 Исследование взаимосвязи между структурой и фармакологической активностью изучаемых соединений	102
4.4 Механизм молекулярного взаимодействия соединений NP-001 и NP-006 с активным аллостерическим сайтом глюкокиназы.....	104
4.5 Заключение.....	107
ГЛАВА 5. АНТИГИПЕРГЛИКЕМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАИБОЛЕЕ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	109
5.1 Влияние на углеводный обмен наиболее активных соединений при однократном введении интактным животным	109
5.2 Заключение.....	112

ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ NP-001 И NP-006 НА ПРОЦЕССЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ А- И В-КЛЕТОК ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА.....	114
6.1 Исследование влияния соединения NP-001 и NP-006 на пролиферацию α - и β -клеток поджелудочной железы на модели экспериментального стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета I типа у мышей.	115
6.2 Заключение.....	118
ГЛАВА 7. МОДЕЛИРОВАНИЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТОЙ (ВЖД) НА МЫШАХ ЛИНИИ C57BL/6J ..	119
7.1 Влияние высокожировой диеты на уровень глюкозы и динамику веса мышей линии C57BL/6J при моделировании сахарного диабета 2 типа	120
7.2 Заключение.....	123
ГЛАВА 8. АНТИДИАБЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ NP-001 И NP-006 ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВВЕДЕНИИ	124
8.1 Исследование антидиабетической активности соединений NP-001 и NP-006 при хроническом введении.....	124
8.2 Заключение.....	144
ГЛАВА 9. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ NP-001 И NP-006 НА МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ПОЗДНИХ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА.....	147
9.1 Антиоксидантные свойства соединений NP-001 и NP-006 на моделях <i>in vitro</i>	147
9.2 Антигликирующее действие изучаемых соединений на моделях <i>in vitro</i>	149
9.3 Изучение хелатирующих свойств соединений на модели медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты <i>in vitro</i>	150
9.4 Антиагрегантное действие наиболее активных веществ на моделях <i>in vitro</i>	151

9.5 Антитромбогенное действие наиболее активных веществ на моделях <i>in vivo</i>	153
9.6 Заключение.....	155
ГЛАВА 10. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЙ NP-001 И NP-006.....	158
10.1 Оценка <i>in silico</i> показателей ADMET.....	158
10.2 Исследование цитотоксических свойств соединений NP-001 и NP-006.....	169
10.3 Изучение острой токсичности соединений при пероральном и интраперитонеальном путях введения.....	171
10.4 Заключение.....	172
ГЛАВА 11. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	174
ВЫВОДЫ.....	188
СПИСК ЛИТЕРАТУРЫ.....	193
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....	214

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Сахарный диабет (СД) представляет собой глобальную медико-социальную угрозу для здоровья человека и общества в целом, темпы роста распространенности которой приобрели масштаб мировой эпидемии [Дедов И. И., Шестакова, М. В., 2018]. По данным Международной Федерации диабета (IDF), в настоящее время насчитывается порядка 425 миллионов больных сахарным диабетом, а к 2045 году их число может достигнуть 629 миллионов человек. Число смертей, ассоциированных с СД в 2017 году, оценивается в 4 миллиона [Diabetes Facts and Figures. International Diabetes Federation, 2017]. По данным Государственного регистра больных сахарным диабетом в Российской Федерации на 31.12.2017 было зарегистрировано 4 498 955 человек (3,06% населения РФ), из них с СД 1-ого типа – 5,7% (256,1 тыс.), с СД 2-ого типа (СД2) – 92,1% (4,15 млн) [Дедов И.И., Шестакова М.В., 2018]. Однако, в ряду клинико-эпидемиологических исследований, проводившихся в России, было показано, что реальная распространенность СД может превышать зарегистрированную в 2-3 раза. В частности, по оценкам IDF, в России проживают около 12,1 миллиона человек с СД в возрасте от 20 до 79 лет.

СД2 – гетерогенное заболевание, характеризующееся несколькими последовательными фазами. Развитие патологии начинается с первичной инсулинорезистентности и компенсаторной гиперинсулинемии с последующим развитием дисфункции β -клеток, что создает потребность в применении секретагенов инсулина или препаратов инсулина на поздних стадиях заболевания [Петров В. И., 2016].

В современной клинической практике используются следующие группы препаратов, рекомендованные алгоритмами и протоколами лечения пациентов с СД2: бигуаниды, тиазолидиндионы, препараты сульфонилмочевины, глиниды, ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4), агонисты рецепторов глюкагонподобного пептида-1 (ГПП-1), ингибиторы натрий-глюкозного

котранспортера 2-го типа, ингибиторы альфа-глюкозидаз, инсулины [Krentz A.J., 2018]. В последние десятилетия количество сахароснижающих препаратов неуклонно растет; вместе с тем, процесс выбора препарата в реальной клинической практике только усложняется [Аметов А.С., 2017]. Препараты из вышеперечисленных групп используются как в моно-, так и в комбинированной терапии, однако, имеют ряд общих недостатков: гипогликемия; повышение массы тела; желудочно-кишечные расстройства; другие метаболические нарушения – лактат-ацидоз и В12-дефицитная анемия [Тюренков И.Н., 2015].

Широкая распространенность СД и многообразие патогенетических вариантов данного заболевания обуславливают актуальность поиска и разработки новых пероральных сахароснижающих препаратов [Покровский М. В., 2019]. К одной из перспективных белковых биомишеней для создания новых противодиабетических средств относится фермент глюкокиназа (ГК) [Leighton B., 2005]. Активаторы глюкокиназы (ГКА) представляют собой новый класс перспективных антидиабетических соединений, которые оказывают антигипергликемический эффект, доказанный в доклинических и клинических исследованиях. В частности, активаторы глюкокиназы не вызывают дислипидемии, а также не увеличивают массу тела [Matschinsky F.M., 2010; Zhu X.X., 2018б].

Все вышеперечисленное обуславливает повышенный интерес к поиску активаторов глюкокиназы как антидиабетических лекарственных средств нового поколения.

Степень разработанности проблемы

Установлена регуляторная роль глюкокиназы в поддержании гомеостаза глюкозы при сахарном диабете [Kitao N., 2018 Kurnianta; P. D. M., 2020]. Имеются веские доказательства того, что ГК β -клеток остается функционирующей при СД 2 типа, хотя общее содержание ГК, вероятно, уменьшается, потому что масса и функция β -клеток снижается по мере прогрессирования заболевания [Kamata K., 2004].

Все вышеперечисленное вызывает высокий интерес медицинских химиков и фармакологов к поиску активаторов глюкокиназы в качестве веществ для коррекции метаболизма при сахарном диабете [Xu J., 2017a; Zhu X. X., 2018; Vella A., 2019]. В настоящее время семь ГКА находятся на фазе II клинических исследований, и одно соединение проходит III фазу клинических испытаний как антидиабетическое средство [Zhu X.X., 2018]. Первый научный доклад о разработке и успешном доклиническом использовании активаторов глюкокиназы датируется 2003 годом. Вскоре последовали выдачи более чем 100 патентов на активаторы глюкокиназы различного химического строения, что демонстрирует заинтересованность исследователей в отношении этого класса противодиабетических препаратов [Deshpande A.M., 2017; Kurnianta P. D. M., 2020]. Активное исследование и внедрение в клиническую практику этого класса препаратов, вероятно, может способствовать повышению качества и продолжительности жизни у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, а также снижению риска возникновения микро- и макрососудистых осложнений.

Целью исследования является направленный поиск и исследование антидиабетических свойств новых активаторов глюкокиназы.

Для решения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Выполнить консенсусный прогноз наличия ГК-активирующей активности среди библиотеки доступных химических соединений *in silico*.
2. Изучить влияние спрогнозированных веществ на активность глюкокиназы *in vitro*.
3. Исследовать гипогликемические свойства наиболее активных соединений на интактных животных при пероральной нагрузке глюкозой.
4. Определить влияние соединений NP-001 и NP-006 на процессы пролиферации α - и β -клеток поджелудочной железы при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете.

5. Оценить антидиабетическую активность соединений NP-001 и NP-006 при 21-дневном введении мышам линии C57BL/6J с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа.
6. Исследовать влияние соединений NP-001 и NP-006 на механизмы развития поздних осложнений сахарного диабета.
7. Определить лекарственное подобие, выполнить прогноз фармакокинетических и токсикологических свойств, а также определить острую токсичность соединений NP-001 и NP-006.

Научная новизна исследования

В результате консенсусного виртуального скрининга *in silico* и экспериментального тестирования *in vitro* из 14 изученных скаффолдов выявлены наиболее активные в отношении глюкокиназы – производные биспириоксида, биспиридина, пиридина, пиримидина, хиназолина, тиазолидиндиона и тиазолобензимидазола. Для 6 исследуемых классов химических структур (дiazепинобензимидазолы, имидазобензимидазолы, биспириоксины, тиазолобензимидазолы, триазолопиримидины и пептидомиметики) было впервые спрогнозировано и экспериментально доказано наличие ГК-активирующих свойств. Впервые установлена взаимосвязь «структура-активность», в результате выявлен наиболее активный класс в отношении глюкокиназы – биспириоксины.

Впервые показано, что соединение NP-006 обладает антидиабетическим действием на модели сахарного диабета 2 типа при внутрибрюшинном введении. Выявлено соединение под шифром NP-001, проявляющее антиоксидантные, антирадикальные и хелатирующие свойства *in vitro*, а также выявлена антитромботическая активность в условиях стрептозоцин-индуцированного сахарного диабета на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного 50%-ным раствором FeCl₃.

Практическая значимость

Производные биспиридина – перспективный класс химических веществ для синтеза и дальнейшего поиска активаторов глюкокиназы; созданы предпосылки для углубленного изучения соединений данного скаффолда в качестве потенциальных лекарственных средств для лечения сахарного диабета. Для соединения NP-006 выявлен перспективный антидиабетогенный потенциал на мышцах линии DIO-C57BL/6J с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа при 3-х недельном внутрибрюшинном введении. Для соединения NP-001 в тестах *in vitro* найдены антиоксидантные, хелатирующие и антиагрегантные свойства, а в исследованиях *in vivo* показано антитромботическое действие.

Методология и методы исследования

В соответствии с поставленными задачами выбраны современные высокоинформативные методические подходы, имеющиеся в Волгоградском государственном медицинском университете. В качестве объектов исследования использованы половозрелые самцы мышей линии C57BL/6J, нелинейных мышей и крыс, а также кроликов породы «Шиншилла». Исследование антидиабетических свойств новых соединений проведено согласно методическим рекомендациям по доклиническому изучению лекарственных средств для коррекции сахарного диабета, ожирения и метаболического синдрома [Миронов А. Н., 2012] с использованием методов статистической обработки данных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Производные бифенилоксида, биспиридина, пиридина, пиримидина, хиназолина, тиазолидиндиона и тиазолобензимидазола активируют глюкокиназу человека.
2. При 21-дневном внутрибрюшинном введении соединение NP-006 в дозе 300 мг/кг улучшает толерантность к глюкозе, снижает инсулинорезистентность, массу тела животных и признаки системного воспаления; ингибирует

глюконеогенез и активирует глюкокиназу печени у мышей с сахарным диабетом 2 типа.

3. Соединение NP-006 достоверно увеличивает удельное количество инсулин-позитивных клеток в панкреатических островках у мышей со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом сопоставимо с соединением сравнения PF-04937319.
4. LD50 соединений NP-001 и NP-006 превышает 2000 мг/кг на мышах и крысах при пероральном введении и составляет 944 мг/кг и более 1000 мг/кг при внутрибрюшинном введении, соответственно.

Внедрение результатов исследования.

Полученные данные о способности новых производных биспиридина и тиазолобензимидазола активировать глюкокиназу используется при синтезе новых веществ в Научно-образовательном центре фармацевтики КФУ (г. Казань) и в НИИ ФОХ Южного Федерального университета (г. Ростов-на-Дону). В работе кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ применяется новый комплексный подход к поиску новых активаторов глюкокиназы. Результаты работы включены в учебный процесс на кафедрах фармакологии и фармации ИНМФО (Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования) ВолгГМУ, фармацевтической и токсикологической химии ВолгГМУ, на кафедрах фармакологии Кубанского государственного медицинского университета и Сибирского государственного медицинского университета.

Степень достоверности и апробация результатов

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

Основные положения диссертационной работы докладывались, обсуждались и представлялись на 73-77-ой открытых научно-практических конференциях молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 2015-2019 гг.; XXI - XXIV Региональных конференциях молодых исследователей Волгоградской области, Волгоград, 2016-2019 гг.; VII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 2016 г.; V съезде фармакологов «Научные основы поиска и создания новых лекарств», Ярославль, 2018 г., VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Беликовские чтения», Пятигорск, 2018 г.

Личный вклад автора.

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ отечественных и зарубежных источников литературы по исследованной проблеме. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах изучения антидиабетических свойств новых активаторов глюкокиназы среди производных гетероциклических азотсодержащих соединений: экспериментальных исследованиях, решении поставленных задач и обсуждении результатов. При написании диссертационной работы автором лично выполнен сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и оформление рукописи.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 22 печатные работы, из них 12 в ведущих научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, и 3 патента на изобретение РФ.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 214 страницах машинописного текста и состоит из введения, одиннадцати глав, выводов, практических рекомендаций, перечня сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 37 рисунками (а также 1 рисунком в приложении) и 40 таблицами. Библиографический указатель включает 190 источников, из них 30 отечественных, 160 иностранных.

ГЛАВА 1. АКТИВАТОРЫ ГЛЮКОКИНАЗЫ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КЛАСС ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Сахарный диабет (СД) – это неинфекционная эпидемия, являющаяся одним из опаснейших вызовов всему человечеству в XXI веке. По данным Международной Федерации диабета (IDF), в настоящее время насчитывается порядка 425 миллионов больных сахарным диабетом, а к 2045 году их число может достигнуть 629 миллионов человек. Общие прямые расходы системы здравоохранения на диабет во всем мире по данным экспертов ВОЗ, полученным на основании модели IDF, оцениваются в 727 миллиардов долларов за 2017 год, из них 12% для лечения людей в возрасте 20-79 лет. Проблема СД в России также представляет собой тяжелое бремя. Средние годовые затраты в расчете на 1 пациента с СД1 составили 81,1 тыс. руб., на пациента с СД2 – 70,8 тыс. руб. В случае СД2 наличие осложнений приводит к трехкратному увеличению медицинских затрат [Дедов И.И., Шестакова М. В., 2018].

Наиболее остро стоит проблема сахарного диабета 2 типа (СД2), на долю которого приходится до 90% от общего числа больных. Заболевание характеризуется прогрессивным течением и развитием ряда острых (диабетический кетоацидоз, гиперосмолярная кома, гипогликемия) и поздних осложнений (атеросклероз, инфаркт миокарда и инсульт, ретинопатия, нефропатия, сенсорная нейропатия), зачастую приводя к временной потере трудоспособности, инвалидизации и ранней смерти, в первую очередь из-за высокого сердечно-сосудистого риска [Дедов И.И., Шестакова М. В., 2011].

1.1 Основные группы препаратов для лечения сахарного диабета 2 типа.

Международные и национальные алгоритмы сахароснижающей терапии СД2 регулярно обновляются в связи с получением новых результатов широкомасштабных рандомизированных исследований, меняющих представления о целевых значениях в терапии СД и способах их достижения, с появлением новых

групп сахароснижающих препаратов и их внедрением в клиническую практику, а также накоплением данных о серьезных ограничениях в отношении ранее использовавшихся средств. Однако, до настоящего времени прямой взаимосвязи между конкретным классом препаратов или их сочетанием и улучшением контроля СД не установлено. Фактором с наибольшим влиянием на улучшение контроля СД признается сам факт интенсификации терапии. Несмотря на увеличение расходов и увеличение количества новых препаратов, не показано одновременных улучшений в гликемическом контроле и в распространенности тяжелых гипогликемий [Дедов И.И., Шестакова М. В., 2018; Zhong V.W., 2017].

В настоящее время для клинического применения одобрены 11 классов антидиабетических лекарственных средств, и многие другие находятся в разработке, однако ни один из используемых препаратов не назначается в качестве монотерапии для достижения целевого уровня гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) – показателя, отражающего состояние компенсации углеводного обмена у больных СД.

Инсулинотерапия – при уровне HbA_{1c} 6,5–7,5%, как правило, не требуется, однако у ряда пациентов с выраженными клиническими признаками дефицита инсулиновой секреции (отсутствие избыточной массы тела, выраженная потеря массы тела в последние месяцы, жажда, сухость, полиурия) лечение может быть начато с инсулинотерапии [Дедов И.И., Шестакова М. В., 2011]. Преимуществами инсулинов являются отсутствие противопоказаний и устойчивые гликемические улучшения по сравнению с пероральными сахароснижающими препаратами. В качестве недостатков нужно отметить потребность в ежедневном контроле уровня глюкозы, увеличение массы тела, риск гипогликемии.

Бигуаниды. Представителем класса является метформин, который остается наиболее изученным с точки зрения эффективности и безопасности лекарственным средством при монотерапии. Является препаратом первого ряда (золотым стандартом) для старта терапии сахарного диабета благодаря тому, что способствует низкому риску гипогликемии, не влияет на массу тела и обладает рядом дополнительных положительных эффектов, помимо сахароснижающего, –

кардиопротективным, гиполипидемическим. Лечение метформином обычно приводит к снижению уровня глюкозы в плазме натощак на 2–4 ммоль/л и уровню HbA_{1c} на 1–2%, независимо от возраста, веса и продолжительности СД2, пока сохраняется некоторая остаточная функция β-клеток. К тому же обладает низкой стоимостью. Однако, есть и недостатки: желудочно-кишечный дискомфорт, риск развития лактатацидоза (редко), риск развития дефицита витамина В12 при длительном применении [Дедов И.И., Шестакова М. В., 2011; Tahrani A. A., 2016]. Хотя метформин является относительно безопасным препаратом, большие его дозы за счет увеличения анаэробного гликолиза способны усилить хроническую гипоксию у пациентов с заболеваниями сердца, легких, в связи с чем метформин не рекомендуется применять у пациентов старше 60 лет [Аметов А. С., 2016].

Препараты сульфонилмочевины (ПСМ). За последние десятилетия было создано три поколения ПСМ. Препараты первого поколения толбутамид и хлорпропамид имели существенный недостаток: их взаимодействие с другими лекарственными средствами, применяемыми для лечения сопутствующих заболеваний, иногда приводило к развитию тяжелых эпизодов гипогликемии. При разработке препаратов второго поколения (гликлазида, глипизида, глибенкламида) данная проблема была частично решена. В отличие от предшественников препараты второго поколения не вызывают гипогликемию при сочетанном применении. Вместе с тем их использование сопровождается по крайней мере тремя неблагоприятными эффектами: эпизодами гипогликемии, в частности при нерегулярном приеме пищи, физической нагрузке и сочетанном применении с некоторыми лекарственными средствами; увеличением массы тела; возможным отрицательным воздействием на сердечно-сосудистую систему [Зайцева Н.В., 2014]. На данный момент существует и третье поколение ПСМ, представителем которого является глимепирид. Препарат обладает более надежным профилем безопасности в отношении гликемии, однако его взаимодействие с АТФ-зависимыми калиевыми каналами, расположенными не только в поджелудочной железе, но и в сосудах, может обуславливать отрицательное влияние на сердечно-сосудистую систему [Bailey C. J., 2015].

Глиниды (репаглинид, натеглинид), как и препараты СМ, ассоциируются с риском гипогликемий и увеличением массы тела. Показаны для лиц с отсутствием избыточной массы тела или ожирения, то есть с признаками недостаточной секреции инсулина [Дедов И.И., Шестакова М. В., 2011].

Тиазолидиндионы (ТЗД) (пиоглитазон, росиглитазон). Несмотря на чрезвычайно благоприятный метаболический профиль действия (снижение инсулинорезистентности, сахароснижающий эффект без риска развития гипогликемии, гиполипидемический эффект, данные о сохранении функции β -клеток), использование этих препаратов имеет весьма серьезные ограничения [Ueno, H., 2015]. На настоящий момент росиглитазон по решению Европейского медицинского агентства (ЕМЕА) изъят с рынка в связи с негативными сердечно-сосудистыми эффектами, а в США наложены ограничения к применению этого препарата. Поэтому единственным представителем этого класса препаратов в большинстве стран мира и в России остается пиоглитазон. Общим негативным эффектом глитазонов является прибавка массы тела, возможность развития отеков, повышенный риск развития переломов трубчатых костей. Пиоглитазон рекомендуется в качестве монотерапии пациентам с выраженной инсулинорезистентностью, отсутствием сердечно-сосудистой патологии в случае непереносимости или противопоказаний к применению препаратов первого ряда [Scheen A. J., 2019].

Ингибиторы ДПП-4 (вилдаглиптин, ситаглиптин, саксаглиптин) – группа препаратов из класса инкретинов для перорального применения. Не вызывают гипогликемии и прибавки массы тела, а также снижают уровень HbA_{1c} на 0,5–1% при монотерапии. Предположительно (доказано в эксперименте на животных), эти препараты обладают дополнительным преимуществом в отношении сохранения массы β -клеток поджелудочной железы. Ограничивают применение данной группы высокая цена и риск развития панкреатитов. Препараты не рекомендуется применять при тяжелой почечной (СКФ менее 30 мл/мин/1,73 м²) и печеночной патологии [Deacon C. F., 2016; Mu J., 2006].

Агонисты рецепторов ГПП-1 (эксенатид, лираглутид) – новая группа препаратов из класса инкретинов для подкожного введения. В современных рекомендациях по лечению СД для пациентов с сопутствующим ожирением в дебюте заболевания отмечено предпочтительное назначение гипогликемических препаратов, которые снижают массу тела (агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) [Куркин Д. В., Тюренков, И. Н., 2018]. Лираглутид – первый аналог человеческого ГПП-1, вводится один раз в сутки. Препараты не вызывают гипогликемии, снижают массу тела и артериальное давление; снижение уровня HbA_{1c} на 0,8-1,8% при монотерапии. Предположительно (доказано в эксперименте на животных) обладают дополнительным преимуществом в отношении сохранения массы β -клеток поджелудочной железы. У больных с ожирением позволяют ожидать дополнительный эффект в виде снижения массы тела. Препараты не рекомендуется применять у пациентов с тяжелыми нарушениями функции почек (СКФ менее 30 мл/мин/1,73 м²); нарушениями функции печени; сердечной недостаточностью III–IV функционального класса (в соответствии с классификацией NYHA); воспалительными заболеваниями кишечника; парезом желудка. Требуется осторожность при назначении препаратов пациентам с анамнестическими указаниями на рецидивирующий панкреатит [Bailey, C. J., 2019] Также, агонисты рецепторов ГПП-1 являются дорогостоящими препаратами, что делает их малодоступными для большинства пациентов и снижает приверженность к лечению [Куркин Д. В., Тюренков, И. Н., 2018].

Ингибиторы альфа-глюкозидаз (акарбоза, миглитол) обладают относительно скромным сахароснижающим потенциалом и выраженными побочными эффектами со стороны желудочно-кишечного тракта, что обуславливает крайне низкую приверженность к лечению у пациентов. Препарат не оказывает системного действия, не вызывает гипогликемий, снижает главным образом уровень постпрандиальной гликемии. В качестве монотерапии может быть рекомендован пациентам при непереносимости или наличии противопоказаний к препаратам первого ряда выбора [Krentz, A. J., 2018].

Ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа (SGLT2) – это новый класс пероральных противодиабетических препаратов, позволяющих уменьшить уровень гликемии, независимо от инсулина и функции бета-клеток. С одной стороны, препараты этого класса предлагают новые возможности в лечении СД 2 типа: прежде всего новый, не зависящий от инсулина механизм действия, отсутствие негативного влияния на массу тела и даже небольшое ее снижение, благоприятные фармакокинетические свойства и в целом хорошую переносимость [Rahman W., 2019]. С другой стороны, механизм действия ингибиторов SGLT2 направлен на клинические проявления диабета, а не на его причину. Также, существенными недостатками могут быть инфекции половых органов и мочевыводящих путей, осмотический диурез, возможный риск гипотонии и диабетического кетоацидоза [Scheen, A. J., 2015]. Согласно алгоритмам специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом, одной из альтернатив лечения пациентов с СД может быть интенсификация терапии с добавлением к комбинации метформина с ПСМ дапаглифлозина – представителя данного класса препаратов с инновационным инсулиннезависимым механизмом действия. За счет своего уникального механизма действия добавление дапаглифлозина не приводит к увеличению гипогликемии, при этом пациенты теряют массу тела, происходит стойкое снижение артериального давления, что улучшает качество жизни пациентов и не ухудшает долгосрочный прогноз [Петров В. И., 2016].

Бромокриптин-QR (Циклозет) – препарат, стимулирующий дофаминовые D₂-рецепторы, который рекомендован Американской ассоциацией клинических эндокринологов (American Association of Clinical Endocrinologists, AACE) для лечения СД2 в дополнение к изменению образа жизни. Препарат обеспечивает утреннее повышение уровня дофамина в гипоталамусе, что согласуется с нормальной суточной регуляцией глюкозы, и способствует снижению симпатического тонуса, подавлению нейрональной регуляции печени и улучшению утилизации глюкозы в периферической крови, не влияя на уровень инсулина. Достоинствами препарата также являются низкий риск гипогликемии,

отсутствие влияния на массу тела, снижение риска сердечно-сосудистых заболеваний. Из недостатков нужно отметить слабость, тошноту и рвоту [Holt, R. I., 2010; Briones-Aranda A., W., 2018].

Аналоги амилина. Единственный представитель этой группы – прамлинтид – препарат, лишенный неблагоприятных фармакологических свойств, но сохранивший все биологические эффекты амилина. Он показан, прежде всего, больным, которые нуждаются в инсулинотерапии (при очевидном дефиците амилина), а именно — всем больным СД1 и больным СД2, получающим инсулин. Прамлинтид подавляет чувство голода и способствует небольшой потере веса. Имеются данные о сохранении функции β -клеток при применении данного лекарственного средства. Возможные побочные эффекты – гипогликемия, инъекционное введение совместно с инсулином во время еды, тошнота и рвота [Younk L. M., 2011; American Diabetes Association 8, 2018].

Несмотря на широкий выбор пероральных антидиабетических препаратов, на сегодняшний день велика потребность в создании и внедрении в клиническую практику новых, эффективных, безопасных препаратов для лечения СД2. Одной из перспективных мишеней для создания новых противодиабетических средств является глюкокиназа (ГК) [Leighton B., 2005]. Активаторы глюкокиназы представляют собой новый класс перспективных противодиабетических препаратов, которые обладают надежным гипогликемическим эффектом, связанным с повышением активности глюкокиназы печени и поджелудочной железы, доказанным в доклинических исследованиях [Deshpande A.M., 2017; Min Q., 2017; Paczal A., 2016; Xu J., 2017]. При этом, очень важным является то, что активаторы глюкокиназы не вызывают клинически значимую гипогликемию в моделях сахарного диабета, не влияют на уровень липидов крови, а также не увеличивают массу тела [Matschinsky F. M., 2010]. Активное исследование и внедрение в клиническую практику этого класса препаратов, вероятно, может способствовать повышению качества и продолжительности жизни у пациентов с сахарным диабетом 2 типа, а также снижению риска возникновения микро- и макрососудистых осложнений.

1.2 Роль глюкокиназы печени и поджелудочной железы в обмене

ГЛЮКОЗЫ

Глюкокиназа (гексокиназа IV), представляет собой цитоплазматический фермент, катализирующий превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат (G-6-P), тем самым снижая ее концентрацию в клетке. В дополнение к нейрональным/нейроэндокринным клеткам, глюкокиназа (далее ГК) селективно экспрессируется в панкреатических β -клетках и гепатоцитах. Глюкокиназу часто называют «сенсором глюкозы» в β -клетках. Концентрация глюкозы, при которой ГК демонстрирует полумаксимальную активность, составляет примерно 8.0 ммоль/л. Три других изоформа гексокиназы (гексокиназа I, гексокиназа II, гексокиназа III) чувствительны к более низким концентрациям глюкозы (<1.0 ммоль/л). Скорость поглощения глюкозы контролируется реакцией ее фосфорилирования, катализируемой ГК и приводящей к образованию G-6-P. В нормальных физиологических условиях и концентрациях ГК может фосфорилировать глюкозу, если ее концентрация выше 1-2 ммоль/л. ГК обладает низким сродством к глюкозе с $K_{0.5} = 6-10$ ммоль/л. Кроме того, ГК при физиологических концентрациях не ингибируется глюкозо-6-фосфатом [Hale C., 2015; Vella A., 2019].

Гексокиназа отличается от глюкокиназы высоким сродством к глюкозе и низким значением $K_m < 0,1$ ммоль/л. Следовательно, этот фермент, в отличие от глюкокиназы, активен при концентрации глюкозы в крови, соответствующей физиологической норме, и обеспечивает потребление глюкозы мозгом, эритроцитами и другими тканями между приемами пищи (постабсорбтивный период) [Kamata K., 2004; Nakamura A., 2015].

На рисунке 1.1 схематично представлены ГК-содержащие ткани и их взаимосвязь с другими тканями человеческого организма.

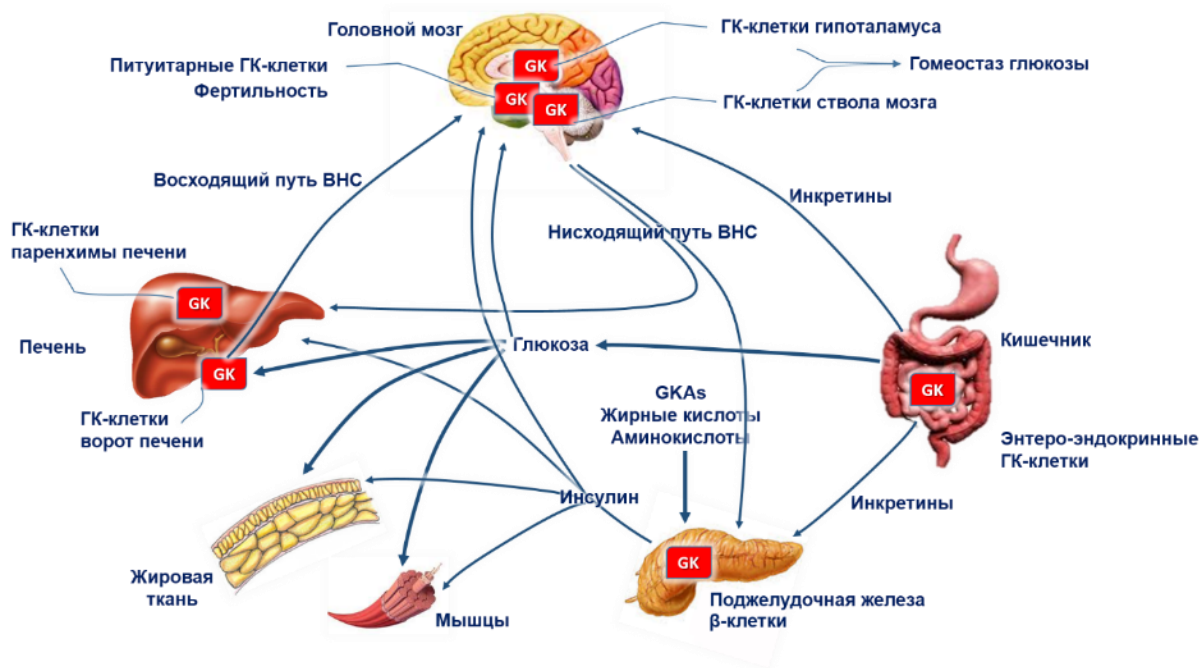


Рисунок 1.1. Органы и ткани, экспрессирующие глюкокиназу, и их взаимосвязь друг с другом [Matschinsky F.M., 2009].

Фосфорилирование глюкозы, катализируемое глюкокиназой, приводит к увеличению синтеза гликогена в печени и активации гликолиза. В поджелудочной железе глюкокиназа регулирует метаболический путь, в котором глюкоза преобразуется в пируват. В свою очередь, это приводит к увеличению активности цикла лимонной кислоты и транспорта электронов, увеличению соотношения АТФ/АДФ и способствует закрытию АТФ-чувствительных K^+ каналов, деполяризации мембраны и притоку ионов кальция. Это способствует превращению резервного пула гранул инсулина в легко высвобождающийся пул и, наконец, выходу инсулина в кровоток [Kamata K., 2004; Matschinsky F. M., 2011].

Стоит отметить, что активность печеночной ГК и внутриклеточное расположение ГК регулируется с помощью белка, продуцируемого гепатоцитами, называемого глюкокиназа-регуляторный белок (GKRP) [Hale C., 2015].

1.3 Изменения конформации глюкокиназы

ГК существует в различных конформациях, от которых зависит ее каталитическая активность. Существует два каталитических цикла: медленный цикл при низких концентрациях глюкозы и быстрый цикл при высоких (рис. 1.2) [Coghlan M., 2008]. Скорость цикла зависит от конформации фермента, при этом скорость взаимопревращения одной формы ГК достаточно низкая. Выделяют «супероткрытую», «открытую» и «закрытую» конформации фермента. Самый медленный переход – переход между «супероткрытой» и «открытой» формами, тогда как переход между «открытой» и «закрытой» формами протекает очень быстро. При низких концентрациях глюкозы глюкокиназа существует в виде «супероткрытой» низкоаффинной конформации, которая является энергетически выгодной. При наличии более высоких концентраций глюкозы «открытая» и «закрытая» формы энергетически благоприятны. Связывание субстратов глюкозы с ГК индуцирует образование открытых и закрытых форм, являющихся активированными формами ГК. Другими словами, при гипергликемии формируются «открытые» и «закрытые» высокоаффинные конформации, которые связаны с быстрым каталитическим циклом [Matschinsky F. M., 2009].

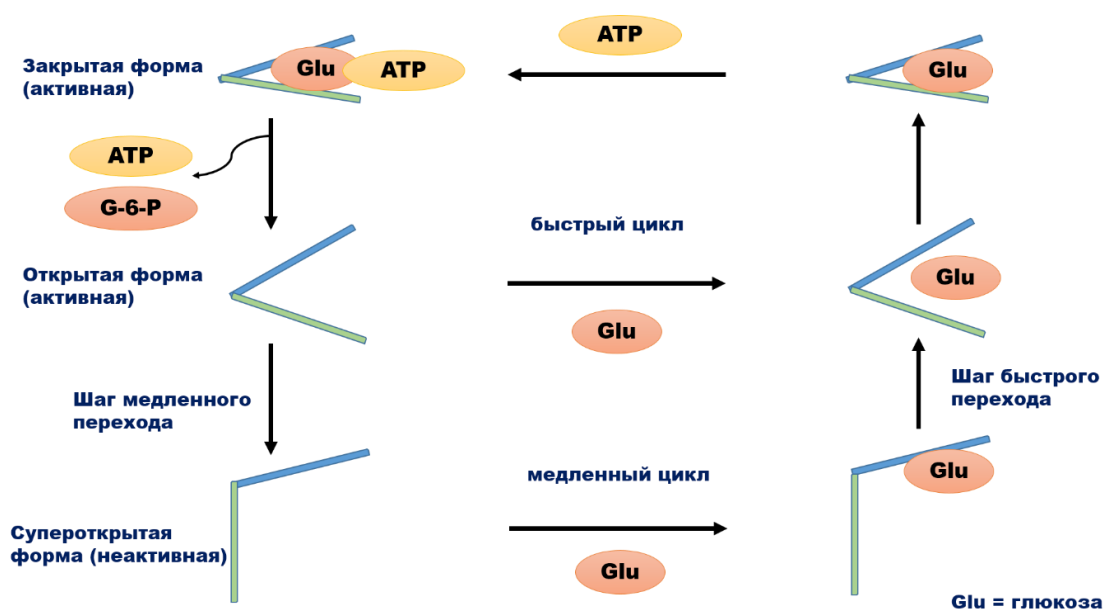


Рисунок 1.2. Конформационные циклы глюкокиназы.

Это двухцикловая и 3-х конформационная модель позволяет объяснить положительную кооперативность и сигмовидную кинетику, характерную для ГК [Coghlan M., 2008].

1.4 Значение глюкокиназы в регуляции массы β -клеток

Роль глюкокиназы как сенсора глюкозы в процессе секреции инсулина панкреатическими β -клетками общезначима [Wei P., 2009]. В тоже время, ее участие в регуляции функциональной массы β -клеток ранее не признавалось. Однако последние экспериментальные данные подтверждают эту точку зрения:

1. У мышей дикого типа на высокожировой диете отмечается заметная компенсаторная гиперплазия β -клеток, связанная с повышением их репликации, в то время как $Gck^{+/-}$ мыши не смогли показать подобной гиперплазии клеток, несмотря на такую же степень инсулинорезистентности. Тот факт, что гаплонедостаточность ГК привела к недостаточной гиперплазии β -клеток позволяет предположить, что ГК необходима не только для глюкозо-стимулированной секреции инсулина, но и для гиперплазии β -клеток в ответ на высокожировую диету, инсулинорезистентность, индуцированную диетой, т.е. для предотвращения развития сахарного диабета. Результаты этого исследования показывают, что ГК связана с пролиферацией и массой β -клеток [Kitao N., 2018].
2. В островках поджелудочной железы клеток дикого типа высокожировая диета активировала экспрессию IRS2 и IGF1R, и, наоборот, в островках $Gck^{+/-}$ мышей она была значительно ниже, что показывает необходимость в ГК для усиления активности IRS2 и IGF1R в β -клетках (рисунок 1.3). Вторичные эффекты хронической гипергликемии могут также внести свой вклад в снижение экспрессии IRS2 и IGF1R в островковых клетках $Gck^{+/-}$ мышей.
3. Гаплонедостаточность IRS2 приводит к недостаточной гиперплазии β -клеток. Так как в экспрессии IRS важную роль играет ГК становится понятна ее роль в пролиферации β -клеток и влияние на их массу [Terauchi Y., 2007].

4. Нарушение передачи сигналов кальция, вызванные гаплонедостаточностью ГК в сочетании с инсулинорезистентностью, вызванной высокожировой диетой приводит к нарушению фосфорилирования Ser133 CREB у $Gck^{+/-}$ мышей [Takamoto I., 2008].

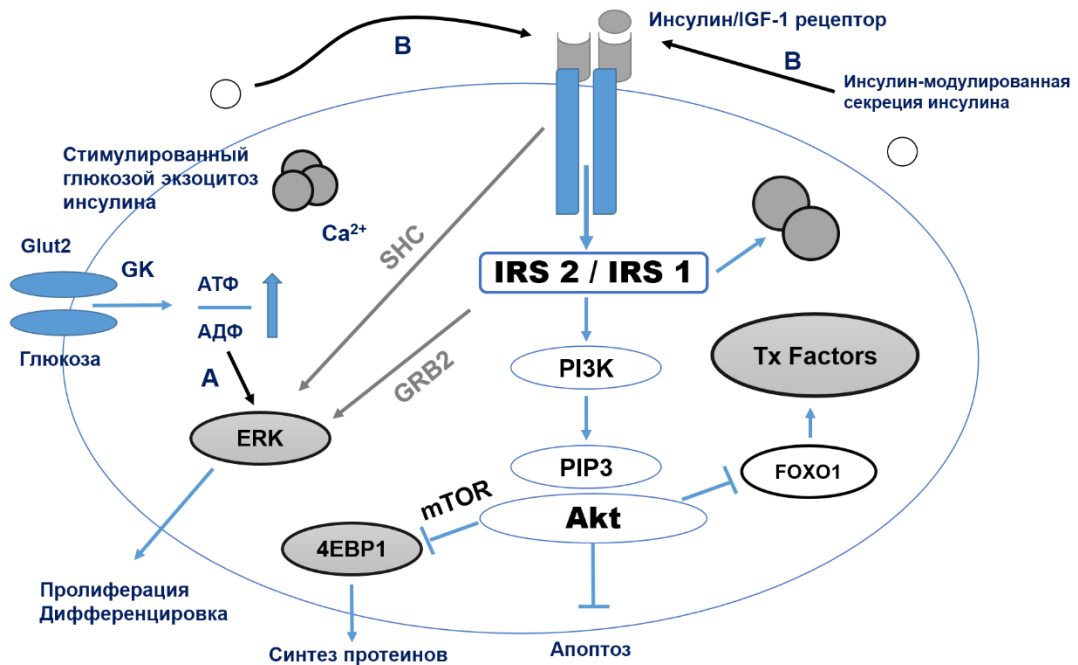


Рисунок 1.3. Участие глюкокиназы в регуляции массы β -клеток [Robey R.V., 2006].

1.5 Изменение активности глюкокиназы при сахарном диабете

Имеются веские доказательства того, что ГК β -клеток остается функционирующей при СД 2 типа, хотя общее содержание ГК, вероятно, уменьшается, потому что масса и функция β -клеток снижается по мере прогрессирования заболевания. Иная ситуация с ГК печени. Экспрессия ГК в печени может быть неизменна на фоне заболевания [Kamata K., 2004].

1.6 Мутации гена глюкокиназы

Результаты экспериментальных исследований на животных моделях позволяют предположить, что глюкокиназа является ключевым регулятором в поддержании гомеостаза глюкозы. Крысы с дефектом гена глюкокиназы в панкреатических β -клетках, страдают выраженной гипергликемией, а животные,

с генетическим дефектом глюкокиназы гепатоцитов обнаруживают снижение утилизации глюкозы и гипергликемию. С другой стороны, сверхэкспрессия глюкокиназы у крыс с диабетом вызывает улучшение толерантности к глюкозе и снижение содержания глюкозы в крови натощак [Matschinsky F.M., 2011].

В настоящее время описано около 200 мутаций гена глюкокиназы человека. Наиболее изучены мутации, при которых гетерозиготная или гомозиготная утрата функции ГК вследствие генетических нарушений приводит к юношескому диабету (MODY2 - Maturity Onset Diabetes of the Young) или тяжелому неонатальному диабету (PNDM) [Schober E., 2009].

Чтобы продемонстрировать многообразие нарушений углеводного обмена, связанных с мутацией глюкокиназы остановимся более подробно на MODY-диабете. MODY – группа генетических заболеваний с нарушенной функцией β -клеток поджелудочной железы. Распространенность MODY-диабета ориентировочно составляет 2-5% всех пациентов с сахарным диабетом. Заболевание моногенное с аутосомно-доминантным наследованием [Brunerova L., 2018].

Первые признаки MODY-диабета проявляются у детей, подростков и молодых людей. На данный момент известно 8 разновидностей MODY-диабета. Считается, что появление диабетических осложнений (сосудистых, нервных, глазных и др.) не зависит от типа MODY, а обусловлено лишь продолжительностью периода повышенного уровня сахара в крови.

MODY-3 встречается чаще всех остальных видов (70% всех MODY) и обусловлен мутациями гена HNF-1 α [Johansson B. B., 2007]. Кодируемый им белок участвует в синтезе РНК по матрице ДНК, для MODY-3 характерно:

- мягкое (с минимумом симптомов) начало в возрасте 20-40 лет (изредка позже), что затрудняет раннюю диагностику;
- обычно этот диабет расценивается как СД 1 типа;
- характерно отсутствие кетоацидоза;
- уровень С-пептида определяется в нормальных пределах при уровне глюкозы крови выше 8 ммоль/л;

- уровень сахара натощак может быть и в норме, но при глюкозотолерантном тесте нередко отмечается сильный прирост уровня гликемии в 5 ммоль/л и выше;
- глюкозурия при нормальном уровне гликемии;
- длительный (больше 3 лет) период «медового месяца» (*«медовым месяцем диабетика»*) называют период после начала лечения инсулином, когда изначально подобранные дозы инсулина сильнее обычного снижают уровень сахара, что вынуждает снижать их вплоть до временной отмены инсулинотерапии). Обычно удается добиться удовлетворительного уровня глюкозы назначением минимальных доз инсулина, однако начинать лечение рекомендуется именно с приема внутрь препаратов сульфонилмочевины;
- длительно отмечается высокая чувствительность к производным сульфонилмочевины, поэтому начальная доза препарата из группы сульфонилмочевины должна составлять 1/4 от начальной дозы взрослого [Schober E., 2009].

MODY-1 находится на третьем месте по частоте (после MODY-3 и MODY-2). Он обусловлен мутациями гена HNF-4 альфа. MODY-1 по клинической картине схож с MODY-3 за исключением нарушения почечного барьера (отсутствие глюкозурии при нормальном уровне гликемии).

MODY-2 является вторым по частоте среди всех MODY-диабетов, но протекает мягче по сравнению с MODY-3 и -1. MODY-2 возникает при мутациях гена фермента глюкокиназы. Этот тип сложен для диагностики, потому что или не имеет клинических проявлений, или проявляется как СД 2 типа. Для MODY-2 характерно [Pihoker C., 2013]:

- длительная умеренная гипергликемия натощак (5,5–8,5 ммоль/л);
- уровень HbA1c (гликозилированного гемоглобина) не превышает верхнюю границу нормы;
- при глюкозотолерантном тесте через 2 часа отмечается невысокий прирост уровня глюкозы крови (менее 3,5 ммоль/л).

Такое разнообразие заболеваний, связанных мутацией глюкокиназы, подтверждает важную роль глюкокиназы в поддержании гомеостаза глюкозы в организме, и способствовало разработке лекарственных препаратов, повышающих активность глюкокиназы – активаторов глюкокиназы [Schober E., 2009].

1.7 Активаторы глюкокиназы – новое, перспективное направление терапии сахарного диабета 2 типа

Разработка новых препаратов для лечения сахарного диабета 2 типа должна основываться на данных физиологии, химии, а также на современных взглядах на гомеостаз глюкозы и патофизиологию заболевания. Глюкокиназа является одной из перспективных мишеней для разработки противодиабетических препаратов вследствие того, что она играет исключительную роль в регуляции углеводного обмена, выступает в качестве «сенсора» глюкозы в β -клетках поджелудочной железы и контролирует скорость ферментативного синтеза гликогена в печени. Первый научный доклад о разработке и успешном доклиническом использовании активаторов глюкокиназы датируется 2003 годом. Вскоре последовали выдачи более чем 100 патентов на активаторы глюкокиназы различного химического строения, что демонстрирует заинтересованность исследователей в отношении этого класса противодиабетических препаратов [Deshpande A.M., 2017; Спасов А.А., 2017; Kurnianta P. D. M., 2020].

1.7.1 Действие активаторов глюкокиназы

Все активаторы глюкокиназы, описанные на сегодняшний день активируют глюкокиназу за счет увеличения сродства фермента к глюкозе. Исследования рентгеноструктурного анализа 3D-модели лиганд-белок продемонстрировали, что активаторы глюкокиназы связываются с ГК на аллостерическом сайте (рис. 1.4), удаленном от субстрат-связывающего и каталитического центров, а также увеличивают сродство фермента для глюкозы в силу стабилизации «закрытых» и «открытых» форм. При этом связывание с аллостерическим карманом ГК

становится невозможным в «супер-открытом» состоянии, в результате чего риск развития гипогликемии на фоне применения активаторов глюкокиназы минимален [Matschinsky F.M., 2010].

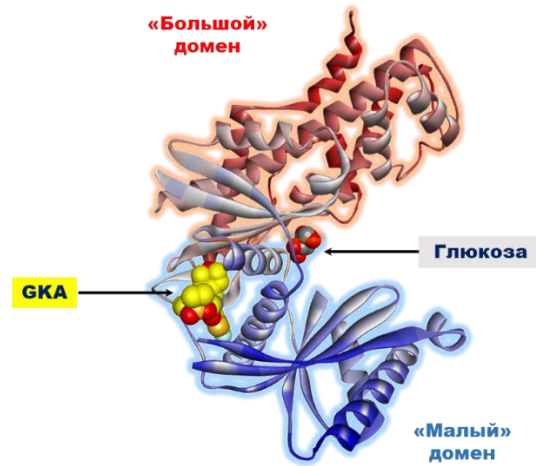


Рисунок 1.4. Структурная модель глюкокиназы. Отмечены центры связывания активаторов глюкокиназы и глюкозы.

Активаторы глюкокиназы активируют ГК печени и поджелудочной железы с одинаковой силой, а значит затрагивает несколько компонентов патогенеза сахарного диабета 2 типа (рис.1.5), что значительно усиливает их гипогликемическую активность [Rees M.G., 2013].



Рисунок 1.5. Механизм действия активаторов глюкокиназы на печень и поджелудочную железу [Rees M.G., 2013].

Основываясь на современных данных, приведем основные эффекты активаторов глюкокиназы [Nakamura A., 2015]:

- стимулируют фосфорилирование глюкозы в гепатоцитах и в панкреатических островках β -клеток;
- стимулируют гликолиз и синтез гликогена, ингибируя глюконеогенез и гликогенолиз в гепатоцитах;
- увеличивают стимулированную глюкозой секрецию инсулина;
- не влияют на стимулированную глюкозой секрецию инсулина в отсутствие глюкозы, что снижает риск развития гипогликемии;
- увеличивают сродство глюкокиназы к глюкозе;
- имитируют индуцированную гипергликемией транслокацию ГК из ядра в цитозоль;
- вызывают гипогликемию у животных с нормальным уровнем глюкозы крови, однако у животных с диабетом нормализуют показатели гликемии.

1.7.2 Современные активаторы глюкокиназы

С появлением первого сообщения о ключевой роли данной группы препаратов в гомеостазе глюкозы, их поиск стал зоной внимания практического здравоохранения. На сегодняшний день представлено несколько десятков ГКА, находящихся на различных этапах исследований. Остановимся на наиболее современных и перспективных активаторах глюкокиназы [Kurnianta P. D. M., 2020].

Углерод-центрированные активаторы глюкокиназы

а) Соединение RO0281675, производное N-тиазолилпропионамида (Hoffman-La Roche) – первый изученный активатор глюкокиназы, значительно увеличивает активность глюкокиназы и ее сродство к глюкозе. Соединение увеличивает АТРKm при базальном уровне глюкозы 5 ммоль/л, а также увеличивает глюкозо-стимулированную секрецию инсулина в изолятах β -клеток крыс. Таким образом, снижает уровень глюкозы крови в норме и при СД за счет стимуляции секреции инсулина и снижения выхода глюкозы из печени [Haynes N. E., 2010].

- b)** Соединение *LY2121260*, производное *N*-тиазолилциклопропан-1-карбоксамиды (*Eli Lilly*) – *in vitro* активирует рекомбинантную глюкокиназу, усиливает глюкозо-стимулированную секрецию инсулина в изолятах β -клеток у крыс, увеличивает содержание глюкокиназы в INS-1 клетках, стимулирует поглощение 2-дезоксид-3Н-глюкозы гепатоцитами крыс, однако однократная доза препарата вызывает выраженную гипогликемию, что ограничило дальнейшие исследования соединения [Wei P., 2009].
- c)** Соединение *PSN-GK1*, производное *N*-тиазолилпропионамида (*OSI*) - один из самых мощных активаторов глюкокиназы, стимулирует секрецию инсулина и увеличивает синтез гликогена в печени. Препарат показал хорошую гипогликемическую активность, однако исследование соединения прекращено на II фазе из-за значительного снижения уровня базальной глюкозы [Fyfe M. C. T., 2007].

Бензпиридин-центрированные активаторы глюкокиназы

- a)** Соединение *GKA-50*, производное бензоиламинопиридинкарбоновой кислоты (*Astra-Zeneca*) – *in vitro* потенцирует активацию глюкокиназы, стимулирует секрецию инсулина, вызывает зависящее от метаболизма увеличение объема β -клеток и устойчивую деполяризацию мембранного потенциала β -клеток [Wei P., 2009; McGlasson L., 2011].
- b)** Производное аминоксантина компании *Merck-Banyu* с номером патента *WO 2003080585* – мощный активатор глюкокиназы, используемый для кристаллизации глюкокиназы в человеческой печени. С помощью этого соединения изучена кинетика конформации глюкокиназы, в зависимости от связи с лигандом. Данные о фазе исследования соединения отсутствуют.

Гепатоселективные активаторы глюкокиназы

- a)** Соединение *TTP-399*, структура не раскрывается (*TransTech Pharma*) – нормализует показатели HbA_{1c} у пациентов с СД 2 типа после 6 недель лечения, не увеличивая уровень триглицеридов и не вызывая гипогликемии. Соединение находится во II фазе клинических испытаний [Hale C., 2015; Deshpande A.M., 2017; Vella A., 2019].

- b)** *Соединение GKM-001, структура не раскрывается (Advinus Therapeutics)* – снижает уровень глюкозы в плазме до нормальных значений, при терапии 40-кратным увеличением дозы в течение 14 дней, у пациентов с СД 2 типа инцидентов гипогликемии не отмечалось. В 2014 году соединение вошло во II фазу исследования [Pfefferkorn J. A. , 2013; Deshpande A.M., 2017].
- с)** *PF-04937319, производное пиримидинкарбоксамиды (Pfizer Inc.)*, на данный момент находится на II фазе исследования. Фармакокинетика на доклинических стадиях характеризовалась низким и средним периодом полувыведения [Robey R.V., 2006; Sharma R., 2014].

Активаторы глюкокиназы двойного действия – активирующие ГК и в поджелудочной железе, и в печени.

- a)** *Соединение RO4389620, или Piragliatin, производное N-пиразинилпропионамида (Hoffman-La Roche)* - увеличивает секрецию инсулина и захват глюкозы, снижает высвобождение глюкозы печенью, улучшает тест толерантности глюкозы у пациентов с сахарным диабетом. Препарат изучался в качестве монотерапии и в комбинации с метформином и дошел до II фазы исследования [Zhi J., 2016; Zhi J., R., 2017].
- b)** *Соединение MK0941, производное N – бензамида (Merck& Co.)* вызывает снижение уровня глюкозы у мышей линии C57BL/6J, получавших диету с высоким содержанием жиров (HFD), у мышей db / db, у мышей HFD+STZ и у мышей, не страдающих диабетом. Фармакокинетика на доклинических стадиях характеризовалась низким и средним периодом полувыведения (2 часа) [Eiki J., 2011]. Соединение находится во IIa фазе клинических испытаний, однако дальнейшие исследования были приостановлены [Zhu X. X., 2018].
- с)** *Соединение Dorzagliatin (HMS5552), производное N- метилпентанамида (Roche, Hua Medicine)* – новейший активатор глюкокиназы, находящийся на стадии III клинических испытаний. Улучшает толерантность к глюкозе и функцию β -клеток поджелудочной железы у пациентов с диабетом 2 типа,

находящихся на 28-дневном лечении, отобранных на основе заранее определенных биомаркеров [Zhu X. X., 2018].

Потенциальные преимущества и недостатки активаторов глюкокиназы. Несмотря на то, что ГКА рассматриваются в качестве перспективного направления терапии сахарного диабета их возможные положительные и негативные эффекты на молекулярном, клеточном и организменном уровне изучается по настоящее время.

Положительные эффекты применения активаторов глюкокиназы. Основываясь на основных эффектах активаторов глюкокиназы, описанных выше, можно сделать вывод, что ГКА имеют ряд потенциально позитивных качеств, позволяющих рассматривать эти соединения в качестве перспективного направления терапии сахарного диабета 2 типа: возможность контроля постпрандиального и уровня глюкозы крови натощак; минимальный риск гипогликемии; снижение продукции глюкозы в печени; положительное влияние на массу β -клеток [Nakamura A., 2015].

Вероятные негативные эффекты применения активаторов глюкокиназы. *Риск гипогликемии.* Несколько экспериментальных соединений продемонстрировали развитие выраженной гипогликемии (например, PSN-GK1), однако в подавляющем большинстве соединения ГКА показали высокий профиль безопасности в отношении уровня гликемии у пациентов и животных с сахарным диабетом [Vella A., 2019].

Увеличение образования гликогена в печени. Исследователями высказывались опасения, что активация ГК может привести к патологическому накоплению гликогена и липидов (стеатоз) в печени. Однако, в экспериментальном исследовании постоянный прием ГКА сопровождался устойчивым снижением уровня глюкозы в отсутствие неблагоприятного воздействия на циркулирующие липиды или липиды и гликоген печени.

Гипертриглицеридемия и увеличение массы тела. Существуют опасения, что влияние активаторов глюкокиназы на углеводный обмен и продукцию гликогена в печени может способствовать увеличению массы тела. Однако, на

сегодняшний день, нет сообщений о неблагоприятных влияниях препаратов данной группы на массу тела [Kurnianta P. D. M., 2020].

Влияние на фертильность. Обнаруженная экспрессия глюкокиназы в гонадотропной области гипофиза крыс и обезьян позволяет задать вопрос насколько зависит синтез гормонов и их секреция клетками этой зоны от глюкокиназы. И как скажется на фертильности длительная терапия ГКА. Ответа на эти вопросы пока нет.

Следует понимать, что малочисленность подробных данных о безопасности активаторов ГК у людей предостерегает от экстраполяции данных, полученных на животных моделях, и требует детального изучения [Ishikawa M., 2009].

1.8 Заключение

Таким образом, на основании приведенных литературных данных можно заключить, что потребность в создании и внедрении в клиническую практику новых, эффективных, безопасных препаратов для лечения сахарного диабета 2 типа остается актуальной. Стоит также отметить повышенное внимание исследователей к новому классу противодиабетических препаратов – активаторам глюкокиназы, поскольку данный класс характеризуется оптимальным профилем безопасности. При этом, наиболее значимыми положительными эффектами являются низкий риск гипогликемии, отсутствие влияния на уровень липидов, а также снижение массы тела, что подтверждено данными в доклинических и клинических испытаниях. Все вышперечисленное вызывает высокий интерес к поиску активаторов глюкокиназы в качестве веществ для коррекции метаболизма при сахарном диабете.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Правила и рекомендации к проведению экспериментальных исследований

Экспериментальная работа была проведена в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ в соответствии с «Принципами надлежащей лабораторной практики» [ГОСТ Р 33044-2014, 2015] и «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (Минздрав РФ, приказ № 199н от 1 апреля 2016 г.), с соблюдением директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Моделирование экспериментальных патологий осуществлялось согласно руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Миронов А. Н., 2012]. Все эксперименты были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (OHRP), протокол № 2090-2016 от 23 декабря 2016 года. Эвтаназию животных проводили согласно требованиям, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1997).

2.2 Перечень используемых реактивов и веществ

Для исследований использованы реактивы: гидроокись калия (ООО АГАТ-МЕД, Россия), гидрокарбонат натрия, кальций хлористый 2-водный, D-глюкоза (безводная), калий хлористый, магний хлористый 6-водный, магния сульфат, калий фосфорнокислый однозамещённый, калий фосфорнокислый двузамещённый, натрий хлористый, натрий фосфорнокислый двузамещённый, натрия хлорид 0,9% (Эском, Россия), хлорид железа (III) (ч., «Мосреактив» Россия); сульфат железа (Диа-М, Россия); трис гидрохлорид, трис(гидроксиметил)аминометан (Serva Feinbiochemica, Германия), стандарт-титр соляной кислоты 0,1 Н (ООО АО РЕАХИМ, Россия), серная кислота 95-98% (ООО АО РЕАХИМ, Россия), этанол 96% (Россия), диметилсульфоксид (ДМСО) (Fisher Scientific, США),

этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (MP Biomedicals, Inc., Франция), HEPES (GERBU, Германия), Tween 20 (Fisher Scientific, США), Tween 80 (Fisher Scientific, США), трихлоруксусная кислота (ТХУ) (Fisher Scientific, США), 1,4-дителиотреитоил (ДТТ) (Sigma, США), гликоген бычьей печени (Sigma, США), малахитовый зеленый (Sigma, США), глюкокиназа человеческой печени рекомбинантная, экспрессированная в *E. coli* (Sigma, США), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Sigma, США), гликоген бычьей печени (Sigma, США), динатриевая соль аденозин-5-трифосфорной кислоты (АТФ) (Sigma, США), коллаген (Sigma, США); натриевая соль β -никотинамидадениндинуклеотид фосфата (Sigma, США), тромбин (Sigma, США), перекись водорода 30% (ООО АО РЕАХИМ, Россия), глюкоза/лактат гемолизирующий раствор (EKF Diagnostics, Германия), карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) (Sigma, США), стрептозотоцин (Sigma, США), 10% забуференный нейтральный формалин (ООО МоДиТех, Казань), физиологический раствор (ООО «Мосфарм» Россия), хлоралгидрат (Panreac Química S.L.U., Испания), двухфазный инсулин «ХУМУЛИН МЗ» (Eli Lilly, Франция); цитрат натрия (ч.д.а., Реахим, Россия), бычий сывороточный альбумин (BSA) фракции V (BioWest, Франция), аскорбиновая кислота (Chemapol, Чехия), (Sigma, США); 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ•) (Sigma, США), гемоглобин бычий (Sigma, США), люминол (Serva, Германия), эпинефрин (Sigma, США), fetalная бычья сыворотка (BioClot, Германия), LPS *E. coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, США), раствор МТТ (Sigma, США), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США), гексацианоферрат калия (III), (Диа-М, Россия); феррозин (Sigma, США), реактив Элмана (дитионитробензойная кислота) (Sigma, США), стерильный раствор Хенкса (ПанЭко, Россия), реактив Грисса (Sigma, США), среда DMEM («ПанЭко», Россия); 10% эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко», Россия); гентамицин («НПО Микроген», Россия).

Наборы: набор для определения концентрации общего белка в моче и ликворе методом с пирогаллоловым красным (кат. В 06.03, Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия), набор для количественного определения инсулина в сыворотке и плазме крови Human Insulin ELISA Kit (Cusabio, США).

Красители: синий флуоресцентный краситель DAPI (Sigma, США), гематоксилин и эозин (ООО МоДиТех, Казань), трипановый синий («ПанЭко», Россия).

В качестве препаратов сравнения были использованы: PF-04937319 (Sigma, США), вилдаглиптин (Sigma, США), метформин (ООО Озон, Россия), тролокс ((±)-6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) (Sigma, США); ALT-711 (алагебриум) (Kailu Xingli Pharmaceutical Co., Ltd., Китай); ацетилсалициловая кислота (Sigma, США); Кверцетин (Диа-М, Россия); аминоксантина (Aldrich, Китай), лозартан (Sigma, США), липоевая кислота (Sigma, США), пиоглитазон (Sigma, США), пиридоксамин (Sigma, США).

Изучено 154 соединений под лабораторными шифрами «1», «2», «3», «14102», «14144», «ACI», «AHIV», «AZH», «B», «BIF», «D», «DF», «DAB», «GA», «GEPP», «GEPR», «GESU», «GSSG», «HC», «IS», «KD», «KHFA», «L-Cis», «LOSMD», «LOSUK», «MSD», «N», «NP», «R», «ROM», «RU», «RUS», «RYUVK», «SHQU», «SB», «SP», «SUM», «Titova», «TONS», «V», из которых 17 соединений относится к производным бензимидазола, 2 соединения – производные бифенила, 8 соединений – к производным бифенилоксида, 5 соединений – к производным бис-пиридина, 4 соединения - к производным 4H-дiazепинобензимидазола, 2 соединения – производные дигидробензофурана, 15 соединений – производные имидазобензимидазола, 2 соединения - к производным пептидомиметиков, 53 соединения – к производным пиридина, 16 соединений – производные пиримидина, 12 соединений – производные хиназолина, 2 соединения – производные тиазолидиндиона, 6 соединений – производные тиазолбензимидазола, 11 соединений – производные триазолопиримидина (электронное приложение 1).

Исследуемые вещества под лабораторными шифрами «ACI», «AZH», «BIF», «DAB», «DF», «KD», «RU», «RUS», «RYUVK», «LOSUK» и «LOSMD» синтезированы в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета ведущим научным сотрудником, к.х.н. В. А. Анисимовой и научным

сотрудником, к.х.н. О. Н. Жуковской¹. Исследуемые вещества под лабораторными шифрами «TONS», «Titova» синтезированы сотрудниками Волгоградского государственного технического университета: доцентами кафедры технологии органического и нефтехимического синтеза, к.х.н. В. С. Лобасенко и к.х.н. Т. К. Корчагиной под руководством заведующего кафедрой, д.х.н., профессора Ю. В. Попова². Исследуемые вещества под лабораторными шифрами «1», «2», «3», «14102», «14144» синтезированы сотрудниками Самарского государственного технического университета под руководством Ю. Н. Климочкина, д.х.н., профессора, заведующего кафедрой, проректора по научной работе СамГТУ.³ Исследуемые вещества под лабораторными шифрами «SHQU», «GESU», «GEPP», «GEPR» синтезированы сотрудниками Волгоградского государственного медицинского университета, кафедры фармацевтической и токсикологической химии под руководством заведующего кафедрой д.х.н., профессора Озерова А.А.⁴ Исследуемые вещества под лабораторными шифрами «АНIV», «B», «D», «GA», «GSSG», «L-Cis», «MSD», «N», «NP», «R», «ROM», «SP», «Sb», «V» были синтезированы сотрудниками Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского федерального университета по руководством д.х.н., профессора Ю.Г. Штырлина.⁵ Исследуемые вещества под лабораторными шифрами «KNFA», «SUM» были синтезированы сотрудниками Башкирского государственного медицинского университета, под руководством д.фарм.н., профессора,

¹ Выражаем глубокую признательность ведущему научному сотруднику НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, к.х.н. В. А. Анисимовой и научному сотруднику, к.х.н. О. Н. Жуковской за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

² Выражаем глубокую признательность сотрудникам Волгоградского государственного технического университета – заведующему кафедрой технологии органического и нефтехимического синтеза, д.х.н., профессору Ю. В. Попову, доценту кафедры технологии органического и нефтехимического синтеза, к.х.н. В. С. Лобасенко, доценту кафедры технологии органического и нефтехимического синтеза, к.х.н. Т. К. Корчагиной за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

³ Выражаем глубокую признательность сотрудникам Самарского государственного технического университета – д.х.н., профессору Климочкину Ю. Н., к.х.н. Леоновой М. В. за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

⁴ Выражаем глубокую признательность сотрудникам Волгоградского государственного медицинского университета, кафедры фармацевтической и токсикологической химии – д.х.н., профессору Озерову А. А., к.фарм.н. Гейсману А.Н. за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

⁵ Выражаем глубокую признательность сотрудникам Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского федерального университета – д.х.н., профессору Штырлину Ю.Г., к.х.н. Дзюркевичу М.С. за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

заведующего кафедрой фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии Халиуллина Ф.А.⁶ Исследуемые вещества под лабораторными шифрами «НС» были синтезированы сотрудниками Института органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук (ИОС УрО РАН) на кафедре органической и биомолекулярной химии, под руководством доцента, к.х.н. Русинова Г. Л.⁷

2.3 Список используемого оборудования и программного обеспечения

Термошейкер для планшетов PST-60HL (Biosan, Латвия), рН-метр рН213 (HANNA Instrumento, Германия), магнитная мешалка MSH-300 (Biosan, Латвия), весы лабораторные Adventurer AR2140 (OHAUS Europe, Швейцария), весы Scout Pro SPU601 (OHAUS, США), центрифуга MultiCentrifuge CM-6M (Elmi, Латвия), микроцентрифуга Minispin (Eppendorf, Германия), вортекс Elmi V-3 (Elmi, Латвия), микропланшетный ридер Infinite M200 (Tecan, Швейцария), гомогенизатор Поттера с электрическим приводом МШ-2 (Россия), термостат воздушный BINDER BD 115 (115л) (Германия), баня серологическая СБ-СЛ-01М (Россия), спектрофотометр цифровой PD-303UV (Arel, Япония), биохимический анализатор Biosen C_Line (EKF Diagnostics, Германия), ультразвуковая ванна 4,0 л (Сапфир, Россия), центрифуга SIGMA 2-16KL универсальная с охлаждением, до 15300 об/мин (Sigma Laborzentrifugen, Германия), глюкометр «Глюкокард» (Россия); тест-полоски для глюкометра «Глюкокард Сигма-Мини» (ООО «АРКРЭЙ», Россия), роторный микротом «Microm НМ 325» (Thermo scientific, США), адгезивные стекла с поли-L-лизином (Sigma-Aldrich, США) шейкере «KS 4000I control» (ИКА, Германия); флуоресцентный микроскоп «Axio imager.A2» (Карл Цейсс, Германия); агрегометр Viola 220 LA (ООО НФП "Биола", Россия), двухканальный анализатор агрегации тромбоцитов ChronoLog - 700 Lumi-

⁶Выражаем глубокую признательность сотрудникам Башкирского государственного медицинского университета - заведующему кафедрой фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии д.фарм.н., профессору Халиуллину Ф.А.

⁷Выражаем глубокую признательность сотрудникам Института органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук (ИОС УрО РАН) – к.х.н., доценту Русинову Г.Л., м.н.с. Распутину Н. А.

Aggregomete ("Chronolog", США), кюветы стеклянные ("Chronolog", США), металлический гастральный зонд (ОАО «МИЗ- Ворсма», Россия), ультразвуковой доплерограф («Минимакс-Допплер–К» Санкт-Петербург), планшет Greiner 96 Flat Bottom White, 96-луночные прозрачные планшеты (SPL Life Sciences Co., Ltd., Корея); чашки Петри («Минимед», Россия); инвертированный микроскоп («Zeiss», Германия).

Для исследований использовано следующее программное обеспечение: программный пакет ChemOffice 8.0 (CambridgeSoft, США), Gephi версия 0.9 (The Gephi Consortium, Франция), компьютерная программа AGGR версия 4.0 (Биола, Россия), ПО LabScribe3.0™ (iWorx Systems, Inc., США), ПО PowerGraph 3.3 (ООО ДИСофт, Россия), ПО i-control™ для микропланшетных ридеров Tecan (Tecan, Швейцария), ПО для спектрофотометра PD-303UV версия 3.0 (ApeI, Япония); программа Isis (MetaSystems, Германия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, США), Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office, США), Statistica 6.0 (Statsoft, США).

2.4 Экспериментальные животные

Фармакологические исследования проводились на лабораторных животных: 110 нелинейных крысах-самцах массой 200-350 г (филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, ветеринарное свидетельство № 860665249 от 01.10.18 г.); 90 нелинейных мышах обоего пола массой 20-30 г (ООО «НИЦ БМТ», ветеринарное свидетельство № 0725507 от 01.09.17 г.); 6 кроликах-самцах породы Шиншилла массой 3-3,5 кг (филиал «Электрогорский» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, ветеринарное свидетельство № 1544756883 от 27.02.2019 г.); 50 мышах-самцах линии C57bl/6J массой 20-23 г (ООО «НИЦ БМТ», ветеринарное свидетельство № 1376917942 от 24.01.19 г.).

Животные содержались в стандартных условиях вивария Волгоградского государственного медицинского университета с естественным световым режимом при относительной влажности воздуха 40-50% и температуре 22-24°C на

стандартной диете для лабораторных животных [ГОСТ Р 50258-92, 1992]. Содержание животных и экспериментальные манипуляции отвечали международным рекомендациям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (1986), а также правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ в соответствии с «Принципами надлежащей лабораторной практики» [ГОСТ Р 33044-2014, 2015] и «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (Минздрав РФ, приказ № 199н от 1 апреля 2016 г.).

2.5 Методы компьютерной обработки информации

В настоящей работе в качестве материалов выступали данные по 2D-структуре 155 новых соединений, а также оригинальный банк данных по структуре известных соединений, экспериментально изученных мировым научным сообществом на глюкокиназную активность.

Исследования *in silico* были выполнены в несколько этапов.

1. Формирование базы данных по структуре новых соединений.
2. Формирование оригинального банка данных по структуре и уровню активности известных активаторов глюкокиназы.
3. Консенсусный прогноз уровня активирующей ГК активности новых соединений по расчетным оценкам, полученным с использованием трех систем компьютерного прогноза.
4. Моделирование с помощью технологии искусственных нейронных сетей зависимости активирующей ГК активности новых соединений от ее расчетных прогнозных оценок, полученных с использованием пяти различных методов с помощью трех систем компьютерного прогноза.
5. Анализ молекулярного механизма связывания с сайтом ГК наиболее активных новых соединений.
6. Консенсусный прогноз *in silico* показателей ADMET наиболее активных новых соединений.

Использовалось следующее программное обеспечение: СУБД 9.0

[PerkinElmer, 2017], программный комплекс ИТ Микрокосм 7.2 [Свидетельство, 2011; Vassiliev, 2014], система Microcosm BioS 18.1.9 [Vassiliev, 2014; Васильев, 2016; Khomenko, 2019], PASS Pro 10.4 [Свидетельство, 2006], программы MarvinSketch 17.1.23 [MarvinSketch, 2019], МОРАС2016 [МОРАС, 2019], AutoDock Vina 1.1.1 [Trott, 2010], AutoDockTools 1.5.2 [MGLTools, 2011], PyRx 0.8 [PyRx, 2017], Statistica 8.0 [Statistica, 2019], LigandScout 4.2 Advanced [Inte:ligand, 2018], система Microcosm ADMET 6.6.17 [Васильев, 2016; Свидетельство, 2011; Vassiliev, 2014], программа DruLiTo [DruLiTo, 2018], on-line ресурсы GEB [GEB, 2018], ADMET-PreServ [ADMET-PreServ, 2018], ProTox [ProTox, 2018], admetSAR [admetSAR, 2018], pkCSM [pkCSM, 2018], SwissADME [SwissADME, 2018].

Итоговая *in silico* оценка уровня конкретного фармакологического эффекта выполнялась путем консенсусного обобщения оценок, полученных с помощью нескольких программных приложений.

База данных по структуре новых соединений. Была сформирована с помощью СУБД ChemFinder 9.0 [PerkinElmer, 2019] и включала структуры 155 новых соединений (в том числе референсного препарата PF-04937319).

Банк данных по известным активаторам глюкокиназы. Информация о химической структуре и активирующей ГК активности была получена из международных поисковых систем по биологически активным соединениям ChEMBL [ChEMBL, 2015], BindingDB [BindingDB, 2015] и PubChem [PubChem, 2015]. Химические формулы из первичных наборов данных были проверены и приведены к стандартному виду – проведена валидация структур, проверены связи и валентности, развернуты многоатомные функциональные группы, а также введены солеобразующие остатки. Все данные были объединены в один набор и проверены на наличие дублей структур. Биологические данные по активности известных соединений в отношении ГК были получены в 93 различных методиках. С целью их унификации сходные по условиям экспериментального тестирования данные были объединены в 12 общих групп. В каждой такой группе с использованием программы Statistica 8.0 [Statistica, 2019] был выполнен кластерный анализ с разделением на 5 групп активности: high, moderate, low,

inverse, inactive. Полученные метки уровня активности были занесены в первичную базу данных и проверены на непротиворечивость. Структуры, для которых было получено несколько несовпадающих градаций активирующей ГК активности, из первичной базы данных исключались. Итоговый банк данных был сформирован с помощью СУБД ChemFinder 9.0 [PerkinElmer, 2019] и включал 1080 известных соединений, получено свидетельство о его государственной регистрации [Свидетельство, 2016].

Консенсусный прогноз уровня активирующей ГК активности новых соединений. Был выполнен с использованием трёх систем компьютерного прогноза – ИТ Микрокосм (консенсусный прогноз по стратегиям), Microcosm BioS (консенсусный прогноз по сходству), AutoDock Vina (прогноз методом ансамблевого докинга).

Программный комплекс ИТ Микрокосм 7.2 [Свидетельство, 2011]. Был использован для консенсусного прогноза уровня активирующей ГК активности новых соединений по банку данных известных активаторов ГК [Свидетельство, 2016]. Прогноз осуществлялся с использованием четырех математических методов (Байеса, расстояния, ближайшего соседа, локального распределения) по 11 уровням описания химической структуры дескрипторами языка QL, с последующим обобщением спектра промежуточных прогнозных оценок на основе трех стратегий голосования (консервативной, нормальной и рискованной) [Vassiliev, 2014]. В рамках каждой стратегии результаты прогноза различных уровней активности неиспытанных соединений обобщались в консенсусные оценки, с одновременной проверкой спектра прогнозных оценок на непротиворечивость. Полученные по стратегиям консенсусные оценки затем также обобщались, причем соединение считалось активным при наличии хотя бы одной положительной оценки (супремальный консенсус).

Система Microcosm BioS 18.1.9 [Васильев, 2016; Khomenko, 2019]. Была использована для консенсусного прогноза уровня активирующей ГК активности новых соединений методом максимального сходства к эталонам, по оригинальной QSAR-базе, содержащей верифицированную, структурированную и обработанную

информацию по химической структуре 625888 известных соединений, изученных мировым научным сообществом на 11509 различных видов таргетной биологической активности в отношении 6016 биомишеней для 325 видов тестовых организмов. В настоящем исследовании прогноз уровня активности был сделан для ГК Homo sapiens, число ближайших эталонов задано равным 20. Консенсусной оценкой уровня ГК активирующей активности прогнозируемого соединения служило среднее значение индексов ожидаемого уровня активности, рассчитанных для ближайших эталонов, структурно наиболее сходных с данным соединением.

Программа AutoDock Vina 1.1.1 [Trott, 2010]. Была использована для прогноза уровня активирующей ГК активности новых соединений методом ансамблевого докинга, технологическая схема которого детально описана в работе [Васильев, 2016]. Экспериментальная рентгеноструктурная 3D-модель глюкокиназы человека 4IXC была получена по спискам базы знаний UniProtKB [UniProtKB, 2015] из базы данных PDBe [PDBe, 2015]. Расположение аллостерического сайта было определено с использованием информации о связывающих аминокислотах по данным работы [Cheruvallath, 2013]. 3D-молекулярные модели новых соединений были построены по их структурным формулам и затем оптимизированы – последовательно, методами молекулярной механики с помощью программы MarvinSketch 17.1.23 [MarvinSketch, 2019] и полуэмпирическим квантово-химическим методом PM7 с помощью программы MOPAC2016 [MOPAC, 2019]. Подготовка 3D-моделей лигандов и 3D-модели ГК для докинга производилась с помощью программы AutoDockTools 1.5.2 [MGLTools, 2011], формирование пространства сайта выполняли в программе PyRx 0.8 [PyRx, 2017]. Ансамблевый докинг выполняли в потоковом режиме с помощью программы AutoDock Vina 1.1.1 [Trott, 2010], мерой аффинности соединения служила минимальная величина энергии докинга ΔE для 45 конформеров докируемой структуры.

Расчет консенсусных оценок уровня активирующей ГК активности. Пять аутентичных прогнозных оценок уровня ГК активирующей активности новых соединений, которые были получены в указанных выше трех компьютерных системах, были переведены в пять порядковых показателей, принимающих

значение от 0 до 3 баллов: Ind(Cons), Ind(Norm), Ind(Risk) – для ИТ Микрокосм; Ind(BioS) – для системы Microcosm BioS; Ind(Dock) – для докинга в AutoDock Vina. Интегральной консенсусной оценкой активирующей ГК активности нового соединения *S* является среднее значение этих пяти показателей IndC (Gen).

Нейросетевое моделирование зависимости активирующей ГК активности новых соединений от ее расчетных прогнозных оценок. Было выполнено в два этапа: методом кластерного анализа и затем с использованием технологии искусственных нейронных сетей.

Кластеризация экспериментальных значений активирующей ГК активности. Была проведена с использованием программы Statistica 8.0 [Statistica, 2019] методом *k*-средних. Число кластеров полагали равным двум, что соответствует классам соединений с высокой «high» и умеренной «moderate» активностью; отдельно сформирован класс неактивных «inactive» соединений.

Построение искусственных нейронных сетей. Классификационные модели для прогноза уровня ГК-активирующей активности новых соединений были построены по методике искусственных многослойных перцептронных нейронных сетей с помощью модуля Statistica Neural Networks [Нейронные, 2008] программы Statistica 8.0 [Statistica, 2019]. В качестве входных нейронов выступали пять расчетных прогнозных оценок ГК активности, полученных с помощью пяти методов компьютерного прогноза – Ind (Cons), Ind (Norm), Ind (Risk), Ind (BioS), Ind (Dock). Выходными нейронами служили градации экспериментальной ГК активности, полученные в результате кластерного анализа. В соответствии с теоремой Колмогорова [Колмогоров, 1958], с помощью двухслойной искусственной нейронной сети может быть аппроксимирована зависимость любой сложности. Поэтому в настоящем исследовании использовалась архитектура сети в виде двухслойного перцептрона MLP k - m -2 с узким горлом (bottleneck). Здесь k – число входных нейронов, в данном случае 5; m – число скрытых нейронов, устанавливается программой от 3 до 4, поскольку $2 < m < k$. В программе Statistica при построении перцептронных сетей для скрытого и выходного слоев используются пять наиболее распространенных активационных функций,

попарный перебор которых также осуществляется программой. Обучение нейросетей в программе Statistica проводится с использованием алгоритма обратного распространения ошибок. С целью достижения наилучшего результата обучения число сетей для обучения было увеличено с 20 до 200, а число наилучших автоматически отбираемых сетей – с 5 до 50. После окончания обучения для заданного уровня активности из 50 лучших отобранных программой нейросетей по совокупности характеристик точности обучения и тестирования вручную отбирали лучшую. Для двух полученных нейросетей была выполнена оценка общей точности прогноза, проведен ROC-анализ и рассчитана достоверность прогноза по точному критерию Фишера.

Анализ молекулярного механизма связывания с сайтом ГК. Был выполнен для двух активных новых соединений и для референсного препарата PF-04937319 в 3D-модели глюкокиказы 4IXC с помощью программы LigandScout 4.2 Advanced [Inte:ligand, 2018].

Исследование признаков лекарственного подобия ADMET наиболее активных соединений. Консенсусный прогноз острой токсичности LD₅₀ и класса токсичности.

Все расчетные значения LD₅₀, полученные с помощью Microcosm ADMET, admetSAR, pkCSM и ProTox, пересчитывались в показатели с размерностью мг/кг. В соответствии с этими показателями LD₅₀, отдельно каждой для группы значений, полученных разными программными средствами, определяли класс токсичности по OECD. Для каждого соединения вычисляли среднее значение LD₅₀ и по нему определяли класс токсичности по OECD. Дополнительно, по оценкам, полученным разными программными средствами, вычисляли средний класс токсичности по OECD.

Консенсусный прогноз специфической токсичности. Для получения интегральной консенсусной оценки канцерогенной опасности усредняли все индексы наличия канцерогенности (0, 1), полученные с помощью различных программных средств по всем градациям канцерогенной активности. Аналогично рассчитывали интегральные консенсусные оценки для мутагенности,

гепатотоксичности и цитотоксичности.

Для иммунотоксичности, нефротоксичности, нейротоксичности и гематотоксичности отдельные интегральные консенсусные оценки не рассчитывались, так как для этих видов активности было найдено только по одной бинарной оценке (0,1), полученной одним методом – для иммунотоксичности с помощью ProTox, для остальных – с помощью PASS.

По этим четырем показателям была рассчитана общая интегральная консенсусная оценка.

Оценка кардиотоксичности была проведена четырьмя различными программными средствами, из которых двумя методами было получено четыре бинарных оценок (0,1), а в двух случаях были рассчитаны три непрерывных показателя, которые, с целью дальнейшего использования в расчете интегральной консенсусной оценки, были переведены в бинарные характеристики.

При обработке полученных в ADMET-PreServ показателей pK_i и pIC_{50} считали индекс кардиотоксичности равным 1, если величина pK_i (или pIC_{50}) больше максимума кривой распределения данного показателя (находится справа от него, см. рис. 10) и 0 – в противном случае.

По полученным шести бинарным показателям была рассчитана интегральная консенсусная оценка кардиотоксичности.

Консенсусный прогноз фармакокинетических параметров. Численная оценка проникновения соединений через гематоэнцефалический барьер была получена путем усреднения значений $\log BB$, полученных с помощью трех различных программных средств.

Был выполнен перевод числовых значений $\log BB$ в бинарную форму (0,1) по следующему правилу: индекс проникновения через ГЭБ полагали равным 1, если $\log BB > 0$ и 0, если $\log BB \leq 0$. Дополнительно, с помощью еще двух программных средства были получены бинарные оценки проникновения через ГЭБ. По полученным пяти бинарным показателям была рассчитана интегральная консенсусная оценка проникновения через ГЭБ.

Численная оценка всасываемости через ЖКТ была получена путем усреднения

значений, полученных с помощью четырех различных программных средств.

Консенсусный прогноз способности соединений метаболизироваться цитохромами CYP450. Общая способность взаимодействовать с CYP450 была оценена с помощью программы PASS в виде бинарных оценок по 96 показателям. По полученным значениям была рассчитана интегральная консенсусная оценка способности взаимодействовать с CYP450.

Способность метаболизироваться печеночными CYP450 была оценена с помощью четырёх программных средств в виде набора бинарных показателей для каждого программного средства:

- PASS – 5 показателей;
- admetSAR – 8 показателей;
- pkCSM – 7 показателей;
- SwissADME – 5 показателей.

Если соединение оценивалось как субстрат, значение индекса принималось равным 1 (метаболизируется печенью), 0 – в противном случае.

Если соединение оценивалось как ингибитор, значение индекса принималось равным 0 (не метаболизируется печенью), 1 – в противном случае.

По полученным бинарным показателям была рассчитана интегральная консенсусная оценка способности метаболизироваться печеночными CYP450.

Консенсусная интегральная оценка общей безопасности новых соединений. По совокупности значений интегральных консенсусных оценок: канцерогенности, мутагенности, гепатотоксичности, цитотоксичности, иммунотоксичности, нефротоксичности, нейротоксичности, гематотоксичности, кардиотоксичности; проникновения через ГЭБ – была рассчитана интегральная оценка общей безопасности 3 изучаемых новых соединений.

2.6 Скрининговые модели и методы для изучения фармакологических свойств новых производных азотсодержащих гетероциклических соединений

2.6.1 Метод изучения влияния веществ на активность глюкокиназы *in vitro*

Активность глюкокиназы (ГК человеческой печени рекомбинантная, экспрессированная в *E. coli*, Sigma, 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, 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: 0,025 М буфера HEPES (pH 7,2), 25 ммоль/л KCl, 5 ммоль/л D-глюкозы, 1 ммоль/л АТФ, 1,8 ммоль/л NAD, 2 ммоль/л MgCl₂, 1 ммоль/л ДТТ, тестируемое соединение или 5% раствор ДМСО, 1.8 ЕД/мл Г6ФДГ и 2 мкг/мл ГК. Исследуемые соединения вносили в 5%-ном 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.; Биззаро Т.Ф., 2010]. 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 (Tecan, Швейцария).

Активность веществ определялась в конечной концентрации 100 мкМ. Для соединений, повышавших активность ГК более чем на 50% по отношению к контрольному уровню, выполнялись исследования в диапазоне концентраций от 1 до 300 мкМ.

Оценку полученных результатов для веществ проводили в сравнении с данными литературы для экспериментального активатора ГК – PF-04937319 [Sharma R., 2014].

2.6.2 Пероральный тест толерантности к глюкозе

Изучение перорального теста толерантности к глюкозе исследуемых веществ проводилось на интактных животных, которые в течение 6 часов находились на свободном питьевом режиме при полной пищевой депривации. Половозрелых нелинейных крыс-самцов содержали в стандартных клетках по 5 особей при температуре 25 °С и стандартном световом режиме. Были сформированы контрольная и опытные группы по 5 животных. В момент времени -30 мин. животным опытных групп были введены изучаемые вещества в дозе 30, 300 и 500 мг/кг (внутрижелудочно и внутрибрюшинно), солюбилизированные в 1% растворе натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы. Животным контрольной группы введен растворитель (1% водный раствор КМЦ) в том же объеме. В момент времени 0 мин. животным введена глюкоза в дозе 2 г/кг перорально. Образцы крови забирали из хвостовой вены в 0, 30, 60, 90 и 120 мин [GoTo Y., 1975; Futamura M., 2006]. Кровь отбирали из хвостовой вены мерным капилляром типа "end-to-end" объемом 20 мкл и гемолизировали в 1 мл гемолизирующего раствора глюкоза/лактат. Уровень глюкозы в плазме крови определяли с помощью биохимического анализатора Biosen C_Line (EKF Diagnostics, Германия).

2.7 Методы оценки зависимости фармакологической активности изучаемых соединений от их химической структуры

Методы исследования количественной связи между химической структурой веществ и их биологической активностью основаны на описании структуры соединения с помощью набора структурных фрагментов или физико-химических параметров и последующем анализе соотношений между величиной активности и их значениями [Baskin I.I., 1997; Zefirov N.S., 2002].

В настоящей работе использована традиционная фрагментация структурных формул соединений на базовую структуру и присоединенные к ней отдельные заместители, позволяющая достаточно просто выявлять эмпирические SAR закономерности.

Для изучения зависимости между структурой исследуемых соединений и их биологической активностью использовался эмпирический метод, учитывающий базовую структуру, а также изменение заместителей в гетероциклической системе.

2.8 Методы исследования антидиабетической активности соединений при хроническом введении

Продолжительность эксперимента составила 97 дней. Дизайн исследования представлен в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Дизайн исследования

Манипуляция	День эксперимента		
	1-70	71-91	92-97
Высокожировая диета			
Контроль развития патологии (ИТТГ)	70		
Введение тестируемых соединений			
Определение массы тела	1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70	77, 84, 91	
Определение концентрации глюкозы в крови	1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70	77, 84, 91	
Интраперитонеальный тест толерантности к глюкозе	70	91	
Эвтаназия			92, 93
Морфометрические исследования жировой ткани			92, 93
Забор биоматериала (кровь, печень) для дальнейшего анализа			92, 93
Определение уровня инсулина в плазме крови	69		94
Определение биохимических показателей плазмы крови			95
Анализ биохимических показателей в гомогенате печени			96-97

Моделирование сахарного диабета 2 типа высокожировой диетой (ВЖД) на мышцах линии C57BL/6J. Экспериментальную форму сахарного диабета 2 типа моделировали высокожировой диетой (ВЖД) на мышцах линии C57BL/6J, массой 22-23 г (возраст 12 недель). Всем животным предоставляли свободный доступ к воде. Высокожировая диета: комбикорм для крыс экструдированный (13000

кДж/кг; белок 19%, жиры 5%, клетчатка 4%, лизин 1,2%, метионин + цистеин 0,7%, кальций 0,6-0,9%, фосфор 0,6-0,9%, натрий 0,20-0,25%), жир свиной, казеин, метионин, витаминно-минеральный премикс «Ушастик» (Россия). В 1 кг премикса содержится витамина А – 1000000 МЕ, витамина D₃ – 300000 МЕ, витамина Е – 1,0 г, витамина В₂ – 0,6 г, витамина В₁₂ – 12 мг, железо – 20 г, медь – 4 г, марганец – 6 г, цинк – 10 г, кобальт – 0,08 г, йод – 0,4 г. Компоненты отвешивали в соответствии с таблицей 2.2 из расчета 30 г смеси на 1 животное в сутки, измельчали и смешивали до однородности [Srinivasan K., 2005]. Хранили при +4 °С.

Таблица 2.2 – Состав высокожировой диеты.

Компонент	Масса, г/кг
Комбикорм	370
Жир свиной	313
Казеин	253
Витаминно-минеральная смесь	61
Метионин	3

Измерение концентрации глюкозы в венозной крови проводили за день до начала содержания мышей на высокожировой диете и далее еженедельно до окончания эксперимента, в утренние часы, натощак, с помощью биохимического анализатора Biosen C_Line (EKF Diagnostics, Германия), делая надрез кончика хвоста. Общий срок моделирования СД 2 типа у мышей на высокожировой диете составил 10 недель. В эксперимент включали животных с уровнем глюкозы натощак более 7 ммоль/л. Начиная с 71 дня мышам ежедневно вводили тестируемые соединения в течение 21 суток.

В конце 10-ой недели проводили интраперитонеальный тест толерантности к глюкозе (ИТТГ) для подтверждения развития сахарного диабета 2 типа [Lu M., 2014].

Ход эксперимента

На 71-й день после развития патологии животные были распределены на 5 групп: контрольная (без патологии, стандартный рацион вивария без введения

соединений, n=10); СД (модельная патология + рацион «высокожировая диета» без введения соединений, n=8); метформин (модельная патология + рацион «высокожировая диета» и введение препарата сравнения метформина, n=7); NP-001 (модельная патология + рацион «высокожировая диета» и введение соединения NP-001, n=10), NP-006 (модельная патология + рацион «высокожировая диета» и введение соединения NP-006, n=10). Введение исследуемых соединений проводили 21 день.

Животным контрольной и СД групп 1 раз в сутки (в 9:00 часов) вводили в/б растворитель (10 мл/кг) (дистиллированная вода). Группе животных препарата сравнения 1 раз в сутки (в 9:00 часов) в/б вводили метформин (150 мг/кг), растворенный в дистиллированной воде (10 мл/кг) [Jang E. H., 2010]. Животным опытных групп 1 раз в сутки (в 9:00 часов) в/б вводили исследуемые соединения NP-001 и NP-006 (300 мг/кг), растворенные в дистиллированной воде (10 мл/кг).

В ходе исследования для оценки фармакологической активности тестируемых соединений массу тела животных и концентрацию глюкозы в крови определяли еженедельно - на 77-е, 84-е, и 91-е сутки введения [Lu M., 2014].

Для оценки толерантности к глюкозе проводили стандартный интраперитонеальный тест толерантности к глюкозе (ИТТГ). Тест проводили на 91-е сутки в 15:00, на неанестезированных мышах, голодавших с 9:00. Животным в/б вводили раствор глюкозы (10 мл/кг) в концентрации, эквивалентной 1 г/кг веса животного. Производился последовательный забор образцов крови из хвостовой вены перед введением исследуемых соединений (-30 мин), в 0 мин (перед введение глюкозы) и спустя 15, 30, 60, и 120 минут после введения глюкозы. Сразу после забора проводили измерение концентрации глюкозы в крови с помощью биохимического анализатора Biosen C_Line (EKF Diagnostics, Германия) [Rossmeis M., 2003].

По окончании эксперимента на 92-е и 93-и сутки животных наркотизировали введением раствора хлоралгидрата в/б (400 мг/кг) и забирали до 2 мл крови пункцией сердца в присутствии гепарина (из расчета 50 ЕД Гепарина / мл крови). Плазму крови получали центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин.

Каждый образец крови делили следующим образом: по 20 мкл крови на определение общего количества лейкоцитов и подсчет лейкоцитарной формулы, оставшееся количество (≈ 1 мл) центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 минут. Отобранную надосадочную жидкость (плазму крови) хранили при -80°C . Полученную плазму использовали для определения уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и биохимических исследований. После эвтаназии производили забор белой жировой ткани (ретроперитонеальной, эпидидимальной и мезентериальной) [Johnson P. R., 1972] и печени. Образцы промывались физиологическим раствором, высушивались марлевыми салфетками и взвешивались.

На 94-ый день эксперимента определяли концентрацию инсулина в образцах плазмы крови с помощью набора для количественного определения инсулина в сыворотке и плазме крови Human Insulin ELISA Kit (Cusabio, США).

На 95-ий день эксперимента определяли биохимические показатели плазмы крови всех образцов с помощью наборов для количественного определения уровня холестерина Cholesterol Liquid 250 S (Erba Lachema, Чехия), для количественного определения уровня ЛПНП LDL C Direct 80 (Erba Lachema, Чехия), для количественного определения уровня ЛПВП HDL C Direct 240 (Erba Lachema, Чехия) и для количественного определения уровня триглицеридов Triaglyceroly Liquid 250 S (Erba Lachema, Чехия).

Уровень лактата в плазме крови определяли спектрофотометрическим методом с *para*-гидроксидифенилом. [Barker S. B., 1941]. Для этого 100 мкл плазмы крови инкубировали с 5 мкл 4%- CuSO_4 и 600 мкл 72%- H_2SO_4 на водяной бане при 100°C . В качестве стандарта использовали лактат лития в концентрации 0,01 мг/кг. После охлаждения смеси добавляли 10 мкл 1,5% *para*-гидрооксидифенила, растворенного в 0,5% NaOH. Полученную смесь инкубировали 30-40 мин. при $30-37^{\circ}\text{C}$, затем при 100°C в течение 90 сек. В 300 мкл остывшей смеси определяли лактат по приросту оптической плотности при длине волны 560 нм.

Для полуколичественного определения уровня аланина в плазме крови использовали метод тонкослойной хроматографии [Досон Р., 1991]. В качестве

неподвижной фазы использовали хроматографические пластинки с закрепленным слоем силикагеля Силуфол UV-254 (ЧССР). На пластинку на расстоянии 1,5 см от нижнего края наносили 10 мкл анализируемых образцов плазмы и стандартный образец аланина (2 мг/мл) в спиртовом растворе. Для приготовления подвижной фазы использовали *n*-бутанол, 80%-уксусную кислоту и дистиллированную воду в соотношении 12:3:5. В качестве группового локализирующего агента применяли 0,25% спиртовой раствор нингидрина. Пятна проявляли нагреванием при 100°C в течение 5 минут в сушильном шкафу ШС-80-01-СПУ (Россия). Анализ площади пятен проводили в web-сервисе qTLC (<https://qtlc.app>).

На 96-97-ой дни эксперимента в гомогенате печени проводили определение скорости гликолиза и гликогенолиза, и концентраций ТГЦ, гликогена, аланина. Также, была определена активность глюкокиназы гепатоцитов.

Определение скорости гликолиза и гликогенолиза. [Kondoh Y., 1994] Печень отмывали от крови в холодном (0-4°C) физ. растворе, взвешивали, измельчали и гомогенизировали в гомогенизаторе Ultra Turrax T10 Basic (IKA, Германия) при охлаждении в 5-кратном объеме 10 мМ калий-фосфатного буфера при pH 7.0. Затем смесь центрифугировали при 6000 об./мин. в течение 15 мин. в центрифуге при 4°C. Субстраты для определения скорости гликолиза и гликогенолиза – 5мМ глюкозы, 10 мг/мл гликогена, 15мМ глюкозо-1-фосфата, 15мМ глюкозо-6-фосфата и 15мМ фруктозо-1,6-дифосфата инкубировали со 100 мкл надосадочной жидкости в 900 мкл инкубационной смеси, содержащей 2 мМ АТФ, 2 мМ GSH, 2 мМ MgSO₄ в 2 мл 10 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7.0) в течение 30 мин. при температуре 37°C. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 100% ТХУ. Затем смесь центрифугировали при 6000 об. /мин. в течение 15 мин. при 4°C. Надосадочную жидкость использовали для количественного определения лактата.

Образовавшийся лактат определяли так же, как описано в разделе «Определение лактата в плазме крови спектрофотометрическим методом с парагидроксиdifенилом» [Barker S. B., 1941].

Определение гликогена в печени глюкозооксидазным методом [Winzell M. S., 2011]. в гомогенизаторе Ultra Turrax T10 Basic (IKA, Германия) при охлаждении

гомогенизировали 50 мг печени в 500 мкл гомогенизирующего раствора, содержащего 20 мМ Tris-HCl (pH=7,5), 150 ммоль/л NaCl, 2 ммоль/л ЭДТА и 0,1% Triton X-100. К полученному гомогенату добавляли 100 мкл α -амилазы из поджелудочной железы свиньи (20 мкг/мл). Смесь перемешивали и инкубировали при 50°C 45 мин. После охлаждения центрифугировали 10 мин. при 15 тыс./об. В супернатанте определяли количество гликогена по количеству образовавшейся глюкозы глюкозооксидазным методом (Глюкоза-ФКД, Россия).

Определение триглицеридов в печени [Winzell M. S., 2011]. В гомогенизаторе Ultra Turrax T10 Basic (IKA, Германия) при охлаждении гомогенизировали 50 мг печени в 500 мкл гомогенизирующего раствора, содержащего 20 ммоль/л Tris-HCl (pH=7,5), 150 ммоль/л NaCl, 2 ммоль/л ЭДТА и 0,1% Triton X-100. К полученному гомогенату добавляли 600 мкл экстракционного раствора, содержащего хлороформ и метанол в соотношении 2:1. Смесь центрифугировали в течение 10 мин. при 5000 об./мин. В надосадочной жидкости определяли количество триглицеридов при помощи набора жидких реагентов для ферментативного определения триглицеридов. (Triaglyceroly Liquid 250 S (Erba Lachema, Чехия).

Определение активности глюкокиназы печени. Активность глюкокиназы в печени определяли посредством сопряженной реакции образования глюкозо-6-фосфата с генерацией NADH глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой (Г6ФДГ *L. mesenteroides*, 550-1100 ЕД/мг, Sigma, США). Гомогенат печени (получение описано выше) центрифугировали при 6000 об./мин. в течение 15 мин. в центрифуге при 4°C. Анализ проводили в супернатанте при 37°C в 96-луночном прозрачном полистиреновом планшете с плоским дном (Costar 9018, США) в конечном инкубируемом объеме 200 мкл. Инкубационная смесь содержала: 0,025 М буфера HEPES (pH 7,2), 5 ммоль/л D-глюкозы, 1 ммоль/л АТФ, 1,8 ммоль/л NAD, 2 ммоль/л MgCl₂, 1 ммоль/л ДТТ. В лунки вносили 10 мкл Г6ФДГ (1,8 ЕД/мл), затем 180 мкл инкубационной смеси и предварительно инкубировали в термостатируемом шейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) в течение 10 мин. до достижения температурного равновесия, а затем инициировали реакцию внесением 10 мкл супернатанта исследуемых образцов, содержащих ГК [Salt D.; Биззаро Т.Ф.,

2010]. 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 (Tecan, Швейцария).

Определение уровня аланина в печени проводили так же, как описано в разделе «Определение уровня аланина в плазме крови методом тонкослойной хроматографии» [Досон Р., 1991].

2.9 Метод изучения влияния активаторов глюкокиназы на процессы регенерации β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы при стрептозотоцин-индуцированном диабете с помощью метода флуоресцентной микроскопии⁸

По меньшей мере, за 5 дней до эксперимента рассадили в клетки от двух до пяти мышей (самцы, альбиносы, около 25г, возраст 8-12 недель). Содержали животных в стандартных клетках по 4 особи при температуре 25 °С и стандартном световом режиме со свободным доступом к еде [Furman B.L., 2015]. Были сформированы контрольная и опытные группы по 5 животных. В экспериментальный день, за 4 часа до введения STZ, удалили пищу из всех клеток с сохранением свободного доступа к воде. Животным опытной группы вводили STZ в дозе 200 мг/кг, в/б. (1,0 мл / 100 г веса). Животным контрольной группы вводили равный объем цитратного буфера (pH=4.5). Обеспечили обычную пищу и 10%-ную водную сахарозу, в 3-й день эксперимента заменили ее обычной водой. На 10-ый день эксперимента удалили еду из клеток на 6 часов, измерили содержание глюкозы в образце крови хвостовой вены для регистрации гипергликемии. Считали диабет развившимся у животных с уровнем глюкозы 15,0 mM. Животным опытных групп были введены исследуемые вещества (NP-001, NP-006) и препарат сравнения PF – 04937319 в дозе 50 мг/кг внутрибрюшинно в растворе натрий-карбоксиметилцеллюлозы (1,0 мл / 100 г веса) [Stolovich-Rain M.,

⁸ Выражаем глубокую признательность за помощь в проведении исследования д.м.н, профессору Снигуру Г.Л., ассистенту Сурину С. С.

2012]. Животным контрольной группы вводили равный объем растворителя. Через 13 часов выводили животных из эксперимента, выделив поджелудочную железу [Nir T., 2007].

Вывод животных из эксперимента проводился через 16 часов после введения активаторов глюкокиназы, методом цервикальной дислокации. Ткань поджелудочной железы фиксировалась в 10% растворе нейтрального забуференного формалина (pH 7,4) в течение 24 часов с последующей заливкой в парафин по общепринятым гистологическим методикам. На ротаторном микротоме «Microm HM 325» (Thermoscientific, США) изготавливались парафиновые срезы толщиной 3-5 мкм, которые монтировались на адгезивные стекла с поли-L-лизинном (Sigma-Aldrich, США).

После депарафинизации микропрепаратов проводили иммунофлюоресцентное окрашивание с первичными антителами к инсулину и глюкагону (табл. 2.1) по протоколам фирм производителей антител с температурной демаскировкой антигенов в «Dewax and HIER Buffer L» буфере (Thermo scientific, США) при температуре 98°C - 40 минут. После трёхкратной промывки блокировали неспецифическое окрашивание раствором 10% нормальной сыворотки осла (Sigma-Aldrich, США) при комнатной температуре – 60 мин. После промывки в TRIS-буфере инкубировали срезы с первичными антителами в термостате во влажной камере при 37°C - 24 часа. Затем после двукратной промывки в TRIS-буфере по 60 минут инкубировали со вторичными антителами (табл. 2.3) во влажной камере в термостате при 37°C - 24 часа. Затем дважды промывали в TRIS-буфере по 60 мин и инкубировали в растворе DAPI (Thermo scientific, США, 0,0002%) при комнатной температуре – 15 минут. Заклучали в монтирующую не флюоресцирующую среду.

Таблица 2.3 Характеристика используемых антител.

№ п/п	Наименование первичных антител	Фирма производитель, клон	Наименование вторичных антител	Производитель, флюорохром
1	Морской свинки, анти инсулин	Abcam, поликлональные, IgG	Козьи, анти морской свинки	Abcam, alexafluor 647, IgG
2	Кроличьи, анти глюкагон	Dako, поликлональные, IgG	Ослиные, анти кроличьи	Abcam, alexafluor 488, IgG
3	Мышиные, анти глюкагон	Dako, моноклональные, IgG	Козьи, анти мышинные	Abcam, alexafluor 488, IgG

Анализ полученных результатов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа «Axioimager.A2» (Карл Цейсс, Германия), при начальном увеличении x200, x400 и x630 с использованием программного обеспечения «Isis» (MetaSystems, Германия) и блоков светофильтров (табл. 2.4).

Таблица 2.4 Характеристика световых фильтров и видимого излучения от флюорохромов, окрашивающих изучаемые вещества.

Характеристика фильтра, страна- производитель	Вторичное антитело, конъюгированное с флюорохромом, или краситель	Локализация, цвет
EX* 350/50 нм, BS** 400 нм, EM*** 460/50 нм, Chroma, США.	DAPI	Ядра клеток, синий
EX 630/20нм, BS 647нм, EM 667/30 нм, Chroma, США.	Козьи, анти морской свинки, конъюгированные с alexa fluor 647.	Инсулин, красный
EX 495/25 нм, BS 515 нм, EM 537/29 нм, Chroma, США.	Ослиные, анти кроличьи, конъюгированные с alexa fluor 488	Глюкагон, зелёный

* EX - возбуждающий светофильтр (Exitation filter).

** BS - дихроичное зеркало (Dichroic Mirror).

*** EM - запирающий светофильтр (Emission filter).

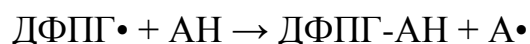
Проводили оценку количества панкреатических островков с подсчетом количества инсулин-позитивных и глюкагон-позитивных клеток. Оценивали удельное количество клеток в панкреатическом островке по отношению ко всем

клеткам островка в %. Проводили подсчет индекса пролиферативной активности в % по отношению ко всем клеткам островка.

Математический анализ полученных результатов проводили с использованием программы Excel 2007 (Microsoft, США) с помощью критерия Манна-Уитни. Значимыми считали различия при ошибке $p \leq 0,05$.

2.10 Исследование влияния соединений на механизмы развития поздних осложнений сахарного диабете

Методы изучения механизмов антиоксидантного действия наиболее активных соединений на моделях *in vitro*. Одним из способов оценки антиоксидантной активности (АОА) является колориметрия свободных радикалов, основанная на реакции ДФПГ• (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), растворенного в этаноле, с образцом антиоксиданта (АН) по схеме:



В результате восстановления ДФПГ• антиоксидантом снижается пурпурно-синяя окраска ДФПГ• в этаноле, а реакция контролируется по изменению оптической плотности при 517 нм методами спектрофотометрии.

Антирадикальная активность (АРА) изучалась по способности веществ инактивировать свободный стабильный радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ•) (Sigma, США) [Alam M. N., 2013]. Все реактивы растворяли в этиловом спирте (95%). В планшет Costar 96 Flat Transparent вносили 200 мкл 0,5 мМ раствора ДФПГ, 20 мкл исследуемого вещества (конечная концентрация скрининга 100 мкМ). Для проведения концентрационного исследования использовался диапазон концентраций от 500 до 1 мкМ. Для определения активности соединений измеряли оптическую плотность полученной смеси спектрофотометрически при $\lambda_{\text{max}} = 517$ нм, в течение 24 ч. Для предотвращения испарения спиртовых растворов, на время между определениями, микропланшет заклеивался специальной пленкой. Антирадикальную активность определяют по падению оптической плотности. В качестве препаратов сравнения использовали

водорастворимый аналог токоферола – тролокс, а также флаваноид - кверцетин, вводимые в пробу в аналогичной концентрации.

Метод исследования антирадикальной активности на модели гемоглобин (Hb)-H₂O₂-люминол-зависимой хемилюминесценции. В данном методе АРА соединений исследовали на модели образования свободных радикалов в системе Hb-H₂O₂-люминол с помощью измерения кинетики ее хемилюминесценции (ХЛ) [Alam M. N., 2013].

При взаимодействии с некоторыми реакционноспособными молекулами (свободные радикалы, активные формы кислорода) люминол подвергается окислению, в ходе которого испускаются кванты ХЛ. В связи с этим люминол используют в качестве *хемилюминесцентного зонда* на активные формы кислорода. При взаимодействии метгемоглобина и H₂O₂ образуются радикалы-инициаторы окисления люминола, в качестве которых выступают феррил-радикалы гемоглобина и гидроксильные радикалы.

Все реактивы растворяли в 50 мМ PBS (pH 7,4), приготовленном на деионизированной воде. В планшет Greiner 96 Flat Bottom White вносили 25 мкл 0,2 мг/мл раствора гемоглобина, 100 мкл 100 мкМ ЭДТА, 25 мкл исследуемого вещества. Для первичного скрининга конечная концентрация исследуемых веществ составляла 100 мкМ, для концентрационного исследования использовался диапазон конечных концентраций от 64 нМ до 1 Мм, конечная концентрация ДМСО не превышала 2%. В качестве препарата сравнения использовался Тролокс. После вносили 50 мкл раствора люминола (конечная концентрация 1 мкМ) при наблюдении темноты. Реакцию запускали 50 мкл 0,025% раствора H₂O₂ и тут же переносили планшет в микропланшетный ридер Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия) для регистрации люминесценции в течение 30 минут с интервалом в 20 сек. Расчет ингибирования окислительного процесса производили по величине площадей под кривыми сигнал-время, рассчитанными в программе Prism 7.0 (GraphPad, Inc.).

2.10.1 Обработка результатов.

Межпланшетная IQM нормализация. Первичные данные были нормализованы для каждого планшета путем деления значений каждой лунки планшета на межквартильное среднее (IQM) в соответствии с уравнением:[Mangat и др., 2014]

$$IQM \text{ нормализованная активность} = \frac{S}{\mu_{iq}},$$

где S представляет измеренное значение образца, а μ_{iq} представляет среднее (μ) межквартильных (iq) данных планшета. Значение μ_{iq} было найдено для каждого планшета с помощью функции =TRIMMEAN (начало: конец;0,5) в Microsoft Excel, где начало и конец определяют первую и последнюю ячейки массива данных, соответственно. Показателем контроля качества для каждого планшета считали разницу между средним межквартильным и медианным значением, не превышающую 15%.

Внутрипланшетная нормализация. Процент активности в каждой пробе нормализовали по внутрипланшетным контролям с использованием уравнения, где S представляет измеренное значение образца, а H и L представляют среднее значение для высокоактивных и низкоактивных контролей на планшете, соответственно:

$$\% \text{ Активности} = \left(\frac{S - L}{H - L} \right) \times 100.$$

Расчет значений IC₅₀. Измерения проводились в трех независимых экспериментах. Данные обрабатывали с использованием Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.). Величины IC₅₀ вычисляли нелинейной 3-параметрической регрессией по уравнению:

$$y = y_{min} + \frac{y_{max} - y_{min}}{1 + \frac{x}{IC_{50}}}$$

Среднее арифметическое взвешенное IC₅₀ и стандартных ошибок определения IC₅₀ рассчитывали исходя из весов (w_i) стандартных ошибок (SE_i) индивидуальных измерений по формуле:[Jones и др., 2010]

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i \times x_i}{\sum_{i=1}^n w_i}, \quad w_i = \frac{1}{SE_i^2}.$$

Методы изучения антигликирующего и антигликоксидационного действия наиболее активных соединений на моделях *in vitro*. Оценку антигликирующего и антигликоксидационного действия наиболее активных соединений изучали в соответствии с методом, описанным [Spasov A. A., 2017]. Реакцию проводили в фосфатном буферном растворе с рН 7.4 (гликирование) и в среде HEPES буфера рН 5.8, обогащенном 5 мг/л пентагидрата сульфата меди (II) (гликоксидация). Реакционная среда при постановке реакции гликирования содержала 0.5 М раствор глюкозы и 1 мг/мл БСА (фракция V), растворенные в фосфатном буферном растворе рН 7.4. Исследуемые соединения растворяли в 99% ДМСО при постановке в фосфатном буфере, и в дистиллированной воде при постановке реакции в буфере HEPES с медью. Конечная концентрация веществ после их добавления в реакционную среду составляла 1000 или 100 мкМ, а при оценке IC₅₀ – диапазон концентраций от 1000 до 10 мкМ. Контрольные пробы содержали эквивалентный объем растворителя. По обоим методикам образцы инкубировали 24 ч при 60°C. В качестве вещества сравнения использовали гидрохлорид аминогуанидина [Wei M., 2003] и лозартан [Yamagishi S., 2010]. Измерение флуоресценции проводили при волнах возбуждения 370 нм и испускания 440 нм (спектрофлуориметр M 200 PRO, TECAN). Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Microsoft Excel 2007, а также программы GraphPad Prism 5.0 с использованием однофакторного вариационного анализа и пост-теста Туке (p < 0.05).

Методы изучения хелатирующих свойств наиболее активных соединений на модели медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты для наиболее активных соединений на моделях *in vitro*. Хелатирующую активность соединений исследовали в диапазоне концентраций 10–200 мкМ по методике подавления медь-зависимого аутоокисления аскорбиновой кислоты [Иванов А. В., 2018], оценивая величину IC₅₀. В качестве контроля использовали липоевую кислоту, пиоглитазон [Desouza C. V., 2010] и пиридоксамин [Nagai R., 2012]. Растворение соединений

осуществляли в 99% DMSO. Индикатор активности катионов меди (II) – 100 мкМ раствор аскорбиновой кислоты, источник Cu^{2+} – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в конечной концентрации 150 мкМ (95 мкМ в пересчете той же массы на безводную соль). Комплексообразование проводили предварительным смешением и инкубацией в течение 5 мин при 37°C раствора сульфата меди и исследуемого вещества или ДМСО. Смесь вносили в раствор аскорбиновой кислоты. Автоокисление регистрировали спектрофотометрически в кювете из кварца низкотемпературной обработки (λ 265 нм). Методом линейной регрессии определяли IC50 тестируемых веществ (Microsoft Excel 2007). Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Microsoft Excel 2007, а также программы GraphPad Prism 5.0 с использованием критерия попарного сравнения Манна–Уитни, а также однофакторного вариационного анализа при $p < 0.05$.

Методы изучения антиагрегантного действия наиболее активных соединений на моделях *in vitro*. Эксперименты выполнены на 6 кроликах-самцах породы Шиншилла массой 2,5-3,0 кг. Все исследованные соединения растворялись в дистиллированной воде. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота растворялась в 30 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) с последующим добавлением дистиллированной воды до необходимого объема.

Влияние тестируемых образцов на функциональную активность тромбоцитов *in vitro* изучали согласно методу Born G. в модификации Габбасова В.А. (1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов ViolaLA-220. Исследования выполняли на богатой тромбоцитами плазме кроликов, полученной по способу, описанному Люсовым В.А., Белоусовым Ю.Б. (1971). Для этого венозную кровь, забранную из ушной краевой вены кролика, стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 и центрифугировали в течение 10 мин при 1500 об/мин на центрифуге Multi Centrifuge CM 6M (Elmi, Латвия). В основе данной методики лежит оптический метод детекции степени изменения светопропускания плазмы богатой тромбоцитами (PRP), при добавлении веществ, стимулирующих процессы

агрегации (в условиях постоянного перемешивания). Обязательным условием для протекания процессов агрегации является механическое перемешивание плазмы при 800 об/мин, которое проводится с помощью магнитной мешалки, прилагаемой к агрегометру. Калибровка прибора проводится по дистиллированной воде, согласно инструкции. При этом светопропускание дистиллированной воды принимается за 100%. Для получения контрольной пробы в стеклянную кювету агрегометра вносится 300 мкл богатой тромбоцитами плазмы с магнитной мешалкой и после включения записи агрегатограммы, на 10 секунде регистрации процесса в кювету добавляется индуктор агрегации тромбоцитов. Для изучения антиагрегантной активности исследуемых соединений в кювету с 300 мкл богатой тромбоцитами плазмы добавляется 10 мкл раствора тестируемого образца в определенной концентрации. Проба инкубируется в специализированной ячейке агрегометра при поддержании постоянной температуры 37°C в течение 5 минут, после чего пробу переносят в регистрирующую ячейку и производят запись агрегатограммы. На 10 секунде процесса в кювету добавляется индуктор агрегации. Запись агрегатограммы производится в течение 5 минут, при перемешивании пробы магнитной мешалкой (800 об/мин). Запись агрегатограмм с индуктором коллаген проводится не менее 15 мин, так как инициация процесса в этом случае продолжается длительной лаг-фазой. Так же, в другой кювете исследуют активность остальных тестируемых образцов [Kwon H.W., 2016].

Расчёт ингибирующего влияния на агрегацию тромбоцитов (ИнАТ) изучаемых соединений проводили по формуле:

$$\text{ИнАТ} = 100 - (B/A) \times 100\%, \text{ где}$$

A-степень агрегации тромбоцитов крови кроликов без изучаемых соединений;

B-степень агрегации тромбоцитов после инкубации плазмы богатой тромбоцитами с изучаемыми соединениями.

Влияние соединений и препарата сравнения на процессы агрегации тромбоцитов, вызванной различными индукторами, изучали в концентрациях 100, 10 и 1 мкМ. Тестируемые образцы добавляли за 5 минут до инициации процесса

агрегации. Концентрации индукторов составляли: для АДФ и адреналина – 5 мкМ, коллагена - 4 мкг/мл.

Методы изучения антитромбогенного действия наиболее активных соединений на моделях *in vivo*. Модель артериального тромбоза, индуцированного аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) на сонную артерию крыс. Исследование проводили на 40 беспородных половозрелых крысах самцах массой 250,0-300,0 г. Антитромботическое действие изучаемых соединений и препаратов сравнения было изучено с использованием модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) [Kurcz K.D., 1990]. Все исследованные образцы растворялись в физиологическом растворе. Контрольной группе животных вводился растворитель (физиологический раствор) в эквивалентном объеме. Исследуемые соединения-лидеры и препарат сравнения вводились крысам внутрибрюшинно однократно за 30 мин до инициации тромбообразования [Миронов А.Н., 2012]. Крыс наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг внутрибрюшинно), затем после наступления стадии наркоза послойно вскрывали кожу и ткани, производили препарирование сонной артерии на 2 см в длину. На участок длиной около 1 см накладывали ватный диск размером 2x8 мм, пропитанный 50% раствором хлорида железа (III). Для изолирования окружающих тканей под сонную артерию подводили парафиновую бумагу. Ультразвуковой датчик аппарата «Минимакс-Допплер–К» (Санкт-Петербург) устанавливается на расстоянии 1 см от ватного диска по ходу кровотока в сонной артерии. Регистрация кровотока проводится до полной окклюзии сосуда тромбом.

Соединения NP-001 и NP-006 были исследованы в эквимольных ацетилсалициловой кислоте (100 мг/кг) дозах, которые составили 237 и 260 мг/кг соответственно. Оценку антитромботического действия тестируемых образцов проводили по показателю времени образования тромба.

2.11 Методы исследования токсикологических свойств соединений

2.11.1 Исследование цитотоксичности соединений-лидеров на перитонеальных макрофагах мышей⁹. Выделение перитонеальных макрофагов. Перитонеальные макрофаги (ПМ) выделяли из перитонеального экссудата белых беспородных мышей [Вурум А., 1974]. Для аккумуляции ПМ внутрибрюшинно вводили 1 мл 3% раствора пептона. Через 3 суток мышей подвергали эвтаназии цервикальной дислокацией. Клетки перитонеального экссудата получали, асептически промывая брюшную полость 5 мл стерильного раствора Хенкса (+4-6 °С) без ионов кальция и магния. Подсчет общего количества клеток и оценку их жизнеспособности проводили в счетной камере Горяева (Россия) окраской 0,4% трипановым синим (Sigma-Aldrich, США). Доля живых клеток превышала 95%. Концентрацию клеток доводили до $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в полной питательной среде DMEM (Gibco), дополненной 2 мМ L-глутамина (Gibco), 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой (BioClot, Германия), с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (Gibco). Высевали 200 мкл/лунку в 96-луночные прозрачные планшеты (SPL Life Sciences Co., Ltd., Корея). Оставляли на 2 ч. при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂, после чего лунки промывали для удаления неадгезивных клеток. После 24 часов инкубации отбирали 20 мкл супернатанта и вносили 20 мкл растворов тестируемых веществ. Цитотоксичность веществ определялась в конечной концентрации 10 мкМ

Методика изучения цитотоксичности по МТТ-тесту. МТТ-тест основан на восстановлении 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромида (МТТ) до формазана клеточными дегидрогеназами [Kumar, P., 2018; Stepanenko, A. A., 2015]. ПМ ($2,0 \times 10^5$ на лунку) высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном, содержащие 200 мкл культуральной полной среды (DMEM, Gibco, UK). Подготовленные образцы контрольной и контрольной групп затем индивидуально добавляли в лунки (n = 3) через 24 часа после посева. Исходные растворы

⁹ Выражаем глубокую признательность за помощь в проведении исследования н.с., Борисову А. В., к.х.н., с.н.с.Бабкову Д.А.

испытуемых веществ готовили разбавлением диметилсульфоксидом (ДМСО). Приготовленные растворы имели концентрацию 1×10^{-1} моль. л⁻¹ и фильтровались с помощью одноразового микрофилтра 0,20 мкм (Corning, NY, Germany) перед использованием. Конечная концентрация ДМСО в каждой пробе составляла 0,5%. DMEM, содержащую 0,5% ДМСО использовали в качестве отрицательного контроля. Среда, содержащая 10 мкг/мл LPS E. coli O111:B4 (Sigma-Aldrich, США), служила в качестве внутреннего контроля активации ПМ, среда, содержащая 0,01% Triton X-100, служила положительным контролем. Клетки инкубировали в течение 24 часов при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Стоковый 5 мг/мл раствор МТТ (Sigma, США) в PBS фильтровали для стерилизации и удаления небольшого количества нерастворимых примесей, присутствующих в некоторых партиях реактива. После 24 инкубации клеток с тестируемыми соединениями в каждую лунку вносили 20 мкл раствора МТТ, инкубировали при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в течение 4 часов. Культуральную среду удаляли, клетки лизировали и растворяли кристаллы формазана в 150 мкл ДМСО. Планшеты встряхивали при комнатной температуре в течение 10 минут и измеряли оптическую плотность в микропланшетном ридере Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия) при длине волны 565 нм. Цитотоксичность веществ определялась в конечной концентрации 10 мкМ. Значения в триплетах усредняли, результаты выражали как среднее между сериями ± стандартное отклонение.

2.11.2 Исследование цитотоксичности соединений-лидеров на неонатальных фибробластах сердца крыс¹⁰. Работу проводили на беспородных лабораторных крысах, в 2 этапа. На 1 этапе получали суспензию клеток желудочков сердец новорожденных 1–2-суточных животных с помощью метода протеолитической диссоциации [Бильдюг Н.Б., 2015]. Для освобождения культуры от клеток эндотелия и клеток крови полученную суспензию клеток сердца центрифугировали при 200 g в течение 5 минут. Для того чтобы отделить более адгезивные фибробласты от медленно прикрепляющихся кардиомиоцитов, использовали

¹⁰ Выражаем глубокую признательность за помощь в проведении исследования н.с., Борисову А.В., к.х.н., с.н.с. Бабкову Д.А.

метод селективной адгезии [Villarreal F. J., 1999; Dubey R.K., 1997]. После центрифугирования, осадок ресуспендировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко», Россия) и гентамицином («НПО Микроген», Россия, 50 мкг/мл) и высевали на чашки Петри («Минимед», Россия) и помещали в CO₂ – инкубатор на 60 минут. По истечении времени инкубации среду, содержащую неприкрепившиеся клетки, включая клетки гладких мышц сосудов, эндотелиальные клетки и оставшиеся кардиомиоциты, осторожно собирали и переносили на новые чашки Петри. Процедуру повторяли дважды. При этом на старой чашке оставалась культура, обогащенная фибробластами, которую в дальнейшем использовали для получения чистой культуры сердечных фибробластов.

На 2 этапе получали культуру сердечных фибробластов из обогащенной фибробластами культуры, полученной в результате первого этапа селективной адгезии. Первично адгезированные клетки растили до монослоя (80% конфлюэнтность) и снова рассеивали в соотношении 1:2. Жизнеспособность клеток оценивали перед каждым последующим пассажем путем их окрашивания 0,4% раствором трипанового синего («ПанЭко», Россия). Контроль чистоты клеточной культуры и состояния клеток в ходе экспериментов наблюдали с помощью инвертированного микроскопа («Zeiss», Германия). Высокая чистота культуры фибробластов характеризовалась отсутствием взрослых кардиомиоцитов, эндотелиальных клеток и гладкомышечных клеток сосудов. В дальнейшем на протяжении всего эксперимента фибробласты культивировали в полной питательной среде DMEM с 10% сывороткой и гентамицином (50 мкг/мл) при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Все эксперименты с фибробластами проводили на клетках первых двух пассажей [Тао Х., 2014; Zhang P., 2011; Yun-lin Chen, 2019].

2.11.3 Изучение острой токсичности соединений при пероральном и интраперитонеальном введении.

Острую токсичность соединений определяли на 40 белых нелинейных мышцах-самцах массой 20-25 г при однократном пероральном и в/б введении

растворов наиболее активных веществ в физиологическом растворе. Максимальный объем жидкости, который вводили животным за один раз, не превышал 1 мл на 100 г массы тела. После введения соединений проводили наблюдение за поведением животных, фиксировали время появления, степень выраженности, продолжительность признаков интоксикации. В течение двух недель вели учет погибших и выживших животных. Для расчета величины токсикологического показателя LD₅₀ использовали пробит-анализ по методу Блисса-Прозоровского [Сергиенко В. И., 2012].

Определение острой токсичности также выполняли на 12 нелинейных крысах обоего пола массой 180-220 г при однократном пероральном введении растворов изучаемых веществ в физиологическом растворе. Для расчета величины токсикологического показателя LD₅₀ использовали пробит-анализ по методу Блисса-Прозоровского [Сергиенко В. И., 2012].

2.12 Методы статистической обработки

Методы статистической обработки данных, полученных на этапе компьютерного прогноза активности соединений и анализа зависимости активности от химической структуры и физико-химических свойств, представлены выше в соответствующих разделах.

Для обработки экспериментальных фармакологических исследований использовались методы согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Сергиенко В. И., 2012], реализованные в программных пакетах GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США), Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office, США), Statistica 6.0 (Statsoft, США) и StatPlus 6.0 (AnalystSoft Inc., США): распределение выборки на нормальность проверялось с помощью критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса. В качестве параметрических критериев использованы непарный t-тест; для множественного сравнения – однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ с посттестом Даннета; для зависимых измерений – парный t-тест. В случае ненормального распределения данных использованы U-критерий Манна-Уитни; критерий

Краскела-Уоллиса с пострестом Данна – для множественного сравнения; для зависимых измерений – критерий Вилкоксона. Расчеты концентрационных зависимостей выполнены с использованием линейного и нелинейного регрессионного анализов.

ГЛАВА 3. ПОИСК И КОНСЕНСУСНЫЙ ПРОГНОЗ СОЕДИНЕНИЙ С ГЛЮКОКИНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ *IN SILICO*

В данном разделе был проведен виртуальный скрининг веществ, имеющихся в библиотеке субстанций химических соединений кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО ВолгГМУ, выбор которых был основан на синтетических возможностях партнеров кафедры в соответствии со структурой соединений, которые были исследованы мировым научным сообществом в различных экспериментальных и клинических тестах на наличие глюкокиназной активности. В результате было отобрано 154 новых субстанций, из которых было сформировано 14 классов химических структур для анализа перспективности последующего экспериментального изучения производных данных скаффолдов в отношении глюкокиназы.

3.1 Формирование базы данных по структуре новых соединений

С целью дальнейшего использования в компьютерных системах прогноза была сформирована база данных по структуре 155 новых соединений (в том числе референсного препарата PF-04937319), являющихся производными 14 скаффолдов, информация о которых представлена во 2 главе «Материалы и методы» и электронном приложении 1. База данных сформирована в СУБД ChemFinder 9.0, в которую заносились лабораторные шифры новых соединений и их структурные формулы. Для последующей обработки структурной информации БД была представлена в виде файла стандартного коммуникативного формата *.sdf.

3.2 Создание банка данных по структуре и уровню активности известных активаторов глюкокиназы

Информация о химической структуре и активирующей ГК активности была получена из международных поисковых систем по биологически активным соединениям ChEMBL [ChEMBL, 2015], BindingDB [BindingDB, 2015] и PubChem [PubChem, 2015]. Было найдено 2300 химических соединений, испытанных в 93

различных методиках на способность активировать глюкокиназу. После проведения верификации химических структур, устранения дублей, кластерного анализа и проверки данных на непротиворечивость с последующим исключением некорректных данных по биологической активности, было получено 1080 известных соединений, испытанных на активность в отношении глюкокиназы. По результатам кластерного анализа все субстанции были разделены на 5 групп активности: 220 высоко активных (high), 157 умеренно активных (moderate), 344 мало активных (low), 346 соединений с ингибирующей активностью (inverse) и 13 неактивных структур (inactive). Процедура предварительной подготовки банка данных описана в материалах и методах (глава 2).

Для последующей обработки структурной информации этот банк данных был конвертирован в файл стандартного коммуникативного формата *.sdf. Полностью все структуры банка данных приведены в электронном приложении – в формате СУБД ChemFinder 9.0 и в виде sdf-файла.

На созданный банк данных получено свидетельство о государственной регистрации [Свидетельство, 2016], которое приведено в приложении 1.

С целью предварительной оценки перспективности перечисленных в материалах и методах классов новых химических соединений, был проведен поиск производных вышеуказанных скаффолдов в сформированном банке данных известных активаторов ГК с вычислением среднего индекса активности (по трехбалльной шкале). В ходе анализа литературных данных посредством созданного банка данных было выяснено, что достаточно перспективными классами для поиска новых активаторов глюкокиназы являются производные бифенилоксида, дигидробензофурана, пиридина (в том числе биспиридина) и хиназолина (табл 3.1). Также, по значениям среднего индекса активности можно предположить, что производные бензимидазола, бифенила и пиримидина должны обладать низкой активностью в отношении ГК. Для производных тиазолидиндиона проявление ГК-активирующей способности не выявлено.

Таким образом, предварительный анализ ожидаемого уровня активности 8 основных скаффолдов новых химических соединений, выполненный методом

подструктурного поиска в банке данных известных структур позволяет оценить изучаемые классы как достаточно перспективные для поиска активаторов глюкокиназы. Для 6 скаффолдов активности среди известных соединений в БД информации найдено не было, что свидетельствует об их химической новизне как возможных активаторов ГК.

Таблица 3.1 Уровни активности классов новых соединений в БД «Активаторы глюкокиназы» (база данных представлена в электронном приложении 2)

Класс химических соединений	Средний индекс уровня активности по классу*	Уровень активности класса соединений
Бензимидазолы	1,2	Низкоактивные
Бифенилы	0,6	Низкоактивные
Бифенилоксиды	1,5	Умеренноактивные
Дигидробензофураны	1,5	Умеренноактивные
Пиридины	1,3	Умеренноактивные
Пиримидины	1,0	Низкоактивные
Хиназолины	1,3	Умеренноактивные
Тиазолидиндионы	0,0	Неактивные

*общая оценка активности соединения: «3» – высокоактивное; «2» – умеренноактивное; «1» – низкоактивное; «0» – неактивное.

3.3 Консенсусный прогноз соединений с глюкокиназной активностью *in silico*

Ожидаемый уровень активности новых соединений был получен в результате консенсусного прогноза с использованием 3 компьютерных систем: ИТ «Микрокосм» (прогноз по стратегиям); Microcosm BioS (прогноз по сходству с эталонами) и метода докинга. На первом этапе были рассчитаны оценки в каждой из 3 вышеперечисленных систем, а затем были объединены для получения обобщенного консенсусного прогноза.

Прогноз в системе ИТ Микрокосм был проведен с использованием созданного банка данных по структуре и уровню активности известных активаторов глюкокиназы с помощью трех стратегий прогноза (консервативной, нормальной и рискованной). Полученные данные по каждой стратегии усреднялись, таким образом была выявлена консенсусная оценка в виде среднего уровня активности 3 показателей.

По результатам консенсусного прогноза в ИТ Микрокосм достаточно эффективными в отношении активации глюкокиназы классами изучаемых

химических соединений являются бифенилоксиды, биспиридины, пиридины, пиримидины, хиназолины, тиазолидиндионы и тиазолобензимидазолы (табл. 3.2).

Таблица 3.2 Результаты обобщенного консенсусного прогноза в ИТ «Микрокосм» уровня глюкокиназной активности новых соединений в зависимости от скаффолда

Класс химических соединений	Шифр соединения	Индекс уровня активности*	Средний индекс уровня активности скаффолда
Бензимидазолы	ACI-0006	0,3	0,2
	ACI-0018	0,3	
	AZH-0133	0,0	
	AZH-0134	0,0	
	AZH-0135	0,0	
	AZH-0136	0,0	
	AZH-0137	0,3	
	AZH-0141	0,0	
	DF-0008	0,0	
	KD-0006	0,0	
	LOSMD-0004	0,6	
	LOSMD-0022	1,0	
	LOSMD-0023	0,6	
	LOSMD-0024	1,0	
	RYUVK-0026	0,0	
	RYUVK-0042	0,0	
Titiova-0003	0,0		
Бифенилы	BIF-0010	0,3	0,3
	BIF-0014	0,3	
Бифенилоксиды	TONS-0226	1,6	1,0
	TONS-0227	1,3	
	TONS-0232	1,3	
	TONS-0241	0,0	
	TONS-0281	1,3	
	TONS-0336	1,0	
	TONS-0462	0,6	
	TONS-0495	0,6	

Продолжение таблицы 3.2

Класс химических соединений	Шифр соединения	Индекс уровня активности*	Средний индекс уровня активности скаффолда
Биспиридины	NP-001	0,6	0,6
	NP-006	0,6	
	NP-007	0,3	
	NP-061	0,6	
	NP-063	0,6	
Диазепинобензимидазолы	DAB-0017	0,3	0,2
	DAB-0031	0,3	
	DAB-0032	0,0	
	DAB-0033	0,3	
Дигидробензофураны	14102	0,3	0,3
	14144	0,3	
Имидазобензимидазолы	AZH-0143	0,0	0,1
	DF-0001	0,0	
	DF-0002	0,0	
	DF-0004	0,3	
	DF-0005	0,0	
	DF-0006	0,0	
	DF-0007	0,0	
	RU-0047	0,0	
	RU-0052	0,3	
	RU-0053	0,6	
	RU-0054	0,0	
	RU-0055	0,0	
	RU-0057	0,0	
	RU-0254	0,0	
RU-0688	0,0		
Пептидомиметики	GSSG	0,3	0,3
	L-Cis	0,3	
Пиридины	AHIV-10	1,6	0,5
	AHIV-15	1,0	
	AHIV-16	1,0	
	AHIV-17	1,3	
	B-1	0,6	
	B-2	0,6	
	B-5	0,3	
	B-6	0,3	
	B-7	0,3	
	B-8	0,0	
	B-13	0,0	
	B-14	0,3	
	B-15	0,0	
	D-0001	1,0	
	D-0002	0,0	
D-0003	0,6		

Продолжение таблицы 3.2

Класс химических соединений	Шифр соединения	Индекс уровня активности*	Средний индекс уровня активности скаффолда
	D-0004	0,3	
	D-0005	1,0	
	D-0006	1,0	
	D-0007	1,0	
	D-0008	1,0	
	D-0009	1,0	
	D-0010	1,0	
	D-0011	1,0	
	D-0012	1,0	
	D-0013	1,0	
	D-0014	0,6	
	GA-001	0,0	
	MSD-0050	1,3	
	MSD-61	0,0	
	MSD-67	0,0	
	MSD-68	0,0	
	MSD-69	0,0	
	MSD-70	0,0	
	N-0001	0,3	
	N-0002	0,0	
	R-126	0,6	
	R-127	0,0	
	R-134	0,3	
	R-136	0,0	
	R-165	0,0	
	R-181	0,3	
	Rom-1	1,0	
	Rom-2	0,6	
	Sb-119	0,3	
	Sb-120	1,0	
	SP-30	0,6	
	SP-60	0,6	
	V-2	0,0	
V-36	0,0		
V-4	0,0		
V-5	0,0		
V-6	0,6		
Пиримидины	1	0,0	0,9
	2	0,0	
	3	0,0	
	GEPP-0003	0,6	
	GEPP-0009	1,3	
	GEPP-0012	1,0	
	GEPP-0015	1,0	
GEPP-0016	1,3		

Окончание таблицы 3.2

Класс химических соединений	Шифр соединения	Индекс уровня активности*	Средний индекс уровня активности скаффолда
	GEPP-0026	0,6	
	GEPR-0004	1,6	
	GESU-0001	1,3	
	GESU-0003	1,3	
	GESU-0008	1,0	
	MBX-2982	1,0	
	SUM-0029	0,3	
	PF-04937319	2,6	
Хиназолины	SHQU-0003	0,3	0,5
	SHQU-0004	0,0	
	SHQU-0006	0,6	
	SHQU-0007	1,0	
	SHQU-0008	0,0	
	SHQU-0009	0,6	
	SHQU-0011	0,3	
	SHQU-0012	1,0	
	SHQU-0015	0,6	
	SHQU-0019	0,6	
	SHQU-0022	0,6	
	SHQU-0029	0,3	
Тиазолидиндионы	LOSUK-0016	1,0	0,8
	LOSUK-0019	0,6	
Тиазолбензимидазолы	KD-0054	0,3	0,5
	KD-0068	0,0	
	KD-0069	0,3	
	RUS-0189	0,6	
	KHFA-0587	1,0	
	KHFA-0588	1,0	
Триазолопиримидины	HC-0281	0,0	0,1
	HC-0436	0,6	
	HC-0438	0,3	
	HC-0439	0,0	
	HC-0440	0,0	
	HC-0441	0,0	
	HC-0442	0,0	
	HC-0443	0,0	
	HC-0444	0,0	
	HC-0445	0,0	
HC-0580	0,3		

*общая оценка активности соединения: «3» – высокоактивное; «2» – умеренноактивное; «1» – низкоактивное; «0» – неактивное.

Прогноз в системе Microcosm BioS проводился методом структурного сходства к эталонам, в качестве которых выступали известные химические

соединения, изученные мировым научным сообществом на различные виды таргетной активности с учетом тестируемого организма и показателей активности. Для каждого прогнозируемого соединения в QSAR базе Microcosm BioS выявлялось 20 его ближайших структурных аналогов и вычислялась консенсусная оценка как среднеарифметическое индексов активности структурно наиболее близких соединений, испытанных на активность в отношении глюкокиназы Homo Sapiens. По данным прогноза в Microcosm BioS весьма перспективными соединениями для изучения на глюкокиназную активность являются 13 из 14 скаффолдов, за исключением производных пиримидинов (табл. 3.3).

Таким образом, видно, что использование прогноза по структурному сходству с выявлением 20 ближайших аналогов позволяет более точно оценить уровень глюкокиназной активности, чем применение прогноза с использованием банка данных по структуре и уровню активности известных активаторов глюкокиназы.

Таблица 3.3 Прогноз методом максимального структурного сходства к эталонам в системе Microcosm BioS глюкокиназной активности новых соединений

Класс химических соединений	Шифр соединения	Индекс уровня активности*	Средний индекс уровня активности скаффолда
Бензимидазолы	ACI-0006	1	1,1
	ACI-0018	1	
	AZH-0133	1	
	AZH-0134	1	
	AZH-0135	2	
	AZH-0136	1	
	AZH-0137	2	
	AZH-0141	1	
	DF-0008	1	
	KD-0006	1	
	LOSMD-0004	1	
	LOSMD-0022	1	
	LOSMD-0023	1	
	LOSMD-0024	2	
	RYUVK-0026	0	
RYUVK-0042	1		
Titiova-0003	1		
Бифенилы	BIF-0010	1	1,5
	BIF-0014	2	

Продолжение таблицы 3.3

Класс химических соединений	Шифр соединения	Индекс уровня активности*	Средний индекс уровня активности скаффолда
Бифенилоксиды	TONS-0226	2	1,5
	TONS-0227	2	
	TONS-0232	2	
	TONS-0241	1	
	TONS-0281	1	
	TONS-0336	1	
	TONS-0462	1	
	TONS-0495	2	
Биспиридины	NP-001	1	1,0
	NP-006	1	
	NP-007	1	
	NP-061	1	
	NP-063	1	
Диазепинобензимидазолы	DAB-0017	1	1,5
	DAB-0031	1	
	DAB-0032	2	
	DAB-0033	2	
Дигидробензофураны	14102	2	2,0
	14144	2	
Имидазобензимидазолы	AZH-0143	1	1,4
	DF-0001	1	
	DF-0002	1	
	DF-0004	1	
	DF-0005	1	
	DF-0006	1	
	DF-0007	1	
	RU-0047	2	
	RU-0052	1	
	RU-0053	2	
	RU-0054	2	
	RU-0055	2	
	RU-0057	2	
	RU-0254	1	
RU-0688	2		
Пептидомиметики	GSSG	1	2,00
	L-Cis	3	
Пиридины	AHIV-10	2	1,5
	AHIV-15	2	
	AHIV-16	2	
	AHIV-17	2	
	B-1	1	
	B-2	1	
	B-5	2	
	B-6	3	

Продолжение таблицы 3.3

Класс химических соединений	Шифр соединения	Индекс уровня активности*	Средний индекс уровня активности скаффолда
	B-7	2	
	B-8	2	
	B-13	2	
	B-14	2	
	B-15	2	
	D-0001	1	
	D-0002	1	
	D-0003	2	
	D-0004	1	
	D-0005	2	
	D-0006	2	
	D-0007	2	
	D-0008	1	
	D-0009	1	
	D-0010	1	
	D-0011	1	
	D-0012	1	
	D-0013	1	
	D-0014	1	
	GA-001	2	
	MSD-0050	2	
	MSD-61	1	
	MSD-67	1	
	MSD-68	1	
	MSD-69	1	
	MSD-70	1	
	N-0001	2	
	N-0002	1	
	R-126	2	
	R-127	1	
	R-134	2	
	R-136	2	
	R-165	1	
	R-181	1	
	Rom-1	2	
	Rom-2	1	
	Sb-119	2	
	Sb-120	3	
	SP-30	1	
	SP-60	1	
	V-2	1	
	V-36	2	
	V-4	1	
	V-5	0	
	V-6	2	

Окончание таблицы 3.3

Класс химических соединений	Шифр соединения	Индекс уровня активности*	Средний индекс уровня активности скаффолда
Пиримидины	1	1	0,8
	2	1	
	3	1	
	GEPP-0003	1	
	GEPP-0009	1	
	GEPP-0012	1	
	GEPP-0015	1	
	GEPP-0016	1	
	GEPP-0026	1	
	GEPR-0004	1	
	GESU-0001	0	
	GESU-0003	0	
	GESU-0008	1	
	MBX-2982	1	
	SUM-0029	0	
PF-04937319	2		
Хиназолины	SHQU-0003	0	1,5
	SHQU-0004	2	
	SHQU-0006	2	
	SHQU-0007	2	
	SHQU-0008	1	
	SHQU-0009	2	
	SHQU-0011	1	
	SHQU-0012	1	
	SHQU-0015	2	
	SHQU-0019	2	
	SHQU-0022	2	
	SHQU-0029	1	
Тиазолидиндионы	LOSUK-0016	1	1,0
	LOSUK-0019	1	
Тиазолбензимидазолы	KD-0054	1	1,1
	KD-0068	1	
	KD-0069	2	
	RUS-0189	1	
	KHFA-0587	1	
	KHFA-0588	1	
Триазолопиримидины	HC-0281	1	1,2
	HC-0436	1	
	HC-0438	1	
	HC-0439	1	
	HC-0440	1	
	HC-0441	2	
	HC-0442	1	
	HC-0443	2	
	HC-0444	2	
	HC-0445	1	
HC-0580	1		

*общая оценка активности соединения: «3» – высокоактивное; «2» – умеренноактивное; «1» – низкоактивное; «0» - неактивное.

При проведении докинга в 3D-модель глюкокиназы для каждого из 155 прогнозируемых соединений были получены значения энергии докинга ΔE ,

которые были переведены в балльные оценки путем построения доверительного интервала для медианы упорядоченных значений энергии докинга. Соединения, у которых ΔE была ниже, чем верхняя граница доверительного интервала считались высокоактивными (индекс уровня активности=3); входящие в доверительный интервал – умеренноактивными (индекс уровня активности=2); вещества, у которых ΔE была больше нижней границы доверительного интервала для медианы имели индекс уровня активности равный 1, и считались низкоактивными. Все субстанции, у которых энергия докинга была меньше -5.0 ккал/моль считались неактивными в отношении глюкокиназы, поскольку такое значение ΔE определяет практически отсутствующее связывание лиганда с сайтом (индекс уровня активности=0). Величина энергии докинга (аффинность соединения) была преобразована в трёхбалльную систему, что в дальнейшем позволило ее объединить с результатами прогноза в трех предыдущих системах.

По результатам прогноза методом докинга видно, что все изучаемые скаффолды можно считать перспективными для дальнейшего изучения в качестве источников соединений с возможной глюкокиназной активностью. Приняв за граничное значение среднего индекса активности величину 1,50, определили, что наиболее перспективными являются производные бензимидазола, бифенила, бифенилоксида, diaзепинобензимидазолы, пиримидина, хиназолина, тиазолидиндиона, тиазолбензимидазола и триазолопиримидина (табл. 3.4).

Таблица 3.4 Прогноз методом докинга уровня глюкокиназной активности новых соединений в программе AutoDock Vina 1.1.1

Класс химических соединений	Шифр соединения	Индекс уровня активности*	Средний индекс уровня активности скаффолда
Бензимидазолы	ACI-0006	1	1,5
	ACI-0018	2	
	AZH-0133	1	
	AZH-0134	1	
	AZH-0135	2	
	AZH-0136	1	
	AZH-0137	2	
	AZH-0141	2	

Продолжение таблицы 3.4

Класс химических соединений	Шифр соединения	Индекс уровня активности*	Средний индекс уровня активности скаффолда
	DF-0008	1	
	KD-0006	2	
	LOSMD-0004	2	
	LOSMD-0022	2	
	LOSMD-0023	2	
	LOSMD-0024	2	
	RYUVK-0026	1	
	RYUVK-0042	2	
	Titiova-0003	1	
Бифенилы	BIF-0010	2	1,5
	BIF-0014	1	
Бифенилоксиды	TONS-0226	3	2,5
	TONS-0227	3	
	TONS-0232	2	
	TONS-0241	3	
	TONS-0281	1	
	TONS-0336	2	
	TONS-0462	3	
	TONS-0495	3	
Биспиридины	NP-001	1	1,0
	NP-006	1	
	NP-07	1	
	NP-0061	1	
	NP-063	1	
Диазепинобензимидазолы	DAB-0017	2	1,7
	DAB-0031	1	
	DAB-0032	2	
	DAB-0033	2	
Дигидробензофураны	14102	1	1,0
	14144	1	
Имидазобензимидазолы	AZH-0143	2	1,4
	DF-0001	2	
	DF-0002	2	
	DF-0004	1	
	DF-0005	2	
	DF-0006	1	
	DF-0007	2	
	RU-0047	1	
	RU-0052	1	
	RU-0053	1	
	RU-0054	1	
	RU-0055	1	
	RU-0057	1	
	RU-0254	1	
RU-0688	2		
Пептидомиметики	GSSG	1	1,0

Продолжение таблицы 3.4

Класс химических соединений	Шифр соединения	Индекс уровня активности*	Средний индекс уровня активности скаффолда
	L-Cis	1	
Пиридины	АНIV-10	2	1,1
	АНIV-15	2	
	АНIV-16	1	
	АНIV-17	2	
	B-1	2	
	B-2	1	
	B-5	1	
	B-6	1	
	B-7	1	
	B-8	1	
	B-13	1	
	B-14	1	
	B-15	1	
	D-0001	1	
	D-0002	1	
	D-0003	1	
	D-0004	1	
	D-0005	1	
	D-0006	1	
	D-0007	1	
	D-0008	2	
	D-0009	2	
	D-0010	1	
	D-0011	2	
	D-0012	1	
	D-0013	2	
	D-0014	1	
	GA-001	1	
	MSD-0050	1	
	MSD-61	1	
	MSD-67	1	
	MSD-68	1	
	MSD-69	1	
	MSD-70	1	
	N-0001	1	
	N-0002	1	
	R-126	1	
	R-127	1	
	R-134	1	
	R-136	1	
R-165	1		
R-181	1		
Rom-1	1		
Rom-2	1		

Продолжение таблицы 3.4

Класс химических соединений	Шифр соединения	Индекс уровня активности*	Средний индекс уровня активности скаффолда
	Sb-119	1	
	Sb-120	1	
	SP-30	1	
	SP-60	1	
	V-2	1	
	V-36	1	
	V-4	1	
	V-5	1	
	V-6	1	
Пиримидины	1	3	1,5
	2	2	
	3	1	
	GEPP-0003	2	
	GEPP-0009	1	
	GEPP-0012	1	
	GEPP-0015	1	
	GEPP-0016	2	
	GEPP-0026	2	
	GEPR-0004	1	
	GESU-0001	1	
	GESU-0003	1	
	GESU-0008	1	
	MBX-2982	2	
	SUM-0029	1	
PF-04937319	2		
Хиназолины	SHQU-0003	2	1,9
	SHQU-0004	1	
	SHQU-0006	2	
	SHQU-0007	2	
	SHQU-0008	2	
	SHQU-0009	2	
	SHQU-0011	2	
	SHQU-0012	2	
	SHQU-0015	2	
	SHQU-0019	2	
	SHQU-0022	2	
	SHQU-0029	2	
Тиазолидиндионы	LOSUK-0016	2	2,0
	LOSUK-0019	2	
Тиазолбензимидазолы	KD-0054	2	1,8
	KD-0068	2	
	KD-0069	2	
	RUS-0189	2	
	KHFA-0587	2	
	KHFA-0588	1	

Окончание таблицы 3.4

Класс химических соединений	Шифр соединения	Индекс уровня активности*	Средний индекс уровня активности скаффолда
Триазолопиримидины	НС-0281	2	1,8
	НС-0436	1	
	НС-0438	1	
	НС-0439	2	
	НС-0440	2	
	НС-0441	2	
	НС-0442	2	
	НС-0443	2	
	НС-0444	2	
	НС-0445	2	
НС-0580	2		

*общая оценка активности соединения: «3» – высокоактивное; «2» – умеренноактивное; «1» – низкоактивное; «0» – неактивное.

По результатам прогноза с использованием 3 компьютерных систем были рассчитаны консенсусные индексы возможного уровня глюкокиназной активности изучаемых новых соединений, которые были переведены в качественные оценки знаковой системы «+/-», где «+» - средний прогнозный индекс метода $\geq 0,5$, а «-» - средний прогнозный индекс метода $\leq 0,5$, при этом целесообразность исследования *in vitro* определялась наличием хотя бы одной положительной оценки.

По данным таблицы 3.5 видно, что все 14 классов химических соединений являются перспективными источниками потенциальных активаторов ГК. Таким образом, в результате вычисления обобщенной консенсусной прогнозной оценки с использованием, в данном случае, 3 методов прогноза, повышается точность оценивания и снижается число ошибок.

Было также обнаружено, что наиболее активными классами соединений в отношении ГК можно считать производные бифенилоксида, биспиридина, пиридина, пиримидина, хиназолина, тиазолидиндиона и тиазолобензимидазола, которые обладали наибольшей суммарной оценкой качественного прогноза в трёх компьютерных системах.

Таблица 3.5 Качественный прогноз в трёх компьютерных системах уровня глюкокиназной активности новых соединений

Класс химических соединений	Наличие уровня активности			
	MC Testing*	MC Bios*	Докинг*	Целесообразность исследований <i>in vitro</i>
Бензимидазолы	-	+	+	++
Бифенилы	-	+	+	++
Бифенилоксиды	+	+	+	+++
Биспиридины	+	+	+	+++
Диазепинобензимидазолы	-	+	+	++
Дигидробензофураны	-	+	+	++
Имидазобензимидазолы	-	+	+	++
Пептидомиметики	-	+	+	++
Пиридины	+	+	+	++
Пиримидины	+	+	+	+++
Хиназолины	+	+	+	+++
Тиазолидиндионы	+	+	+	+++
Тиазолобензимидазолы	+	+	+	+++
Триазолопиримидины	-	+	+	++
PF-04937319	+	+	+	+++

*качественная оценка наличия активности: «+» – средний прогнозный индекс метода $\geq 0,5$; «-» – средний прогнозный индекс метода $\leq 0,5$.

3.4 Заключение

Проведенный консенсусный прогноз уровня глюкокиназной активности 14 различных классов химических соединений позволяет утверждать, что все вышеуказанные скаффолды могут рассматриваться как перспективные источники соединений для поиска активаторов глюкокиназы. Для препарата сравнения PF-04937319 была получена довольно высокая прогнозная оценка, что подтверждает наличие вышеуказанной активности [Sharma R., 2014] и адекватности проведенного виртуального исследования.

Следует также подчеркнуть, что расчетные оценки фармакологической активности являются доэкспериментальными и не дают возможности совершенно точно определить самые активные соединения. Компьютерные методы исследования оценивают перспективы отдельных веществ или групп химических соединений как возможных активных в данном фармакологическом тесте и позволяют ограничить объем экспериментальных работ.

ГЛАВА 4. ПОИСК НОВЫХ АКТИВАТОРОВ ГЛЮКОКИНАЗЫ *IN VITRO*

4.1 Поиск новых активаторов глюкокиназы в тест-системе *in vitro*

При выборе соединений для последовательного экспериментального скрининга руководствовались, с одной стороны, базой данных, содержащей информацию о химической структуре известных лекарственных препаратов и соединений, которые были исследованы в различных экспериментальных и клинических тестах на наличие соответствующей активности, и с другой стороны, провели виртуальный скрининг, прогнозирующий данную активность. Таким образом, было определено 155 соединений с потенциальной глюкокиназной активностью.

В настоящей работе был выполнен скрининг способности 155 новых химических соединений влиять на активность глюкокиназы *in vitro* в концентрации 100 мкМ в сравнении с эталонным веществом PF-04937319. Также, был проведен кластерный анализ экспериментальных значений глюкокиназной активности новых соединений в соответствии с химическим классом вышеуказанных субстанций. Была валидирована методика поиска новых активаторов глюкокиназы спектрофотометрическим методом в тест-системе *in vitro*.

Кластерный анализ в программе Statistica 8.0 методом k-средних значений глюкокиназной активности новых соединений позволил выявить три кластера со следующими границами активности:

- 1) высокая «high» $\Delta\% \geq 75$ – 25 соединений;
- 2) умеренная или низкая «moderate or low» $\Delta\% > 0$ – 83 соединений;
- 3) отсутствие активности «inactive» $\Delta\% \leq 0$ – 47 соединений,

$\Delta\%$ - Активация ГК в концентрации 100 мкМ, %

Распределение соединений по кластерам в соответствии с трехбалльными индексами уровней их активности приведены в табл. 4.1. Индексы уровней активности были определены следующим образом:

1. Соединения, не активирующие ГК (отрицательный % активации) – 0

2. Соединения, активирующие ГК в диапазоне от 0 до 71,41% в концентрации 100 мкМ – 1

3. Соединения, активирующие ГК в диапазоне от 75,08 до 407,22% в концентрации 100 мкМ – 2

Достоверность кластеризации экспериментальных значений ГК активности составляет по критерию Фишера $F(1,111) = 388,4$, $p < 1 \cdot 10^{-7}$.

Таблица 4.1 Влияние производных азотсодержащих гетероциклических соединений на активность глюкокиназы *in vitro*

Класс химических соединений	Шифр соединения	Активация ГК в концентрации 100 мкМ, Δ% (M±SEM)	Индекс уровня активности по данным кластерного анализа**	Средняя активность скаффолда, Δ%	Средний индекс уровня активности скаффолда
Бензимидазолы	ACI-0006	-4,02±3,91*	0	10,89	0,8
	ACI-0018	-3,98±2,5*	0		
	AZH-0133	2,77±0,59*	1		
	AZH-0134	2,57±0,77*	1		
	AZH-0135	5,5±1,13*	1		
	AZH-0136	2,4±1,04*	1		
	AZH-0137	8,06±1,52*	1		
	AZH-0141	4,03±0,94*	1		
	DF-0008	2,49±0,49*	1		
	KD-0006	85,85±5,73*	2		
	LOSMD-0004	3,02±1,35*	1		
	LOSMD-0022	5,81±9,85*	1		
	LOSMD-0023	1,98±0,99*	1		
	LOSMD-0024	14,14±3,54*	1		
	RYUVK-0026	17,06±0,72*	1		
	RYUVK-0042	41,49±1,00*	1		
Titiova-0003	-0,58±3,48	0			
Бифенилы	BIF-0010	2,41±0,36*	1	4,48	1,0
	BIF-0014	6,55±2,10*	1		
Бифенилоксиды	TONS-0226	-0,16±0,7	0	0,72	0,1
	TONS-0227	-1,33±1,19	0		
	TONS-0232	-1,02±0,40	0		
	TONS-0241	-0,42±1,86	0		
	TONS-0281	16,53±2,55*	1		
	TONS-0336	-3,17±1,59	0		
	TONS-0462	-2,29±1,09	0		
	TONS-0495	-2,42±1,57	0		

Продолжение таблицы 4.1.

Класс химических соединений	Шифр соединения	Активация ГК в концентрации 100 мкМ, Δ% (M±SEM)	Индекс уровня активности по данным кластерного анализа**	Средняя активность скаффолда, Δ%	Средний индекс уровня активности скаффолда
Биспиридины	NP-001	130,45±0,99*	2	92,44	1,8
	NP-006	150,55±1,77*	2		
	NP-007	6,02±0,55*	1		
	NP-061	84,54±1,31*	2		
	NP-063	90,66±1,16*	2		
Диазепинобензимидазолы	DAB-0017	45,43±1,98*	1	26,37	1,0
	DAB-0031	55,34±4,10*	1		
	DAB-0032	3,56±1,81*	1		
	DAB-0033	1,13±0,69*	1		
Дигидробензофураны	14102	154,47±2,71*	2	99,87	1,5
	14144	45,26±2,77	1		
Имидазобензимидазолы	AZH-0143	8,27±1,65*	1	69,17	1,2
	DF-0001	3,39±1,53*	1		
	DF-0002	2,86±0,87*	1		
	DF-0004	8,8±1,07*	1		
	DF-0005	5,87±0,76*	1		
	DF-0006	5,82±1,53*	1		
	DF-0007	4,33±1,91*	1		
	RU-0047	58,43±3,94*	1		
	RU-0052	254,54±5,99*	2		
	RU-0053	167,85±4,97*	2		
	RU-0054	109,10±10,10*	2		
	RU-0055	214,08±3,46*	2		
	RU-0057	68,97±1,25*	1		
	RU-0254	-0,18±2,37*	0		
RU-0688	125,36±7,95*	2			
Пептидомиметики	GSSG	-7,86±3,29*	0	-5,98	0,0
	L-Cis	-4,11±4,35*	0		
Пиридины	AHIV-10	75,08±2,23*	2	14,57	0,6
	AHIV-15	50,79±3,57*	1		
	AHIV-16	20,19±1,34*	1		
	AHIV-17	29,65±1,34*	1		
	B-1	-1,16±6,90*	0		
	B-2	-5,13±5,48*	0		
	B-5	0,38±3,18*	1		
	B-6	-1,27±1,15*	0		
	B-7	114,36±2,19*	2		
	B-8	92±3,27*	2		
	B-13	0,75±0,10*	1		
	B-14	38,54±3,20**	1		
	B-15	-8,83±1,08*	0		
	D-0001	16,38±6,51*	1		

Класс химических соединений	Шифр соединения	Активация ГК в концентрации 100 мкМ, Δ% (M±SEM)	Индекс уровня активности по данным кластерного анализа**	Средняя активность скаффолда, Δ%	Средний индекс уровня активности скаффолда
	D-0002	1,70±7,82*	1		
	D-0003	-3,87±17,10*	0		
	D-0004	-2,83±5,12*	0		
	D-0005	-2,87±4,89*	0		
	D-0006	5,25±3,78*	1		
	D-0007	-5,55±6,25*	0		
	D-0008	-1,55±59,18	0		
	D-0009	-4,18±2,60*	0		
	D-0010	-2,00±7,93*	0		
	D-0011	-3,97±3,30*	0		
	D-0012	3,62±1,67*	1		
	D-0013	3,36±8,73*	1		
	D-0014	4,99±8,42*	1		
	GA-001	10,1±1,51*	1		
	MSD-0050	-3,6±2,35*	1		
	MSD-61	-6,35±2,31*	0		
	MSD-67	9,87±1,17*	1		
	MSD-68	-5,98±2,41*	1		
	MSD-69	11,3±2,19*	1		
	MSD-70	14,36±2,61*	1		
	N-0001	-2,10±1,42*	0		
	N-0002	2,18±4,82*	1		
	R-126	-4,76±0,54*	0		
	R-127	-3,60±0,86*	0		
	R-134	16,91±0,36*	1		
	R-136	177,36±0,41*	2		
	R-165	-11,54±0,87*	0		
	R-181	-21,03±0,22*	0		
	Rom-1	49,79±18,78*	1		
	Rom-2	89,83±13,83*	2		
	Sb-119	-53.63±3,81*	0		
	Sb-120	-58.36±3,31*	0		
	SP-30	-3,23±7,73*	0		
	SP-60	-19,10±7,38*	0		
	V-2	16,18±3,95	1		
	V-36	11,77±0,42*	1		
	V-4	8,25±0,7*	1		
	V-5	29,12±5,13	1		
	V-6	71,41±2,25*	1		
Пиримидины	1	6,81±2,05*	1	16,73	0,8
	2	41,43±4,46*	1		
	3	7,56±11,12*	1		

Продолжение таблицы 4.1.

Класс химических соединений	Шифр соединения	Активация ГК в концентрации 100 мкМ, Δ% (M±SEM)	Индекс уровня активности по данным кластерного анализа**	Средняя активность скаффолда, Δ%	Средний индекс уровня активности скаффолда
	GEPP-0003	0,31±0,83*	1		
	GEPP-0009	5,89±3,45*	1		
	GEPP-0012	-4,63±1,71*	0		
	GEPP-0015	7,47±1,6*	1		
	GEPP-0016	-28,65±0,44*	0		
	GEPP-0026	1,18±3,55*	1		
	GEPR-0004	-2,51±3,64*	1		
	GESU-0001	-8,79±0,79*	0		
	GESU-0003	-2,07±2,12*	0		
	GESU-0008	-1,23±0,83*	0		
	MBX-2982	83,51±4,46*	2		
	SUM-0029	2,06±1,5*	1		
	PF-04937319	154,36±5,32*	2		
Хиназолины	SHQU-0003	0,04±0,7*	1	11,31	0,9
	SHQU-0004	-0,82±1,89*	0		
	SHQU-0006	95,73±7,74*	2		
	SHQU-0007	10,05±1,86*	1		
	SHQU-0008	2,92±1,08*	1		
	SHQU-0009	2,04±1,09*	1		
	SHQU-0011	-1,22±1,03*	0		
	SHQU-0012	2,13±0,19*	1		
	SHQU-0015	12,41±0,34*	1		
	SHQU-0019	7,72±2,07*	1		
	SHQU-0022	2,87±0,37*	1		
SHQU-0029	1,82±4,84*	1			
Тиазолидин дионы	LOSUK-0016	14,46±3,25*	1	40,71	1,0
	LOSUK-0019	66,96±5,14*	1		
Тиазолобенз имидазолы	KD-0054	206,01±5,23*	2	102,92	1,6
	KD-0068	176,11±1,92*	2		
	KD-0069	119,03±6,37*	2		
	RUS-0189	103,22±3,82*	2		
	KHFA-0587	8,33±3,57*	1		
	KHFA-0588	4,83±1,59*	1		
Триазолопир имидины	HC-0281	199,11±3,15*	2	26,45	0,7
	HC-0436	2,06±5,77*	1		
	HC-0438	97,45±14,5*	2		
	HC-0439	-5,80±3,74*	0		
	HC-0440	3,53±1,10*	1		
	HC-0441	-1,53±3,43*	0		
	HC-0442	-2,36±3,19*	0		

Окончание таблицы 4.1.

Класс химических соединений	Шифр соединения	Активация ГК в концентрации 100 мкМ, Δ% (M±SEM)	Индекс уровня активности по данным кластерного анализа**	Средняя активность скаффолда, Δ%	Средний индекс уровня активности скаффолда
	НС-0443	2,64±2,04*	1		
	НС-0444	-2,88±4,44*	0		
	НС-0445	-2,29±2,09*	0		
	НС-0580	1,03±3,42*	1		

* Данные статистически значимы по отношению к отрицательному контролю (Манн-Уитни, $p < 0,05$).

**общая оценка активности соединения: «2» – высокоактивное; «1» – умеренно- или низкоактивное; «0» – не активное.

Соединения из класса **бензимидазола** относятся к низкоактивным соединениям в отношении глюкокиназы (средний % активации ГК в концентрации 100 мкМ = 10,89; средний индекс уровня активности 0,8). Лишь одно соединение под шифром KD-0006 имеет индекс уровня активности равный 2.

По данным табл. 4.1, производные **бифенила** являются низкоактивными соединениями в отношении глюкокиназы (средний % активации ГК в концентрации 100 мкМ = 4,48; средний индекс уровня активности 1,0).

Все изученные субстанции из класса **бифенилоксида** можно охарактеризовать как низкоактивные в отношении глюкокиназы (средний % активации ГК в концентрации 100 мкМ = 0,72; средний индекс уровня активности 0,1), большинство из них имеет отрицательный % активации глюкокиназы.

К классу **биспиридина** относятся 5 соединений, 4 из которых имеют % активации глюкокиназы в концентрации 100 мкМ выше 75. Соответственно, данный скаффолд является высокоактивным в отношении глюкокиназы (средний % активации ГК в концентрации 100 мкМ = 92,44; средний индекс уровня активности 1,8).

В соответствии со средним % активации ГК в концентрации 100 мкМ равным 26,37 и средним индексом уровня активности равным 1,0, можно сделать вывод о том, что **дiazепинобензимидазолы** - умеренноактивные соединения в отношении глюкокиназы.

Производные **дигидробензофурана** можно отнести к умеренноактивным соединениям в отношении глюкокиназы, поскольку средний % активации ГК в концентрации 100 мкМ равен 99,87, а средний индекс уровня активности - 1,5.

Имидазобензимидазолы, в большинстве своем, характеризуются как умеренноактивные соединения в отношении глюкокиназы (средний % активации ГК в концентрации 100 мкМ = 69,17; средний индекс уровня активности 1,2). Только 4 соединения из 15 в вышеуказанном классе имеют индекс активности 2.

Пептидомиметики не активны в отношении глюкокиназы (средний % активации ГК в концентрации 100 мкМ = -5,99; средний индекс уровня активности 0,0).

Согласно данным среднего % активации ГК в концентрации 100 мкМ (14,57) и среднего индекса уровня активности (0,6), производные **пиридина** - умеренноактивные соединения в отношении глюкокиназы. Однако, однозначно отнести данный класс химических соединений к какому-либо уровню активности сложно, поскольку % активации ГК изученных соединений варьирует в диапазоне от -58.36 ± 3.31 до 177.36 ± 0.41 .

Производные **пиримидина** являются умеренноактивными соединениями в отношении глюкокиназы (средний % активации ГК в концентрации 100 мкМ = 16,73; средний индекс уровня активности 0,8). К этому классу относится препарат сравнения PF-04937319, у которого индекс активности равен 2 (высокоактивное соединение по данным кластерного анализа).

Соединения из класса **хиназолина** характеризуются умеренной активностью в отношении глюкокиназы (средний % активации ГК в концентрации 100 мкМ = 11,31; средний индекс уровня активности 0,9).

По данным табл. 4.1 видно, что **тиазолидиндионы** относятся к умеренноактивным соединениям в отношении глюкокиназы (средний % активации ГК в концентрации 100 мкМ = 40,71; средний индекс уровня активности 1,0).

Производные **тиазолобензимидазола** отмечены как высокоактивные соединения в отношении глюкокиназы (средний % активации ГК в концентрации 100 мкМ = 102,92; средний индекс уровня активности 1,6).

Соединения из класса **триазолопиримидина** можно охарактеризовать как умеренноактивные в отношении глюкокиназы (средний % активации ГК в концентрации 100 мкМ = 26,45; средний индекс уровня активности 0,7).

Таким образом, низкоактивными или не активными скаффолдами в отношении глюкокиназы являются производные бензимидазола, бифенила, бифенилоксида и пептидомиметиков; умеренноактивными – диазепинобензимидазола, дигидробензофурана, имидазобензимидазола, пиридина, пиримидина, хиназолина, тиазолидиндиона и триазолопиримидина.

Высокой ГК-активностью обладали производные биспиридина и тиазолбензимидазола, при этом, в группе биспиридина для 2 соединений было определено значение EC_{50} близкое с таковым у препарата сравнения (табл. 4.3).

При сопоставлении результатов виртуального прогноза и данных *in vitro*, было установлено, что консенсусные оценки соединений с высокой степенью достоверности статистически соответствуют экспериментально определенным значениям уровней активности изученных активаторов глюкокиназы (по точному критерию Фишера $p < 5 \cdot 10^{-5}$). По данным таблицы 4.2 установлено, что для 12 классов химических соединений из 14 (а также для препарата сравнения PF-04937319) индексы уровней активности в исследованиях *in silico* и исследованиях *in vitro* совпадают, что говорит о целесообразности и адекватности проведения доэкспериментального виртуального скрининга.

Таблица 4.2 Соответствие консенсусных прогнозных оценок *in silico* и экспериментальных показателей ГК активности *in vitro*.

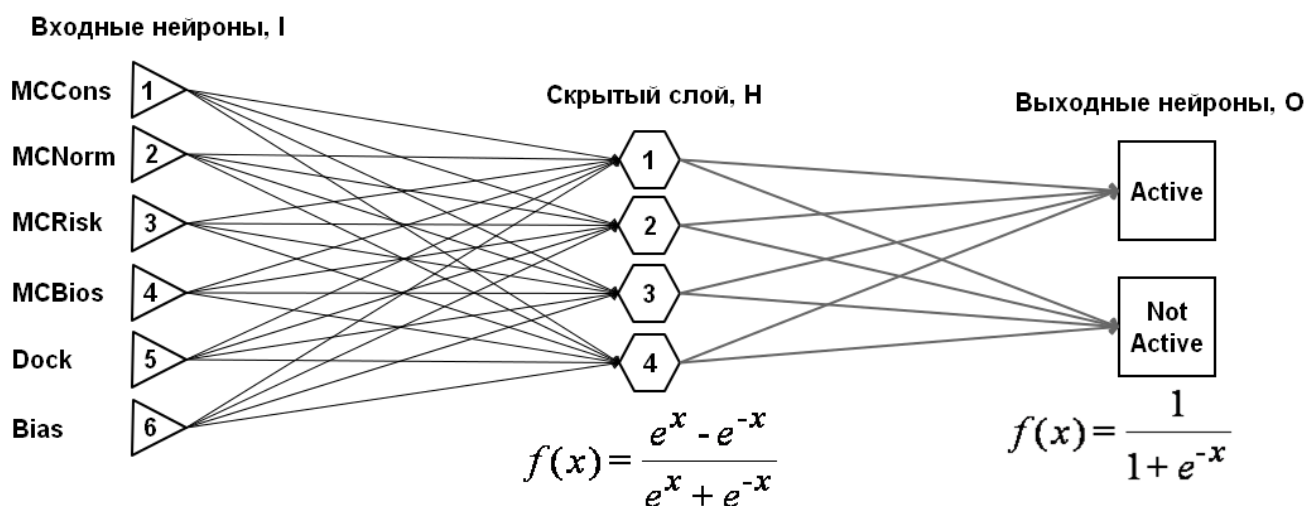
Класс химических соединений	Наличие уровня активности в исследованиях		
	<i>in silico</i> *	<i>in vitro</i> *	Соответствие
Бензимидазолы	+	+	+
Бифенилы	+	+	+
Бифенилоксиды	+	-	-
Биспиридины	+	+	+
Диазепинобензимидазолы	+	+	+
Дигидробензофураны	+	+	+
Имидазобензимидазолы	+	+	+
Пептидомиметики	+	-	-
Пиразолотриазин	+	+	+

Окончание таблицы 4.2.

Класс химических соединений	Наличие активности в исследованиях		
	<i>in silico</i> *	<i>in vitro</i> *	Соответствие
Пиридины	+	+	+
Пиримидины	+	+	+
Хиназолины	+	+	+
Тиазолидиндионы	+	+	+
Тиазолобензимидазолы	+	+	+
Триазолопиримидины	+	+	+
PF-04937319	+	+	+

*качественная оценка наличия активности: «+» – средний прогнозный индекс метода $\geq 0,5$; «-» – средний прогнозный индекс метода $\leq 0,5$.

Для создания системы направленного поиска активаторов глюкокиназы была построена искусственная нейронная сеть с использованием пяти расчётных оценок, полученных в трех различных системах прогноза, а именно: 3 оценки по консервативной, нормальной и рискованной стратегиям прогноза в ИТ «Микрокосм»; оценка, полученная в Microcosm BioS; оценка, полученная с помощью докинга. Вышеуказанные переменные выступали в качестве входных нейронов сети, выходными нейронами считались 2 группировки экспериментальной активности соединений. Первая группировка содержала 2 группы активности: 1 - высокоактивные; 2 - вещества с умеренной или низкой активностью и неактивные. Вторая группировка также содержала 2 группы: активные (высокоактивные, умеренноактивные и низкоактивные) против неактивных. Поскольку построение нейросети по схеме первой группировки не дало статистически значимого результата, была выбрана группировка «активные против неактивных». Для этого случая статистическая достоверность точности классификации с использованием найденной нейронной сети составила по точному критерию Фишера $p < 5 \cdot 10^{-5}$. Указанная нейронная сеть была построена с помощью модуля Statistica Neural Networks [Нейронные, 2008] программы Statistica 8.0 [Statistica, 2019], архитектура и показатели точности классификации данной нейросети представлены на рисунке 4.1.



MLP 5-4-2 Tanh Logistic $F_0=82.0\%$ $AUC_{ROC}=0.759$ $N=155$ $p<5 \cdot 10^{-5}$

Рисунок 4.1 Архитектура искусственной нейронной сети для классификации новых соединений на активные и неактивные активаторы глюкокиназы. MLP 5-4-2 – многослойный перцептрон (MultiLayer Perceptron) с 5 входными, 4 скрытыми и 2 выходными нейронами; Tanh и Logistic - активационные функции скрытого и выходного слоев (приведены в виде формул); F_0 - точность прогноза «активные против неактивных соединений»; AUC_{ROC} –площадь под ROC-кривой; N – количество соединений; $p < 5 \cdot 10^{-5}$ -статистическая значимость точности нейросети по точному критерию Фишера.

При анализе нейронной сети определялась чувствительность входных нейронов, т. е. степень влияния конкретной расчётной оценки на сигнал выходного нейрона (достоверность классификации). В результате были получены следующие значения: для консервативной стратегии в ИТ «Микрокосм» (MCCons) 1,50; для оценки, полученной по нормальной стратегии 1,53; по рискованной стратегии ,1,32. В системе Microcosm BioS значение чувствительности данного нейрона составляла 1,08; для метода докинга 1,34. Наибольшей чувствительностью обладали нейроны, соответствующие стратегиям ИТ «Микрокосм», а именно нормальной и консервативной.

Таким образом, вышеуказанные показатели вносят достаточно весомый вклад для точной классификации 155 структурно разнообразных соединений, испытанных на активность (или неактивность) в отношении глюкокиназы.

4.2 Влияние наиболее перспективных соединений на активность глюкокиназы в зависимости от концентрации *in vitro*

В результате проведенного направленного поиска 155 новых активаторов глюкокиназы в широком диапазоне концентраций (от 1 до 300 мкМ), у 16 соединений выявлено концентрационно-зависимое активирующее влияние на ГК *in vitro*, из которых 3 изучаемые субстанции (лабораторные шифры NP-001, NP-006, HC-0281) были сопоставимы с препаратом сравнения PF-04937319 по показателю EC₅₀ (табл. 4.3).

Таблица 4.3 Влияние наиболее активных соединений на активность глюкокиназы *in vitro*.

№	Шифр соединения	EC ₅₀ , мкМ
1.	NP-006	18,56*
2.	NP-001	33,40*
3.	HC-0281	35,49*
4.	KD-0069	143,2*
5.	LOSUK-0019	147,2*
6.	14102	173,4*
7.	KD-0068	279,5*
8.	RU-0052	517,6
9.	RU-0053	563,5*
10.	RYUVK-0042	693,5*
11.	KD-0054	1522*
12.	RU-0688	2416*
13.	RUS-0189	3411*
14.	HC-0438	7600*
15.	RU-0055	82050*
16.	PF-04937319	6,80*

* Данные статистически значимы по отношению к отрицательному контролю (Манн-Уитни, $p < 0,05$).

Для проведения дальнейших исследований на интактных животных были выбраны соединения со значениями EC₅₀ менее 200 мкМ. На рисунках 4.2-4.4

приведены графики концентрационно-зависимого активирования глюкокиназы наиболее активных соединений и препарата сравнения PF-04937319.

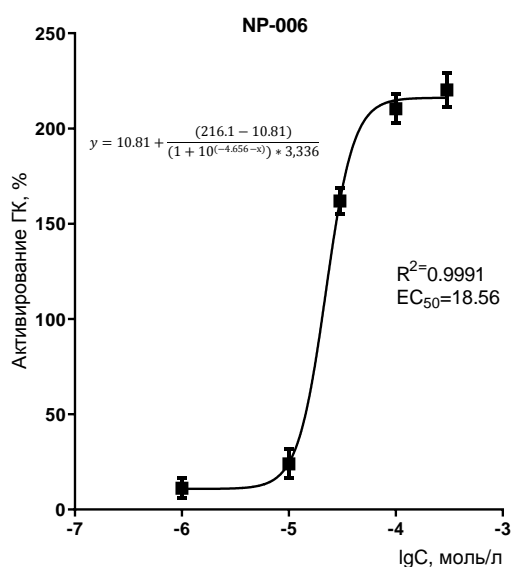


Рисунок 4.2 Влияние соединения NP-006 на активность глюкокиназы (ГК) в исследованиях *in vitro*.

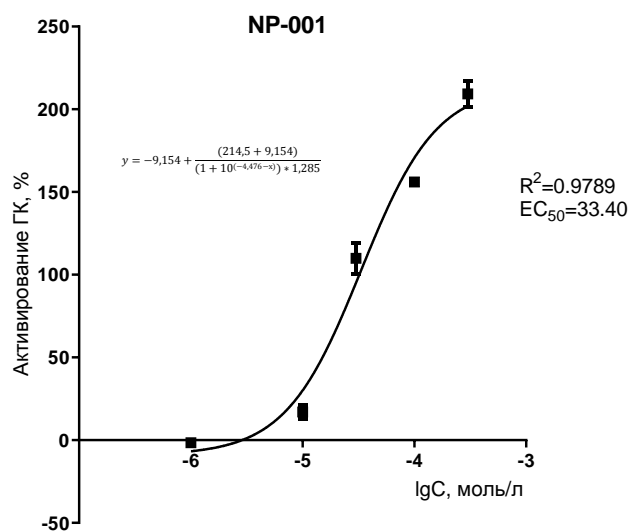


Рисунок 4.3 Влияние соединения NP-001 на активность глюкокиназы (ГК) в исследованиях *in vitro*.

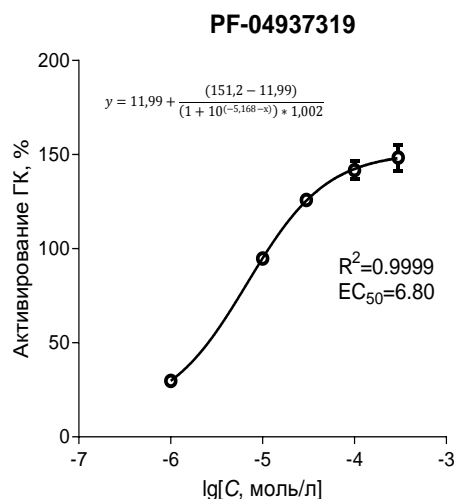


Рисунок 4.4 Влияние соединения PF-04937319 на активность глюкокиназы (ГК) в исследованиях *in vitro*.

4.3 Исследование взаимосвязи между структурой и фармакологической активностью изучаемых соединений

В ходе анализа зависимости структура-активность 14 изученных скаффолдов было найдено, что наибольшее количество активных соединений было характерно для производных биспиридина (табл. 4.4), где согласно значениям, полученным по EC_{50} , количество субстанций с высокой ГК-активностью составляло 4 из 5 (80%), что позволяет рекомендовать соединения вышеуказанного класса химических веществ для дальнейших исследований в отношении ГК *in vivo*.

Таблица 4.4 Количество активных активаторов глюкокиназы в различных классах изучаемых веществ

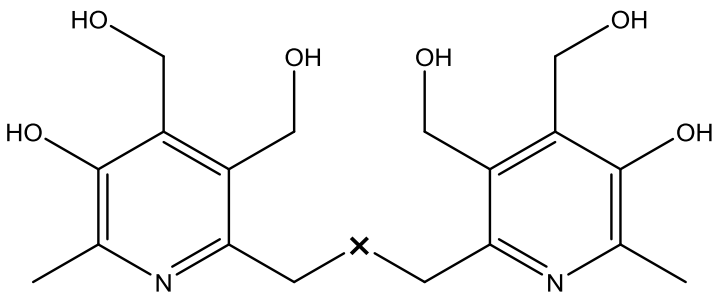
Класс химических соединений	Общее количество	Количество активных (по EC_{50})	% активных соединений
Бензимидазолы	16	1	6,25%
Бифенилоксиды	8	0	-
Бифенилы	2	0	-
Биспиридины	5	4	80%
Диазепинобензимидазолы	4	1	25%
Дигидробензофураны	2	1	50%

Окончание таблицы 4.4.

Класс химических соединений	Общее количество	Количество активных (по EC ₅₀)	% активных соединений
Имидазобензимидазолы	15	7	47%
Пептидомиметики	2	0	-
Пиридины	53	3	5,2%
Пиримидины	16	1	6,25%
Хиназолины	12	1	8%
Тиазолидиндионы	2	1	50%
Тиазолобензимидазолы	6	1	16,6%
Триазолопиримидины	11	2	18%
Итого	155	23	14,8%

По полученным данным направленного скрининга *in vitro* и значениям EC₅₀, активность изучаемых соединений, производных биспиридина, зависит от строения линкерного фрагмента следующим образом: S> S-S> S=O> SO₂. (NP-006>NP-001>NP-061>NP-063). Следует также отметить, что наименее активным оказалось соединение NP-007, в химической структуре которого присутствует солевой компонент (S-S+2HCl). Возможно, это связано с увеличением липофильности субстанции за счет уменьшения специфических гидрофобных взаимодействий. Таким образом, можно сделать вывод о том, что получение дигидрохлоридной соли активного вещества NP-001 резко снижает активность в отношении ГК. Химическое строение субстанций данного класса представлено в таблице 4.5.

Таблица 4.5 Химическое строение соединений - производных биспиридина

Тестируемые образцы	X	Солевой компонент	Брутто формула	Молекулярная масса
1	2	3	4	5
				
1	2	3	4	5
NP-006	S	-	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₆ S	396,458
NP-061	S=O	-	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₇ S	412,457
NP-063	SO ₂	-	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₈ S	428,456
NP-001	S-S	-	C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₆ S ₂	428,518
NP-007	S-S	2HCl	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₆ S ₂ ⁺²	430,533

4.4 Механизм молекулярного взаимодействия соединений NP-001 и NP-006 с активным аллостерическим сайтом глюкокиназы

Анализ молекулярного механизма связывания наиболее активных веществ NP-001, NP-006 и референса PF-04937319 с аллостерическим сайтом глюкокиназы был выполнен с помощью программы LigandScout 4.2 Advanced [Inte:ligand, 2018] и представлен на рис. 4.5

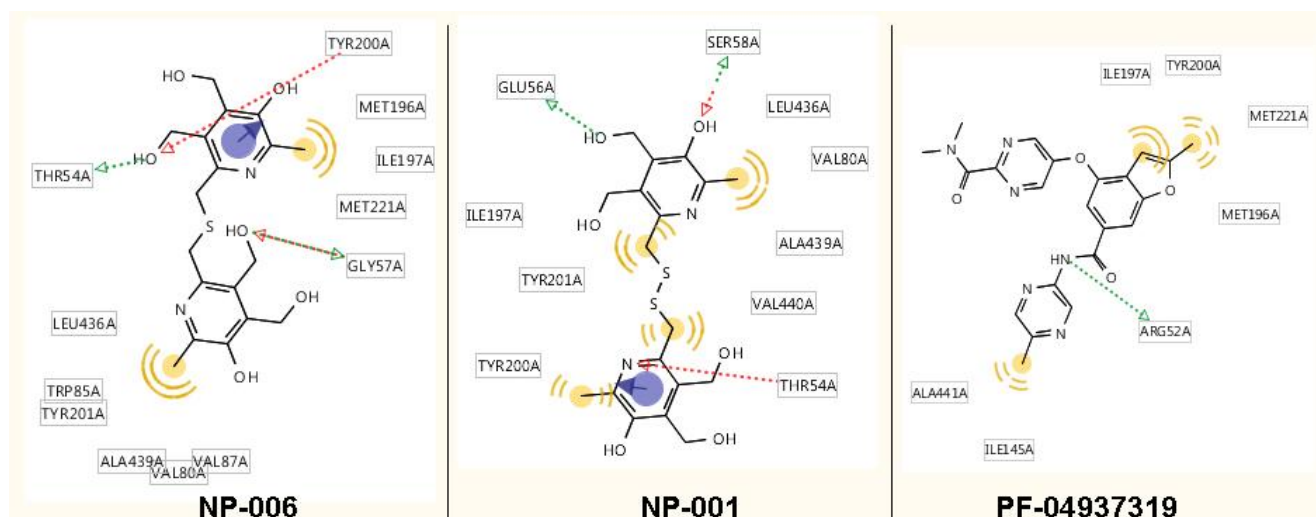


Рисунок 4.5 Характер связывания соединений NP-001, NP-006 и вещества сравнения PF-04937319 в сайте ГК

В молекуле NP-006 присутствует пиридиновый цикл, вступающий в стэкинг-взаимодействие с Tyr200; три группы образуют водородные связи с Thr54, Gly57,

Tyr200; два фрагмента участвуют в гидрофобных взаимодействиях с Tyr200, Met196, Ile197, Met221 и Leu436, Trp85, Tyr201, Ala439, Val80, Val87.

В молекуле NP-001 присутствует пиридиновый цикл, также вступающий в стэкинг-взаимодействие с Tyr200; три группы образуют водородные связи с Thr54, Glu56, Ser58; четыре фрагмента участвуют в неспецифических гидрофобных взаимодействиях с Thr54, Val80, Ile197, Tyr200, Tyr201, Leu436, Ala439, Val440.

В молекуле PF-04937139 нет стэкинга; только одна группа образует водородную связь с Arg52; два фрагмента участвуют в гидрофобных взаимодействиях с Ile197, Tyr200, Met221, Met196, Ile145, Ala441.

Сравнение связывающих центров показывает, что у референса отсутствует стэкинг и он образует только одну водородную связь и с иной аминокислотой, чем NP-001 и NP-006. Из шести аминокислот, участвующих в гидрофобных взаимодействиях, общими являются: Ile197 и Tyr200 для PF-04937139 и NP-001; Tyr200, Met221, Ile197, Met196 для PF-04937139 и NP-006.

Таким образом, соединения NP-001 и NP-006 более жестко фиксированы в сайте ГК и имеют иные типы связывания и с другими аминокислотами, чем PF-04937139. Вероятно, для проявления высокой глюкокиназной активности большое значение имеет конформационная адаптабельность молекулы активатора к особенностям аллостерического сайта этой киназы.

Пространственное расположение всех трех соединений в сайте ГК приведено на рис. 4.6

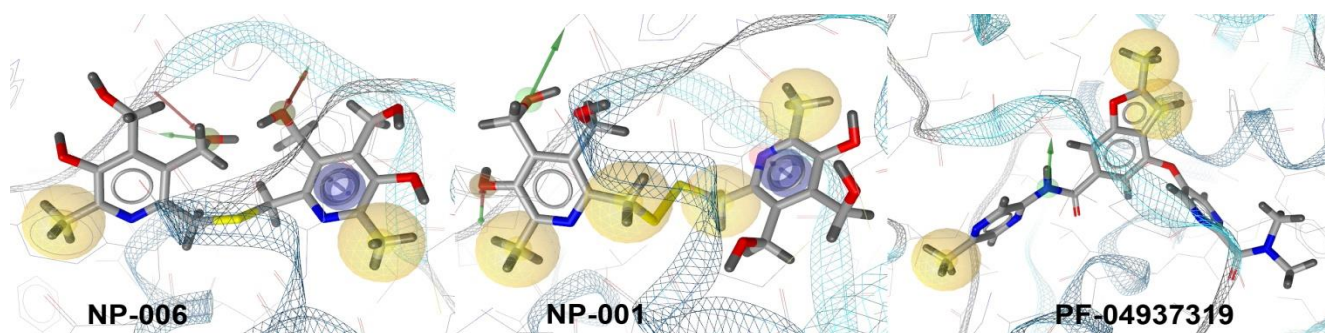


Рисунок 4.6 Расположение соединений NP-001, NP-006 и вещества сравнения PF-04937139 в сайте ГК

По данным рис. 4.6 видно, что положения молекул NP-001 и NP-006 весьма сходны между собой, но отличаются от пространственного положения молекулы PF-04937139. Следовательно, более высокая активность референсного соединения объясняется как иным характером его взаимодействия с сайтом ГК, так и иным его пространственным расположением в этом сайте.

С целью сравнительного анализа положений связывания молекулы NP-001 и NP-006 были совмещены в сайте ГК с молекулой вещества сравнения PF-04937139 (рис. 4.7).

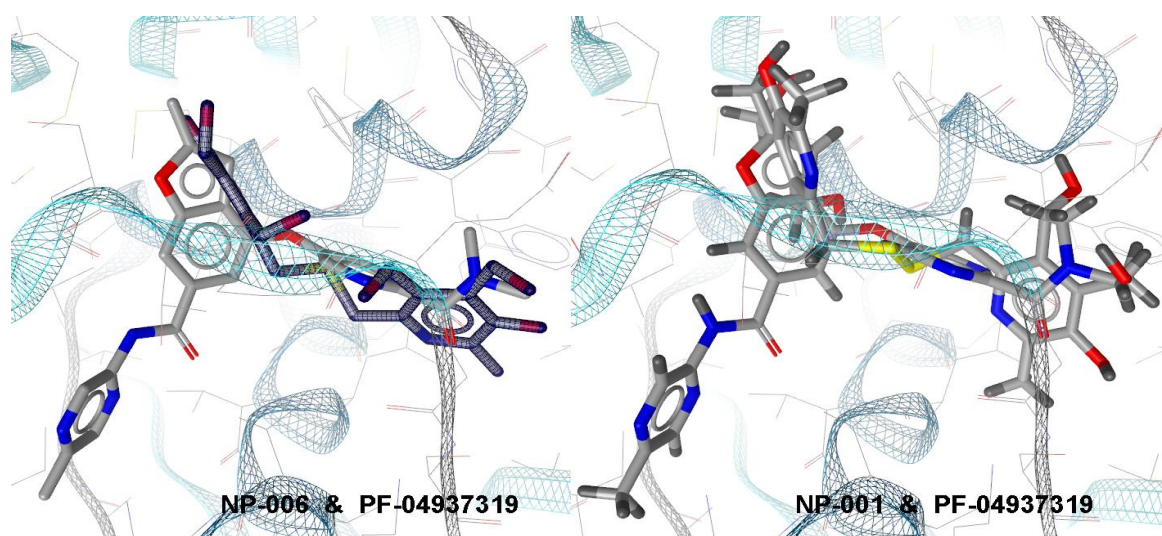


Рисунок 4.7 Сопоставление положений в сайте связывания ГК соединений NP-001, NP-006 и вещества сравнения PF-04937139

Молекулы NP-001 и NP-006 только частично совпадают с положением молекулы PF-04937139. Молекула NP-001 лучше совмещается с фрагментом молекулы PF-04937139, чем молекула NP-006. Однако, субстанция NP-006 имеет большее количество общих аминокислот, участвующих в гидрофобных взаимодействиях с препаратом сравнения, чем субстанция NP-006. С другой стороны, оба соединения NP-001 и NP-006 не имеют дополнительной точки гидрофобной фиксации, которая обеспечивается в молекуле PF-04937139 метильной группой в положении 5 пиразинового цикла.

Можно предположить, что присоединение к углероду между атомом серы и пиридиновым циклом полужесткой цепочки с ароматическим гидрофобным

заместителем способно существенно увеличить ГК-активирующие свойства соединений NP-001 и NP-006.

4.5 Заключение

По результатам кластеризации и экспериментальных данных *in vitro*, к высокоактивным классам химических соединений в отношении глюкокиназы относятся производные биспиридина и тиазолбензимидазола.

Построенная для создания системы направленного поиска активаторов глюкокиназы нейросеть с использованием 5 расчётных оценок имела высокую степень достоверности (по точному критерию Фишера $p < 5 \cdot 10^{-5}$). По данным чувствительности нейронов искусственной нейронной сети был выяснен вклад каждой из пяти оценок консенсусного прогноза, где показано, что все три стратегии ИТ «Микрокосм» характеризуются высокой степенью влияния на сигнал выходного нейрона. Поскольку изученные соединения разнообразны по химической структуре и, возможно, обладают разными механизмами связывания с сайтом ГК, влияние метода докинга для точной классификации изучаемых субстанций было наименьшим. Кроме того, по результатам чувствительности нейронов данной сети показано, что к высокоактивным соединениям относятся производные биспиридина.

Созданная нейросетевая модель в дальнейшем может быть использована в виртуальном скрининге и направленном конструировании новых активаторов ГК с высокой активностью.

Наиболее перспективным скаффолдом, обладающим ГК-активирующей способностью, является класс биспиридинов, где определено наибольшее количество активных соединений, эффективность которых зависит от строения линкерного фрагмента следующим образом: S> S-S> S=O> SO₂> S-S и 2HCl. Было также выяснено, что присутствие солевого компонента снижает количество гидрофобных взаимодействий с сайтом связывания ГК, и, соответственно, активность в отношении данного фермента.

В ходе анализа молекулярного механизма связывания наиболее активных

веществ NP-001 и NP-006 с аллостерическим сайтом глюкокиназы, было выяснено, что присоединение к углероду между атомом серы и пиридиновым циклом полужесткой цепочки с ароматическим гидрофобным заместителем способно существенно увеличить ГК-активирующие свойства вышеуказанных соединений.

ГЛАВА 5. АНТИГИПЕРГЛИКЕМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАИБОЛЕЕ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

5.1 Влияние на углеводный обмен наиболее активных соединений при однократном введении интактным животным

По результатам виртуального консенсусного прогноза и экспериментально скрининга *in vitro* из 160 новых химических соединений было выбрано 6 субстанций ($EC_{50} < 200$ мкМ) для дальнейших исследований *in vivo* на интактных животных, 2 из которых - производные биспиридина (NP-001, NP-006).

Активность изучаемых веществ определяли пероральным тестом толерантности к глюкозе (глюкозная нагрузка 2 г/кг) на интактных нелинейных крысах-самцах. В качестве препарата сравнения использовался вилдаглиптин (10 мг/кг).

Первоначально, соединения были исследованы при внутрибрюшинном введении, для исключения влияния возможной низкой всасываемости и разрушения субстанций в желудочно-кишечном тракте при прохождении первичной метаболической трансформации.

В условиях эксперимента опытные группы, которым вводились изучаемые соединения под шифрами «НС-0281» и «14102» в дозе 30 мг/кг и «LOSUK-0019», «KD-0069» в дозе 100 мг/кг, не показали достоверных различий в сравнении с контрольной группой по величине площади под кривой глюкоза-время (табл. 5.1). Стоит также отметить, что все вышеуказанные вещества обладали низкой растворимостью, что ограничивает их дальнейшее изучение в других дозах.

Таблица 5.1 Антигипергликемическая активность соединений при однократном введении интактным крысам в ПТТГ (глюкозная нагрузка 2 г/кг).

Соединение	Доза, мг/кг	$\Delta AUC,^1 \%$	
		Внутрибрюшинно	Внутрижелудочно
НС-0281	30	+29,33*	- ²
14102	30	+9,47	-
LOSUK-0019	100	+1,91	-
KD-0069	100	+4.81	-
NP-001	30	-2,46	-
NP-001	300	+17,4*	+6,9
NP-006	300	-21,5*	+6,6
NP-001	500	+8,9	-
NP-006	500	-30,7*	-
Вилдаглиптин	10	-37,1*	-16,7*

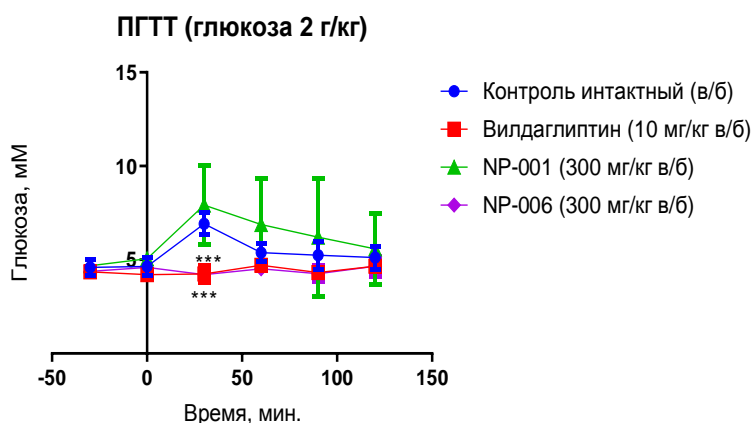
¹ Площадь под кривой глюкоза-время

² Исследование не проводилось

*Данные статистически значимы по отношению к интактному контролю (t-критерий Вилкоксона, $p < 0,05$).

В ходе проведения виртуального и экспериментального исследований было найдено два наиболее активных вещества в отношении глюкокиназы – производные биспиридина – соединения под шифром «NP-001» и «NP-006». Субстанция NP-001 исследовалась в дозах 30, 300 и 500 мг/кг при однократном введении в/б и не показало статистически значимых изменений по отношению к интактному контролю в пероральном тесте толерантности к глюкозе. В тоже время, наблюдалось статистически значимое улучшение толерантности к глюкозе у соединения NP-006 в дозах 300 и 500 мг/кг (рис. 5.1, рис. 5.2).

А



Б

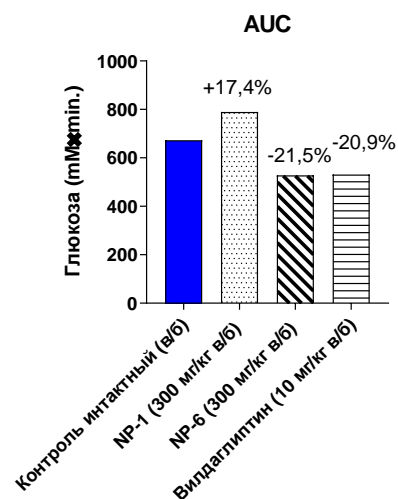
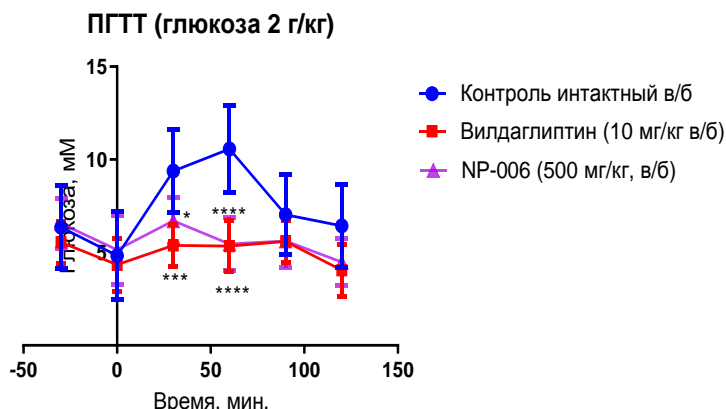


Рисунок 5.1 Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения вилдаглиптина (10 мг/кг в/б) на глюкозотолерантность в пероральном тесте толерантности к глюкозе (2 г/кг) на интактных животных (А). Площадь под кривой глюкоза-время (Б). Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета (** $p < 0,0003$).

Соединение NP-001 в дозе 300 мг/кг не проявило антигипергликемических свойств в пероральном тесте толерантности к глюкозе при однократном внутрибрюшинном введении интактным животным. Тогда как соединение NP-006 в дозе 300 мг/кг внутрибрюшинно статистически значимо улучшало толерантность к глюкозе по отношению к интактному контролю, превосходя действие препарата сравнения вилдаглиптина ($\Delta AUC = -21,5\%$ против $\Delta AUC = -20,9\%$), при этом не вызывая гипогликемии (рис. 5.1).

В дозе 500 мг/кг внутрибрюшинно субстанция NP-006 также статистически достоверно улучшало толерантность к глюкозе по отношению к интактному контролю, сопоставимой с таковой у препарата сравнения вилдаглиптина ($\Delta AUC = -30,7\%$ против $\Delta AUC = -37,1\%$), также не вызывая повышения уровня глюкозы после нагрузки в условиях нормогликемии (рис. 5.2).

А



Б

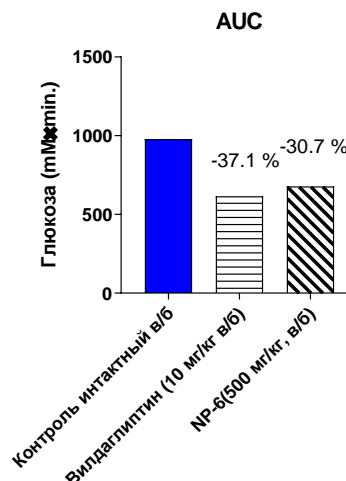


Рисунок 5.2 Влияние соединения NP-006 (500 мг/кг, в/б) и препарата сравнения вилдаглиптина (10 мг/кг в/б) на глюкозотолерантность в пероральном тесте толерантности к глюкозе (2 г/кг) на интактных животных (А). Площадь под кривой глюкоза-время (Б). Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета (* $p < 0,0304$; *** $p < 0,0009$; **** $p < 0,0001$).

Следующим этапом определения антигипергликемической активности соединений было решено исследовать субстанции NP-001 и NP-006 внутрижелудочным путем введения. Однако, при однократном в/ж введении интактным крысам изучаемых соединений NP-001 (Δ AUC=+6,9%) и NP-006 (Δ AUC=+6,6%) в дозе 300 мг/кг достоверно значимого улучшения толерантности к глюкозе по отношению к интактному контролю выявлено не было (табл. 5.1).

В результате, из 6 изученных субстанций, статистически значимое улучшение толерантности к глюкозе наблюдалось у соединения NP-006 в дозах 300 и 500 мг/кг.

5.2 Заключение

По данным исследования влияния наиболее активных соединений на углеводный обмен при однократном введении интактным животным, из 6 изученных субстанций, отобранных по результатам исследований *in silico* и *in vitro* установлено, что только вещество NP-006 проявило антигипергликемический эффект. При этом показано, что вышеуказанный эффект обнаружен при введении внутрибрюшинно, когда как при внутрижелудочном пути введения активности

выявлено не было. Также, для данного соединения наблюдалось статистически значимое улучшение толерантности к глюкозе в дозах 300 и 500 мг/кг (в/б) при однократном введении интактным животным, при этом, не наблюдалось развития гипогликемии. Вместе с тем вещество NP-001 не проявило значимого гипогликемического эффекта, однако, посчитали целесообразным провести дальнейшее изучение на экспериментальных моделях сахарного диабета.

ГЛАВА 6. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ NP-001 И NP-006 НА ПРОЦЕССЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ α - И β -КЛЕТОК ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА

Инсулин-продуцирующие β -клетки поджелудочной железы осуществляют контроль за содержанием уровня глюкозы в крови путем секреции инсулина. Недостаточная функциональная масса β -клеток является основной причиной СД 1-го типа, а также играет важную роль в развитии сахарного диабета 2-го типа при инсулинорезистентности [Butler A. E., 2003; Muoio D. M., 2008].

Известно, что помимо функционирования в качестве сенсора глюкозы для регуляции секреции инсулина в островках поджелудочной железы, глюкокиназа играет важную роль в пролиферации и апоптозе бета-клеток [Terauchi Y., 2007]. Недавние исследования на мышах показали значительную регенеративную способность инсулин-продуцирующих β -клеток, которую также можно достичь при терапии диабета у человека. Существуют данные о том, что глюкоза индуцирует репликацию β -клеток посредством метаболизма глюкокиназы, первой стадии гликолиза, с последующим закрытием каналов K_{ATP} и деполяризацией мембраны [Porat S., 2011]. Также известно, что активаторы глюкокиназы замедляют апоптоз, опосредованный стрессом эндоплазматической сети, путем нормализации Irs2-позитивной регуляции и Irs2-независимого контроля апоптоза β -клеток [Shirakawa J., 2013]. Таким образом, все вышесказанное может иметь важное терапевтическое значение при диабете 1 и 2 типа.

6.1 Исследование влияния соединения NP-001 и NP-006 на пролиферацию α - и β -клеток поджелудочной железы на модели экспериментального стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета I типа у мышей.

По результатам предыдущих этапов отбора *in silico*, *in vitro* и *in vivo* на интактных животных, для данного исследования были выбраны два соединения-лидера NP-001 и NP-006 в дозе 50 мг/кг в/б, которые относятся к классу биспиридина. Вышеуказанные соединения были изучены на модели экспериментального стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета 1 типа у нелинейных мышей-самцов при однократном введении. В качестве препарата сравнения использовалась субстанция PF-04937319 в дозе 50 мг/кг в/б, которая находится на II фазе клинических испытаний, и имеющая доказательную базу в отношении пролиферации β -клеток [Sharma R., 2014]. Далее проводили оценку количества панкреатических островков с подсчетом количества инсулин-позитивных и глюкагон-позитивных клеток. Оценивали удельное количество/площадь клеток в панкреатическом островке по отношению ко всем клеткам островка в %.

При введении стрептозотоцина в дозе 200 мг/кг внутривенно отмечалось статистически достоверное уменьшение инсулоцитов ($23,2 \pm 9,5\%$ против $83,7 \pm 5,9\%$) панкреатических островков по отношению к группе интактного контроля, при этом относительное количество глюкагон-позитивных клеток достоверно увеличивалось ($65,3 \pm 15,4\%$ против $11,4 \pm 6,7\%$). (рис. 6.1-6.2 (А, Б); табл. 6.1).

Исследуемое соединение NP-001 статистически незначимо увеличивало количество инсулин-позитивных клеток ($37,2 \pm 8,2\%$ против $23,2 \pm 9,5\%$) и незначительно снижало количество глюкагон-позитивных клеток ($56,0 \pm 20,2\%$ против $65,3 \pm 15,4\%$) по отношению к группе СД (рис. 6.1 (В); табл. 6.1).

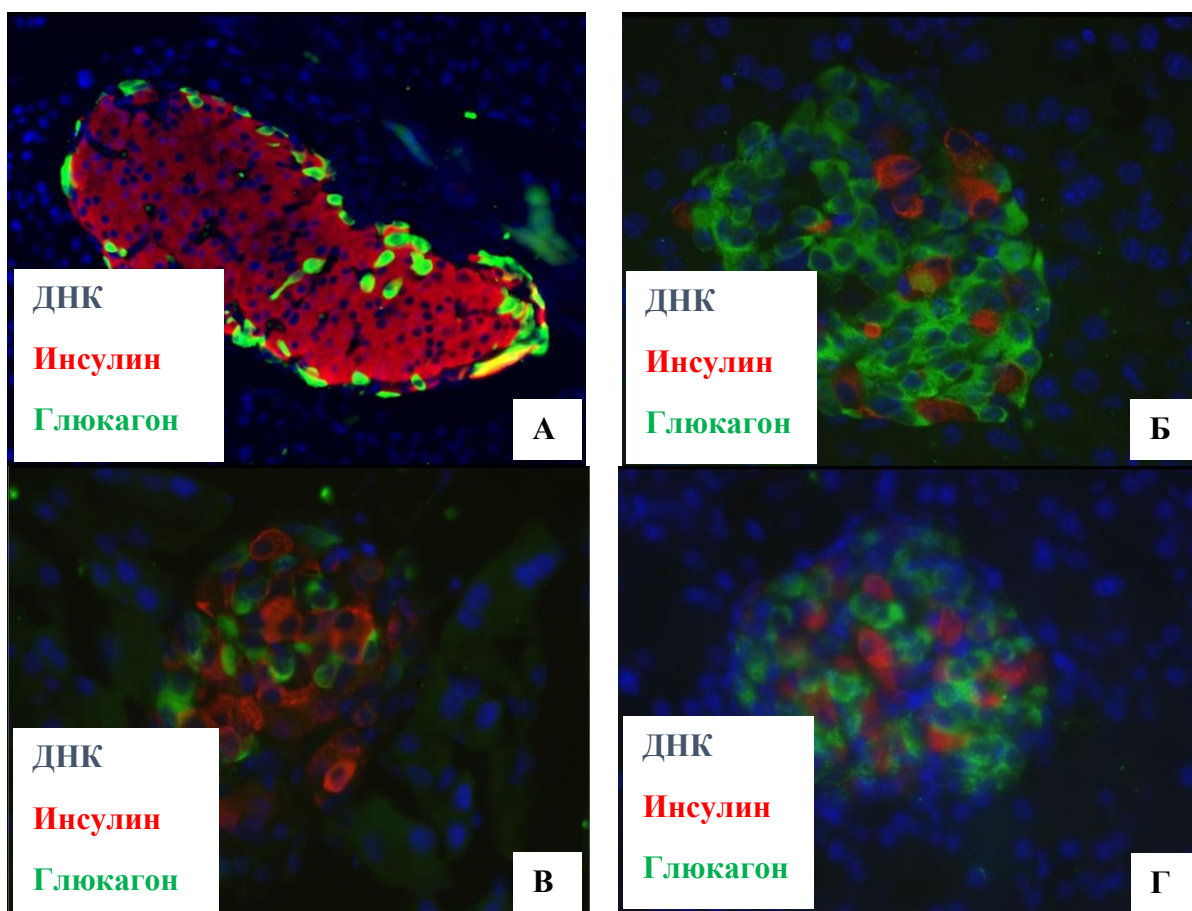


Рисунок 6.1 Морфологическая характеристика панкреатических островков: А – Интактный контроль, окуляр x10, объектив x20. Б - СТЗ-индуцированный диабет, окуляр x10, объектив x40. В –СТЗ-индуцированный диабет+PF-04937319. Г - СТЗ-индуцированный диабет+NP-001.Окуляр x10, объектив x40. Первичные АТ к инсулину, вторичные АТ+Alexa Fluor-647 (красный сигнал), первичные АТ к глюкагону, вторичные АТ+Alexa Fluor-488 (зеленый сигнал), ДНК (ядра) клеток – докраска DAPI (синий сигнал)

Таблица 6.1 Влияние соединений NP-001, NP-006 и PF-04937319 на удельное количество инсулин-позитивных и глюкагон-позитивных клеток поджелудочной железы ($M \pm m$).

Экспериментальные группы	Удельное количество инсулин-позитивных клеток, %	Удельное количество глюкагон-позитивных клеток, %
Интактный контроль	83,7±5,9	11,4±6,7
Стрептозотозин-индуцированный диабет.	23,2±9,5*	65,3±15,4*
Стрептозотозин-индуцированный диабет+PF-04937319	42,4±12,1**	15,7±2,1**
Стрептозотозин-индуцированный диабет+NP-001	37,2±8,2*	56,0±20,2*
Стрептозотозин-индуцированный диабет+NP-006	43,2±22,6**	36,7±10,7*

* - достоверно по отношению к интактному контролю (по критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$)

** - достоверно по отношению группы с СД (по критерию Манна-Уитни, $p < 0,05$)

Исследуемое соединение NP-006 проявило более высокую пролиферативную активность, чем вещество NP-001 в условиях стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета I типа у мышей, превышая таковую у препарата сравнения PF-04937319. Данная субстанция статистически значимо увеличивала количество инсулин-позитивных клеток по отношению к группе стрептозотоцин-индуцированного диабета ($43,2 \pm 22,6\%$ против $23,2 \pm 9,5\%$), при этом, восстанавливая пул глюкагон-позитивных клеток (рис. 6.1 (В); рис. 6.2 (Г); табл. 3).

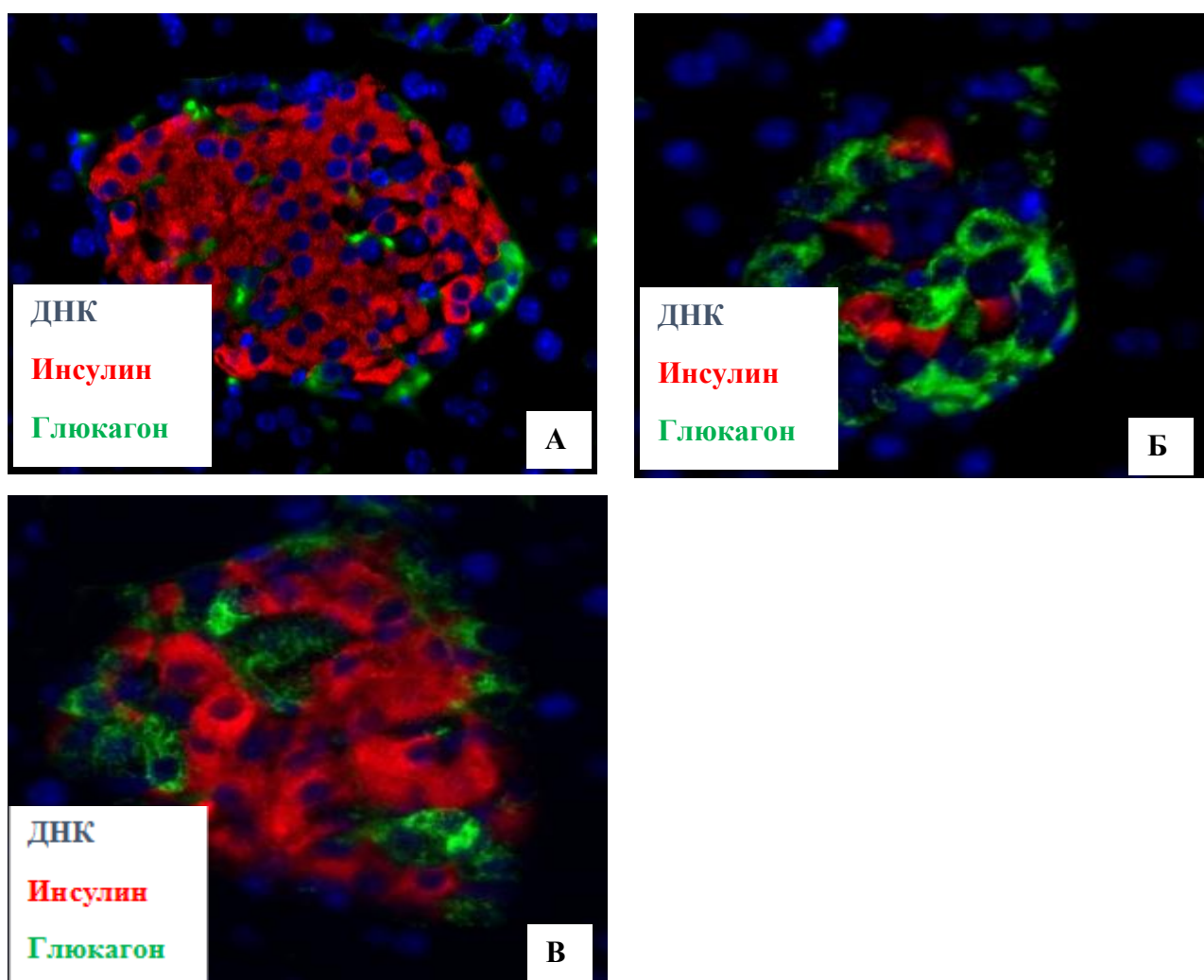


Рисунок 6.2 Панкреатические островки, иммунное окрашивание первичными антителами к инсулину (красный) и глюкагону (зеленый), докраска ядер DAPI (синий). Окуляр x10, объектив x20. **А.** Интактный контроль. Патологические изменения не обнаружены. **Б.** Позитивный контроль. Единичные инсулоциты, преобладание α -клеток. **В.** Экспериментальная группа на фоне введения активатора глюкокиназы NP-006. Частичное восстановление количества инсулоцитов.

6.2 Заключение

Установлено, что исследуемые соединения NP-001 и NP-006 увеличивали пролиферативную активность эндокриноцитов островков Лангерганса на модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета, что подтверждается морфологическими данными.

В панкреатических островках отмечается статистически достоверное увеличение инсулоцитов с восстановлением удельного количества глюкагон-позитивных клеток при введении соединения NP-006. Данное вещество незначимо превосходит по пролиферативной активности препарат сравнения – активатор глюкокиназы - PF-04937319, а также увеличивает количество инсулин-позитивных клеток в 1,86 раз по сравнению с группой животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом 1 типа.

ГЛАВА 7. МОДЕЛИРОВАНИЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТОЙ (ВЖД) НА МЫШАХ ЛИНИИ C57BL/6J

По данным ВОЗ, опубликованным в 2016 г., более 1,9 миллиарда взрослых старше 18 лет имели избыточный вес, из них свыше 650 миллионов страдали ожирением. В России по данным на конец 2016 г. зарегистрировано 23,5 млн лиц с ожирением [Дедов И.И., Шестакова Е. А., 2018]. Многие сведения о метаболических, гормональных и нейрональных факторах, участвующих в контроле энергетического гомеостаза, были получены от инбредных линий, трансгенных и нокаутных мышей. Тем не менее, большой процент ожирения человека и диабета 2 типа характеризуется полигенным типом наследования [Bouchard C., 1993]. В связи с этим, были разработаны модели ожирения и диабета, вызванных высокожировой диетой, для исследования данных заболеваний и проверки эффективности потенциальных терапевтических субстанций для предотвращения или реверсии ожирения, диабета, а также инсулинорезистентности [Reuter T. Y., 2007].

Золотым стандартом для модели СД 2 типа с ожирением, вызванной диетой с высоким содержанием жиров, являются мыши-самцы линии C57BL/6J. Ожирение у данных животных является следствием гипертрофии и гиперплазии адипоцитов. [Winzell M.S., 2004]. В дополнение к увеличению веса, типичные признаки, развивающиеся у мышей C57BL/6J на высокожировой диете, это постепенное ухудшение резистентности к инсулину, нарушение толерантности к глюкозе, быстрое развитие гипергликемии, дислипидемии, гипoadипонектинемии, гипертонии и резистентности к лептину [Surwit R.S., 1998]. Таким образом, для изучения антидиабетической активности новых соединений NP-001 и NP-006 на модели сахарного диабета 2 типа при хроническом введении были выбраны мыши вышеуказанной линии.

7.1 Влияние высокожировой диеты на уровень глюкозы и динамику веса мышей линии C57BL/6J при моделировании сахарного диабета 2 типа

Экспериментальную форму сахарного диабета 2 типа моделировали высокожировой диетой (ВЖД) на мышах-самцах линии C57BL/6J. Общий срок диеты составил 10 недель (70 дней). В конце 10-ой недели проводили интраперитонеальный тест толерантности к глюкозе (ИТТГ) для подтверждения развития сахарного диабета 2 типа. В исследовании антидиабетической активности включали животных с уровнем глюкозы натощак более 7 ммоль/л [Rossmesl M., 2003; Lu M., 2014]. Подробнее дизайн эксперимента и состав ВЖД представлены во 2 главе «Материалы и методы».

По окончании диеты, на 70 день моделирования были измерены уровни глюкозы натощак у интактного контроля и животных, находящихся на высокожировой диете, в результате чего обнаружено, что существует статистические различия данного показателя внутри 2 исследуемых групп ($7,02 \pm 0,4$ мМ группа мышей на ВЖД против $5,4 \pm 0,3$ мМ у интактных животных) ($p < 0,0001$). Вышеописанные данные отображены на рисунке 7.1.

Уровни глюкозы натощак мышей C57BL/6J

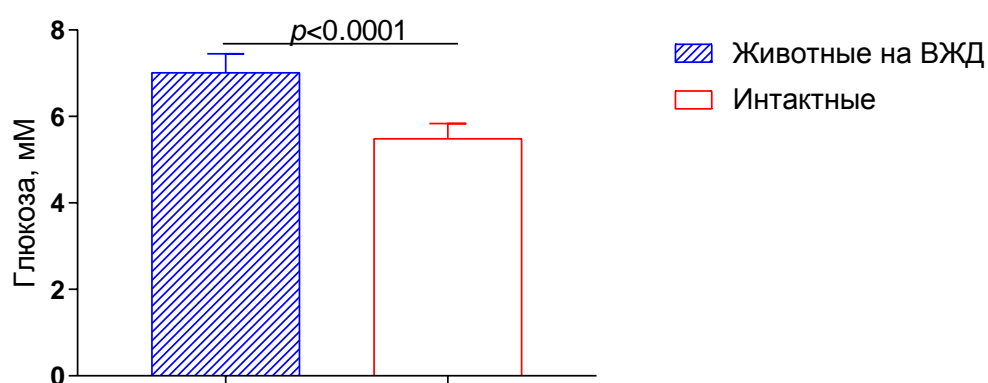


Рисунок 7.1 Уровень глюкозы натощак интактного контроля и животных на ВЖД у мышей линии C57BL/6J при моделировании сахарного диабета 2 типа высокожировой диетой (вжд) на 70-ый день эксперимента. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, непараметрический критерий Манна-Уитни ($p < 0,0001$).

В качестве подтверждения развившейся патологии был проведен интраперитонеальный тест толерантности к глюкозе (глюкозная нагрузка 1 г/кг). Данные рисунка 7.2 свидетельствуют о выраженном нарушении толерантности к глюкозе во всех временных отрезках (* $p < 0,0225$; **** $p < 0,0001$) в группе животных на ВЖД по отношению к интактному контролю (AUC=+35,08%).

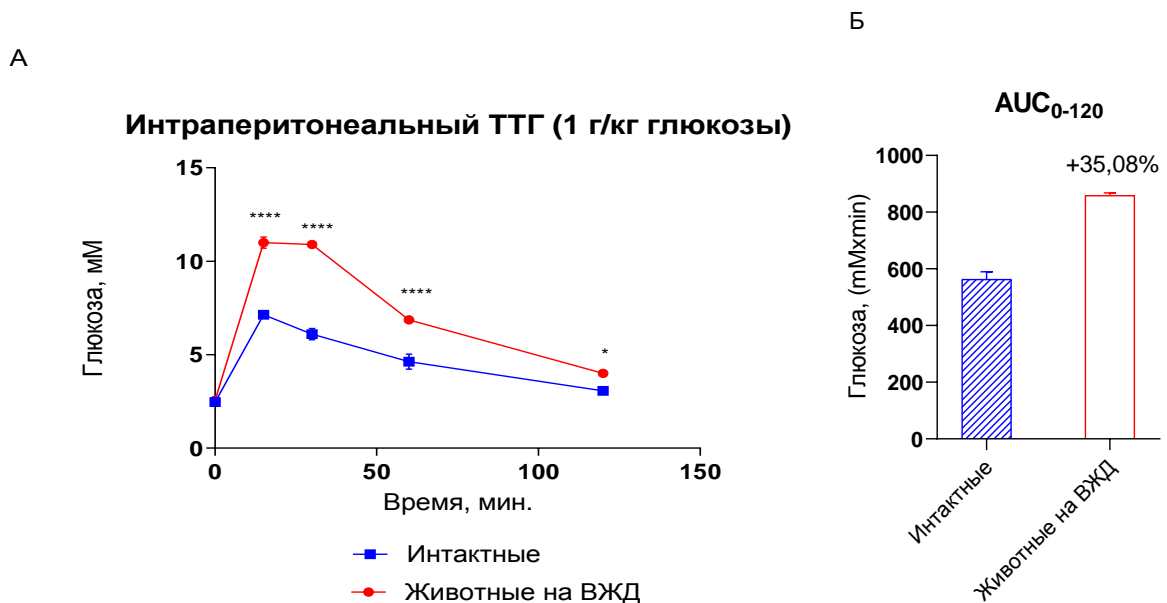


Рисунок 7.2 Изменение толерантности к глюкозе интактного контроля и животных на ВЖД в ходе ИТТГ (1 г/кг глюкозы) у мышей линии C57BL/6J при моделировании сахарного диабета 2 типа высокожировой диетой (вжд)(А). Площадь под кривой глюкоза-время (Б). Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета (* $p < 0,0225$; **** $p < 0,0001$).

В ходе исследования изменения концентрации инсулина в плазме крови было показано, что в группе животных, получавших диету с повышенным количеством жиров, регистрировалась выраженная гиперинсулинемия по сравнению с интактной группой ($14,4 \pm 1,6$ мкЕД/мл против $6,00 \pm 1,7$ мкЕД/мл) ($p < 0,0001$), а также статистически значимое увеличение инсулинорезистентности, которое отражает показатель НОМА-IR ($4,56 \pm 1,04$ усл. ед против $1,96 \pm 1,04$ усл. ед) ($p < 0,0001$). Вышеприведенные данные представлены на рисунке 7.3.

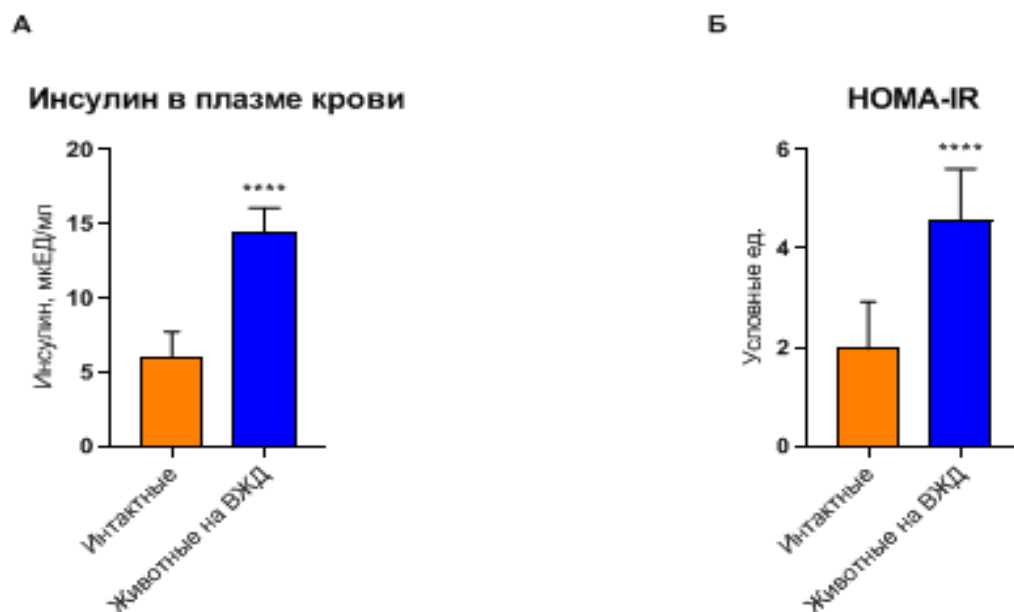


Рисунок 7.3 Уровень инсулина натощак интактного контроля и животных на ВЖД у мышей линии C57BL/6J при моделировании сахарного диабета 2 типа высокожировой диетой (вжд) **А** – Инсулин в плазме крови; **Б** – НОМА-IR. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, непараметрический критерий Манна-Уитни ($p < 0,0001$).

Поскольку известно, что мыши линии C57BL/6J подвержены ожирению при нахождении на высокожировой диете, следующим этап необходимо было оценить ее влияние на вес экспериментальных животных. На рисунке 7.4 представлены данные динамики данного параметра, которые демонстрируют значительное увеличение массы мышей на ВЖД по сравнению с контролем на 15, 30, 51 и 70 дни моделирования (* $p = 0,0379$; *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$; **** $p < 0,0001$), при этом статистических изменений в первый день измерений замечено не было (^{ns} $p = 0,5014$). При сопоставлении результатов среднего веса животных обеих групп на 70 день (последний день перед введением исследуемых веществ) было показано достоверное повышение вышеуказанного показателя у животных на ВЖД ($34,5 \pm 6,02$ г против $25,8 \pm 1,94$ г у интактных мышей).

Динамика веса животных на высокожировой диете

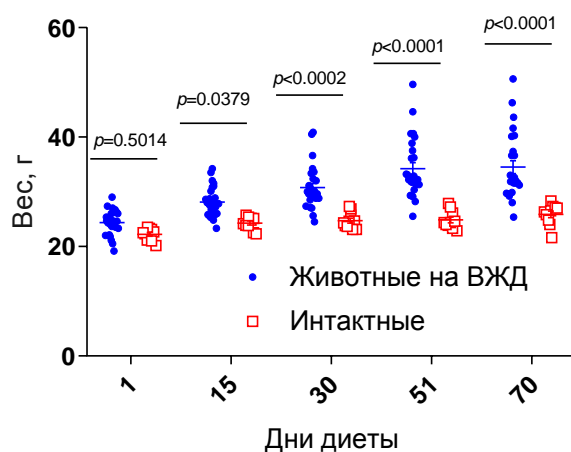


Рисунок 7.4 Влияние высокожировой диеты на динамику веса мышей линии C57BL/6J при моделировании сахарного диабета 2 типа. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Сидака.

7.2 Заключение

В ходе моделирования сахарного диабета 2 типа высокожировой диетой на мышцах линии C57BL/6J было показано статистически значимое увеличение уровня глюкозы натощак и достоверное повышение массы животных при получении корма с высоким содержанием жиров в течение 70 дней. Также, по результатам глюкозотолерантного теста отмечалось характерное для изучаемой патологии нарушение толерантности к глюкозе; кроме того, установлено увеличение инсулинорезистентности по показателю HOMA-IR и выраженная гиперинсулинемия у данной группы мышей.

Таким образом, по совокупности вышеописанных показателей, можно сделать вывод о развитии сахарного диабета 2 типа у мышей линии C57BL/6J, находящихся на высокожировой диете.

ГЛАВА 8. АНТИДИАБЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ NP-001 И NP-006 ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ВВЕДЕНИИ

8.1 Исследование антидиабетической активности соединений NP-001 и NP-006 при хроническом введении

В данном исследовании было выполнено моделирование сахарного диабета 2 типа на мышах линии C57BL/6J, которые в течение 70 дней находились на высокожировой диете (ВЖД), контрольная группа получала стандартный корм вивария. Срок хронического введения изучаемых веществ NP-001 и NP-006 (300 мг/кг) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг) составлял 21 день. Оптимальные эффективные дозы новых субстанций были определены эмпирически, влияние которых описано в главе 5 «Антигипергликемические свойства наиболее активных соединений»; для метформина выбрана дозировка с учетом данных литературы по результатам изучения на мышах линии C57BL/6J [Jang E. H., 2010]. В течение всего периода эксперимента измеряли уровень глюкозы в крови, а также вес животных. По окончании исследования производили забор крови пункцией сердца для дальнейшего определения биохимических показателей плазмы, а также проводили забор материала (висцеральный жир и печень) для морфометрического и биохимического анализа. Подробнее методика и дизайн вышеописанного эксперимента представлены в главе 2 «Материалы и методы».

8.1.1 Изучение влияния соединений NP-001 и NP-006 на уровень глюкозы крови и массу тела мышей DIO-C57bl/6J

Было показано, что соединение NP-006 в течение 21 суток предотвращает прогрессирование СД 2 типа на фоне высокожировой диеты, и снижает уровень глюкозы в плазме крови по сравнению как с исходными значениями ($5,49 \pm 0,3$ ммоль/л против $6,18 \pm 0,2$ ммоль/л), так и с интактным контролем

(дистиллированная вода, 10 мл/кг) ($5,49 \pm 0,3$ ммоль/л против $6,09 \pm 0,3$ ммоль/л) ($p < 0,01$) (рис 8.1).

В то же время вещество NP-001 не оказывало достоверного влияния на базальный уровень глюкозы в плазме крови в течение всего периода терапии, начиная с первого дня введения, по сравнению с исходными данными, однако, статистически незначимо снижало соответствующий показатель при сопоставлении с группой СД на 21-й день (рис. 8.1-8.2).

Стоит отметить, что выраженность гипогликемического эффекта соединения NP-006 статистически незначимо превосходит аналогичный эффект метформина как на 21-й день введения, так и в динамике всего срока введения (рис. 8.1-8.2).

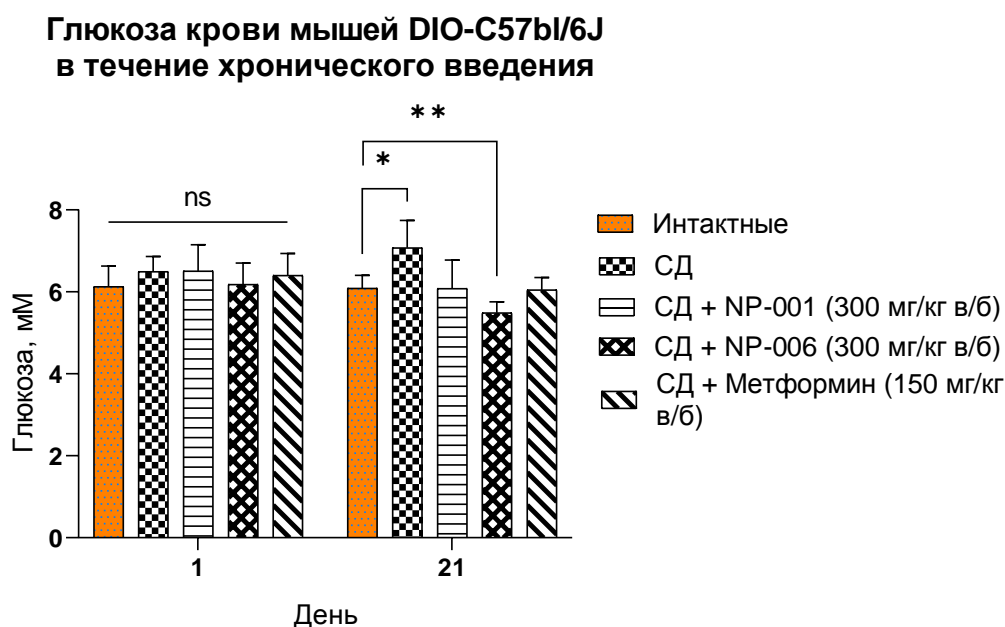


Рисунок 8.1 Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на уровень глюкозы крови мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к группе СД, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Динамика глюкозы крови мышей при хроническом введении

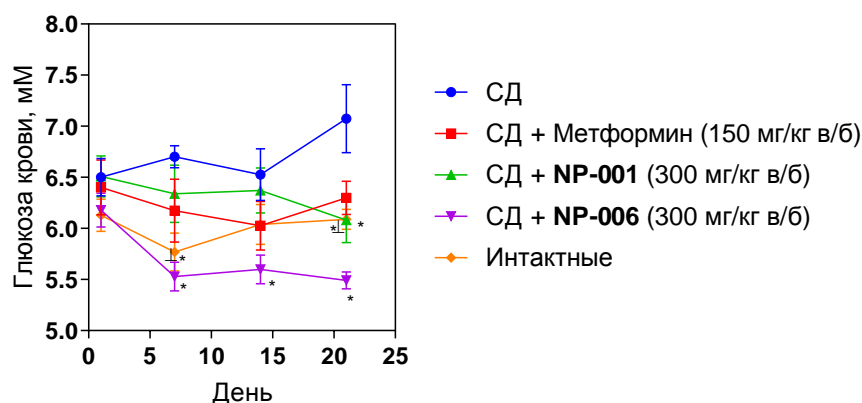


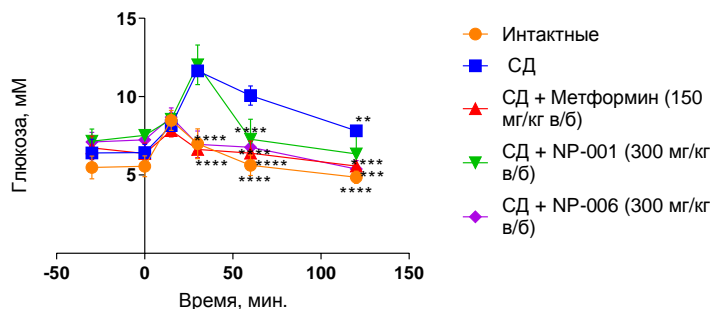
Рисунок 8.2 Динамика глюкозы крови мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, под влиянием соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) в течение хронического введения. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к группе СД, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$); группа интактного контроля по отношению к группе СД, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($\dagger p < 0,05$).

По данным рисунка 8.2 также можно заключить, что динамика изменения уровня глюкозы крови при хроническом введении соединения NP-006 мышам DIO-C57bl/6J статистически значимо улучшается на каждом отрезке времени (1, 7, 14 и 21 день) по отношению к группе СД.

Результаты глюкозотолерантного теста, проведенного на 21-й день эксперимента, свидетельствуют о том, что субстанция NP-006 проявила значимый антигипергликемический эффект на временных промежутках 30, 90 и 120 мин в сравнении с группой СД, не вызывая гипогликемии и восстанавливая уровень глюкозы до исходных значений. Также, данное соединение улучшает толерантность к глюкозе, сопоставимую с таковой у препарата сравнения метформина (площадь под кривой глюкоза-время: -27,9% против -31,3%). Вещество NP-001 вызывало временную гипергликемию на 30 минуте, затем снижение уровня глюкозы до первоначальных значений, при этом, недостоверно улучшая толерантность в сравнении с группой СД, но не превосходя аналогичный эффект у референса (площадь под кривой глюкоза-время: -4,4% против -31,3%).

А

Интраперитонеальный ТТГ (1 г/кг глюкозы)



Б

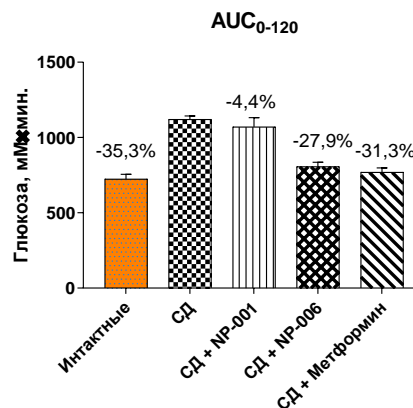


Рисунок 8.3 Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на глюкозотолерантность мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, в интраперитонеальном тесте толерантности к глюкозе (1 г/кг) при хроническом введении (А). Площадь под кривой глюкоза-время (Б). Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к группе СД, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$);

При сопоставлении значений массы тела мышей DIO-C57bl/6J группы NP-006 с группой СД на 21 день при хроническом введении можно заметить, что данное соединение статистически значимо снижало вышеуказанный показатель ($28,9 \pm 1,8$ г против $33,4 \pm 4,3$ г) ($p < 0,05$), соединение же NP-001 недостоверно уменьшало массу тела животных. Следует также отметить, что препарат сравнения не оказал какого-либо достоверного влияния на данный показатель (рис 8.4).

Масса тела мышей DIO-C57bl/6J в течение хронического введения

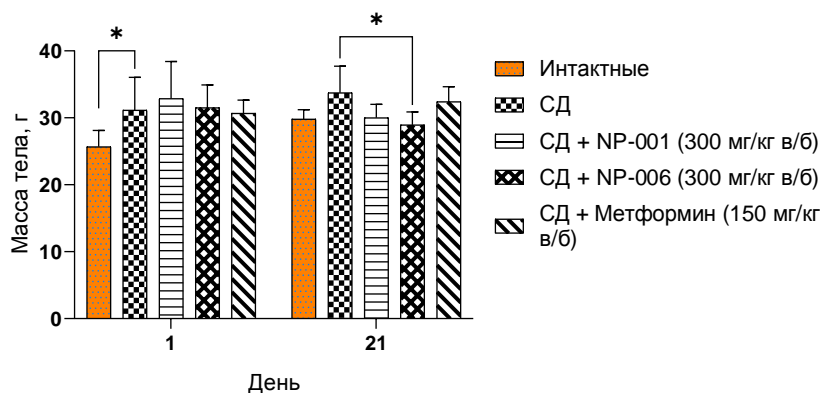


Рисунок 8.4 Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на массу тела мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к группе СД, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета (* $p < 0,05$);

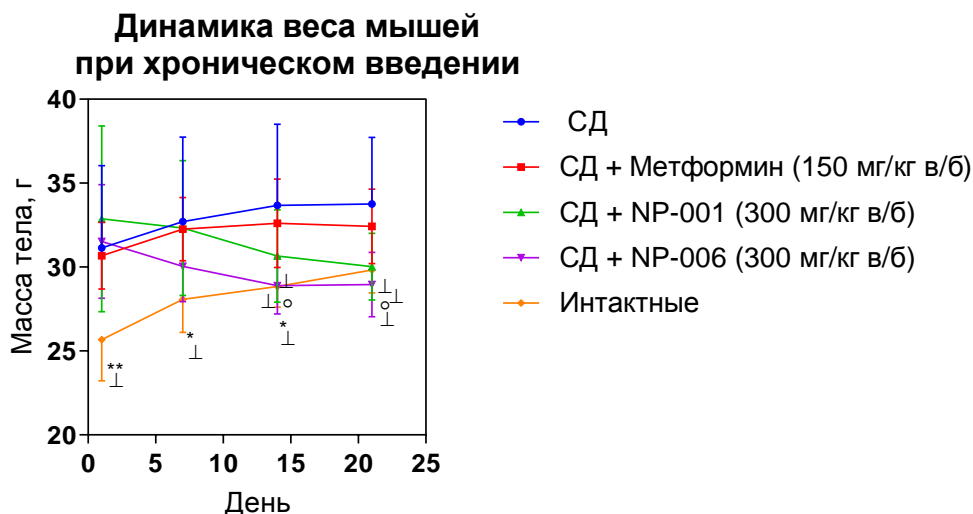


Рисунок 8.5 Динамика веса мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, под влиянием соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) в течение хронического введения. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к группе СД, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$); группа NP-6 по отношению к группе СД, критерий two-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($^{\circ}p < 0,05$); группа интактного контроля по отношению к группе СД, критерий 2-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($^{\dagger}p < 0,05$).

Вес мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, к концу исследования достоверно снизился в группе животных, получавших вещество NP-006, в сравнении с группой СД, а также значительно, но недостоверно, наблюдался тот же эффект в группе субстанции NP-001. Динамика вышеописанных изменений представлена на рисунке 8.5.

Таким образом, по результатам изучения влияния соединений NP-001 и NP-006 на уровень глюкозы крови и массу тела мышей DIO-C57bl/6J при хроническом введении можно сделать вывод о том, что наиболее выраженный антигипергликемический эффект, сопоставимый с таковым у препарата сравнения метформина, а также значимое снижение массы тела животных, превосходя данный показатель у референса, оказало соединение NP-006.

8.1.2 Влияние исследуемых субстанций на уровень инсулина плазмы крови

Вещество NP-006, а также рефернс проявили выраженное снижение уровня инсулина в плазме крови по сравнению с группой животных с сахарным диабетом, где наблюдалась гиперинсулинемия ($5,57 \pm 2,6$ мкЕд/мл и $5,00 \pm 2,7$ мкЕд/мл соответственно, против $16,3 \pm 2,38$ мкЕд/мл) ($p < 0,05$; $p < 0,01$); для субстанции NP-

001 было выявлено статистически незначимое снижение аналогичного параметра ($6,84 \pm 2,5$ мкЕд/мл против $16,3 \pm 2,38$ мкЕд/мл) (рис. 8.6, А). По базальному уровню глюкозы и концентрации инсулина рассчитали показатель инсулинорезистентности (НОМА-IR), который был снижен для всех опытных групп, в то же время, наиболее достоверное значение было найдено для вещества NP-006 ($1,36 \pm 0,64$ усл. ед против $4,93 \pm 1,9$ усл. ед в группе СД) (рис. 8.6, Б). Все вышеописанное отражает значительное улучшение чувствительности к инсулину и играет первостепенную роль при лечении СД 2 типа.

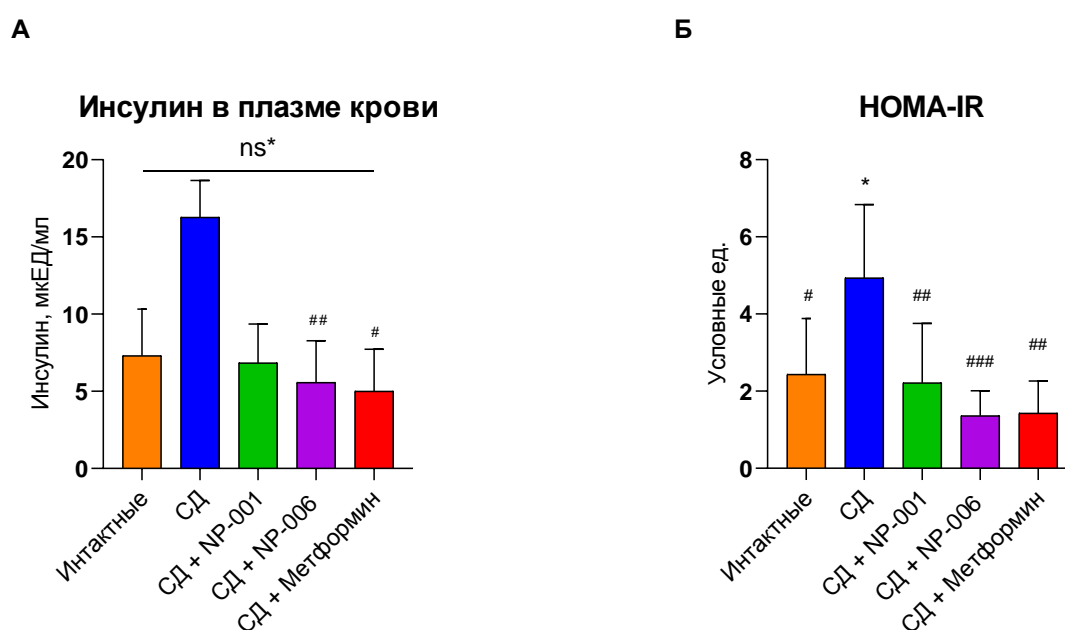


Рисунок 8.6 Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на биохимические показатели плазмы крови мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. **А** – Инсулин в плазме крови; **Б** – НОМА-IR. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$); по отношению к группе СД, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$); ns* по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$).

8.1.3 Влияние соединений NP-001 и NP-006 на висцеральные жировые отложения мышей DIO-C57bl/6J

Введение изучаемого вещества NP-006, а также метформина не привело к статистически значимому изменению массы печени, когда как для субстанции NP-001 было показано достоверное увеличение данной характеристики по сравнению с группой СД (рис 8.7, А), что может быть следствием возможного токсического

влияния (подробнее в главе 9 «Токсические и фармакокинетические свойства соединений NP-001 и NP-006») или увеличения скорости метаболических процессов, в которых участвует вышеуказанное соединение, поскольку его мишенью, в том числе, является печень.

Поскольку общая масса животных на фоне введения препарата сравнения метформина не изменилась, неудивительно и отсутствие достоверных изменений удельной массы висцерального жира во всех областях по сравнению с группой животных с сахарным диабетом (рис 8.7 Б, В, Г).

При рассмотрении вклада отдельных депо в общую массу жировой ткани было обнаружено, что в группе животных, которым вводили новое соединение NP-001, масса эпидидимальной жировой ткани не изменялась, а масса ретроперитонеальной и мезентериальной жировой ткани достоверно снизилась в 1,3 и 1,1 раза соответственно ($p < 0,01$) по отношению к интактному контролю (рис 8.7 Б, В, Г).

В группе, получавшей вещество NP-006, наблюдали незначимое снижение общей массы жировой ткани, преимущественно за счет снижения массы ретроперитонеального и мезентериального жира в 1,6 и 1,5 раз соответственно ($p < 0,001$) в сравнении с группой СД и интактным контролем, а в случае с эпидидимальным жиром, наблюдалась только тенденция к уменьшению количества жировой ткани (рис 8.7 Б, В, Г).

На основании вышеописанного можно сделать вывод о том, что данные измерения массы тела мышей и отслеживания соответствующей динамики при хроническом 21-дневном введении, коррелируют с морфометрическими показателями, полученными в ходе анализа висцеральных жировых отложений.

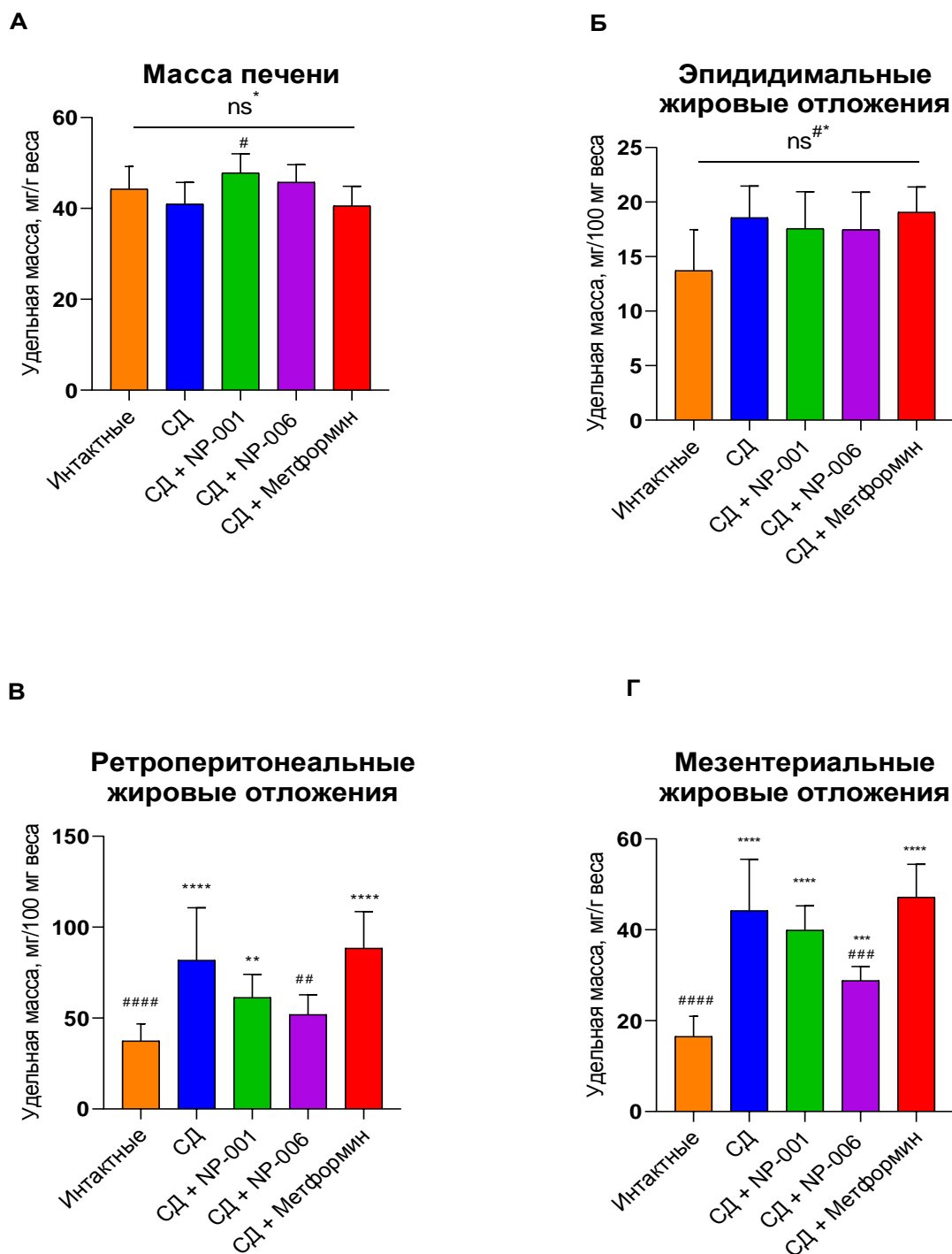


Рисунок 8.7 Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на морфометрические показатели мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. **А** – Масса печени; **Б** – Масса эпидидимальных жировых отложений; **В** – Масса ретроперитонеальных жировых отложений; **Г** – Масса мезентериальных жировых отложений. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$); по отношению к группе СД, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ([#] $p < 0,05$; ^{##} $p < 0,01$; ^{###} $p < 0,001$; ^{####} $p < 0,0001$); ns* по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$); ns[#] по отношению к группе СД, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$).

8.1.4 Влияние соединений NP-001 и NP-006 на воспалительную реакцию при моделировании экспериментального сахарного диабета на мышцах DIO-C57bl/6J

На основании литературных данных известно, что при сахарном диабете 2 типа отмечается системно-воспалительная реакция, которая выражается в повышении ряда цитокинов в крови, таких как С-реактивный белок (СРБ), фактор некроза опухоли (ФНО) - воспалительный маркер, тесно связанный с диабетом, и адипонектин, вырабатываемый жировой тканью, что вызывает нарушение чувствительности к инсулину [Calle M. C., 2012]. Кроме того, показано, что увеличение общего количества лейкоцитов связано с инсулинорезистентностью и СД 2 типа [Ohshita et al., 2004], а также с его микро- и макрососудистыми осложнениями [Tong et al., 2004]. Исследования на мышцах с соответствующей патологией свидетельствуют о том, что диабет сопровождался умеренным нейтрофильным лейкоцитозом и увеличенным временем циркуляции нейтрофилов и моноцитов, а также сокращенным временем циркуляции лимфоцитов, что увеличивает восприимчивость к инфекции и развитию воспаления [Kozlov I.A., 1995].

В качестве оценки проведенной терапии новыми субстанциями NP-001 и NP-006, а также подтверждения протекания воспалительного процесса сахарного диабета 2 типа, было выполнено определение лейкоцитарной формулы, а именно процентного соотношения основных видов лейкоцитов и содержание циркулирующих иммунных комплексов в плазме крови.

Для всех исследуемых групп (NP-001, NP-006 и метформин) было показано достоверное по отношению к группе СД уменьшение доли сегментоядерных нейтрофилов ($27,8 \pm 6,3\%$, $29,3 \pm 4,7\%$ и $26,3 \pm 3,5\%$ против $51,8 \pm 5,8\%$) ($p < 0,0001$). (рис. 8.8, А). При подсчете процентного содержания палочкоядерных нейтрофилов было замечено их увеличение в группе животных с сахарным диабетом ($4,25 \pm 1,25\%$), когда как лечение новыми веществами и препаратом сравнения характеризовалось снижением данного показателя в 1,4, 1,5 и 1,8 раз соответственно (рис. 8.8, Б). Таким образом, повышение нейтрофилов обоих видов

у животных с сахарным диабетом 2 типа свидетельствует о протекании воспалительного процесса, что характерно для соответствующей патологии и подтверждает ее развитие на мышах DIO-C57bl/6J.

При СД также повышено количество эозинофилов, что можно заметить на рисунке 8.7 В, где их содержание соответствовало $2,5 \pm 0,5\%$ от общего количества лейкоцитов. Процентная доля эозинофилов снижается под влиянием соединения NP-001 и рефернса метформина, достигая уровня нормы у самцов мышей линии C57bl/6J [Spinelli M. O., 2014]. При этом субстанция NP-006 не оказывает какого-либо эффекта на данный показатель (рис. 8.8, В).

Из анализа результатов, полученных по подсчетам доли лимфоцитов в крови мышей следует, что терапия исследуемыми веществами NP-001, NP-006 и метформином характеризовалась статистически значимым восстановлением уровня лимфоцитов до нормальных значений в сравнении с группой СД ($64,3 \pm 3,8\%$, $61,4 \pm 5,8\%$ и $67,33 \pm 2,5\%$ соответственно, против $38,25 \pm 3,8\%$) ($p < 0,0001$) (рис. 8.8, Г). Пониженные значения данного показателя для животных с патологией свидетельствует о том, что нарушены звенья иммунной системы из-за вероятного воспалительного процесса. Вышесказанное также подтверждается значениями, полученными при изучении циркулирующих иммунных комплексов (рис. 8.9).

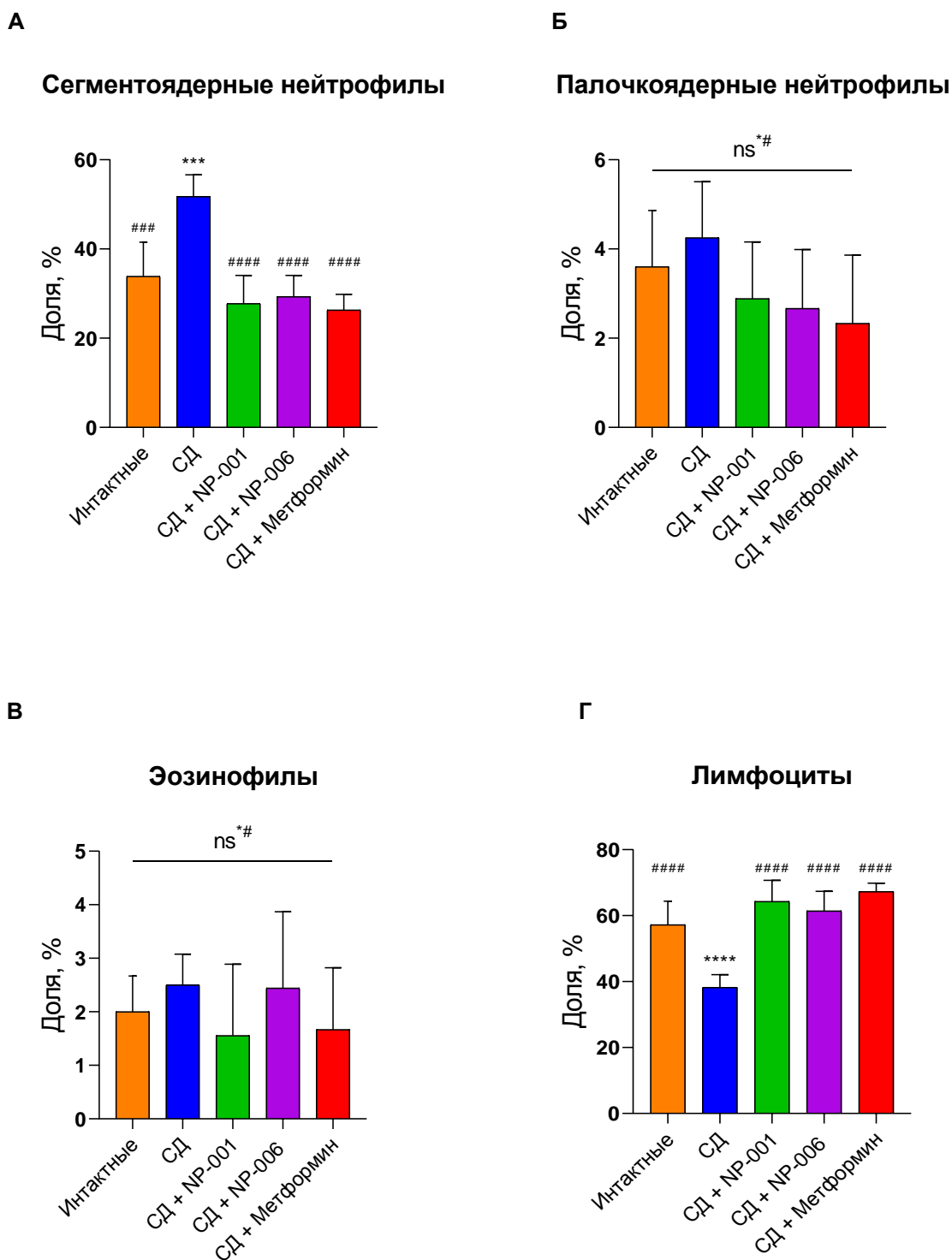


Рисунок 8.8 Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на показатели лейкоцитарной формулы мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. **А** – Доля сегментоядерных нейтрофилов; **Б** – Доля палочкоядерных нейтрофилов; **В** – Доля эозинофилов; **Г** – Доля лимфоцитов. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($^{***}p < 0,001$; $^{****}p < 0,0001$); по отношению к группе СД, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($^{###}p < 0,001$; $^{####}p < 0,0001$); ns*# по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$); ns# по отношению к группе СД, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$).

Так как были получены данные о нарушении иммунной системы и наличие воспалительного процесса при снижении количества лимфоцитов в группе СД, было выполнено дополнительное исследование по определению циркулирующих иммунных комплексов в плазме крови, где показано избыточное их количество, которое, возможно, связано с повышением концентрации С-реактивного белка. Для группы с сахарным диабетом показано характерное повышение ЦИК ($17,8 \pm 1,5$ усл. ед). При этом для групп животных, которым вводились исследуемые соединения NP-001 и NP-006, а также метформин, выявлено восстановление соответствующего параметра ($7,82 \pm 3,2$ усл. ед, $7,56 \pm 4,01$ усл. ед и $8,3 \pm 1,9$ усл. ед соответственно) до значений интактного контроля ($8,52 \pm 3,7$ усл. ед) ($p < 0,001$) (рис. 8.9).

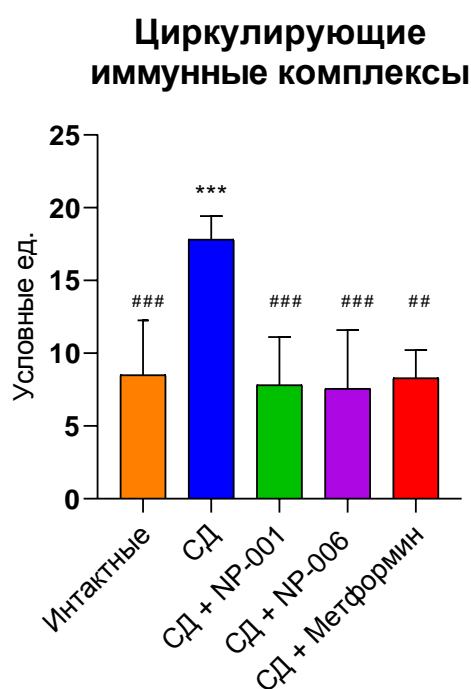


Рисунок 8.9 Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на образование циркулирующих иммунных комплексов плазмы крови мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($***p < 0,001$); по отношению к группе СД, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($##p < 0,01$; $###p < 0,001$).

Таким образом, выявленные данные лейкоцитарной формулы и содержания ЦИК в полной мере отражают развитие воспалительного процесса и нарушение иммунной системы при моделировании сахарного диабета 2 типа на мышах линии C57bl/6J. Установлено, что изучаемые соединения NP-001 и NP-006 достоверно восстанавливают количество сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, а

также статистически незначимо снижают уровни палочкоядерных нейтрофилов и эозинофилов, что отражает положительное терапевтическое влияние данных веществ при системном воспалении СД 2 типа.

8.1.5 Влияние соединений NP-001 и NP-006 на содержание холестерина, триглицеридов и ЛПНП плазмы крови мышей DIO-C57bl/6J

Повышенное содержание липидов плазмы крови характерно для сахарного диабета 2 типа [Hundal R. S., 2000], что коррелирует с полученными данными концентрации холестерина, ТГ и ЛПНП ($4,3 \pm 0,6$ мМ, $0,7 \pm 0,2$ мМ и $0,8 \pm 0,3$ мМ соответственно). В ходе определения липидного профиля мышей DIO-C57bl/6J под влиянием соединений NP-001 и NP-006 было выяснено, что изучаемые субстанции и метформин не влияют на уровни холестерина и ЛПНП, а также статистически незначимо снижают уровень триглицеридов в плазме крови (рис. 8.10).

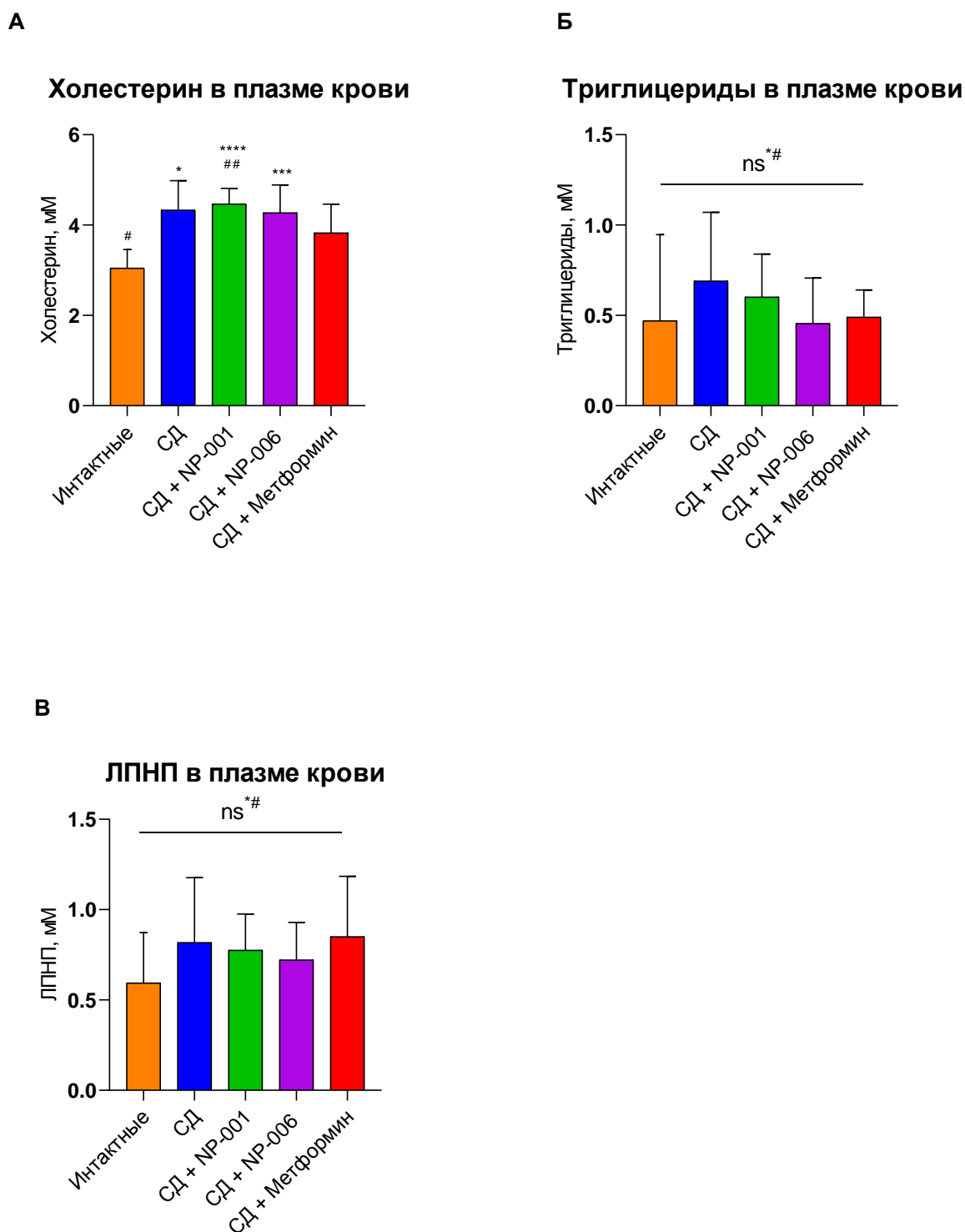


Рисунок 8.10 Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на липидный профиль плазмы крови мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. **А** – Холестерин в плазме крови; **Б** – Триглицериды в плазме крови; **В** – ЛПНП в плазме крови. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$); по отношению к группе СД, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$); ns* по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$); ns# по отношению к группе СД, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$).

8.1.6 Влияние соединения NP-001 и NP-006 на биохимические показатели печени мышей DIO-C57bl/6J

Поскольку одной из мишеней для активаторов глюкокиназы является печень, а так как для новых изучаемых субстанций предполагаемым механизмом действия подразумевается активирование ГК, было проведено значительное количество исследований на гомогенате печени экспериментальных групп. Подробнее все методики описаны в главе 2 «Материалы и методы».

Статистически незначимое по отношению к группе СД увеличение триглицеридов в плазме крови в группе животных, получавших вещества NP-001 и NP-006, коррелирует с литературными данными изученных активаторов глюкокиназы [Leighton B., 2005], при этом нет подтверждения развития стеатоза печени в клинических испытаниях (рис 8.11, А). Также, существует достоверная информация об увеличении уровня гликогена печени потенциальными субстанциями этой группы препаратов [Leighton B., 2005], что так же видно на рисунке 8.11, Б. Исследуемое соединение NP-006 недостоверно увеличивает данный параметр, в то время как соединение NP-001 и препарат сравнения метформин так же незначимо, но снижают концентрацию гликогена в печени.

Скорости гликолиза и гликогенолиза были исследованы по образованию конечного продукта - лактата с различными субстратами для изучения активности промежуточных ферментов. Ранее было выявлено повышенное количество гликогена в группе субстанции NP-006, и, как следствие, обнаружена его скорейшая утилизация в виде статистически значимой по отношению к группе СД увеличенной скорости гликогенолиза. Соединение NP-001 не оказывало какого-либо значимого влияния на вышеуказанный показатель (рис 8.11, Г). При регистрации скорости гликолиза с применением субстратов глюкозо-6-фосфат, глюкозо-1-фосфат и фруктозо-1,6-дифосфат было показано отсутствие существенного статистически значимого влияния на образование конечного продукта в сравнении с контрольной группой сахарного диабета всех трех опытных групп, что отражает неактивность промежуточных ферментов данного

метаболического пути и определяет первостепенное значение действия глюкокиназы (рис 8.11 Д, Е, Ж).

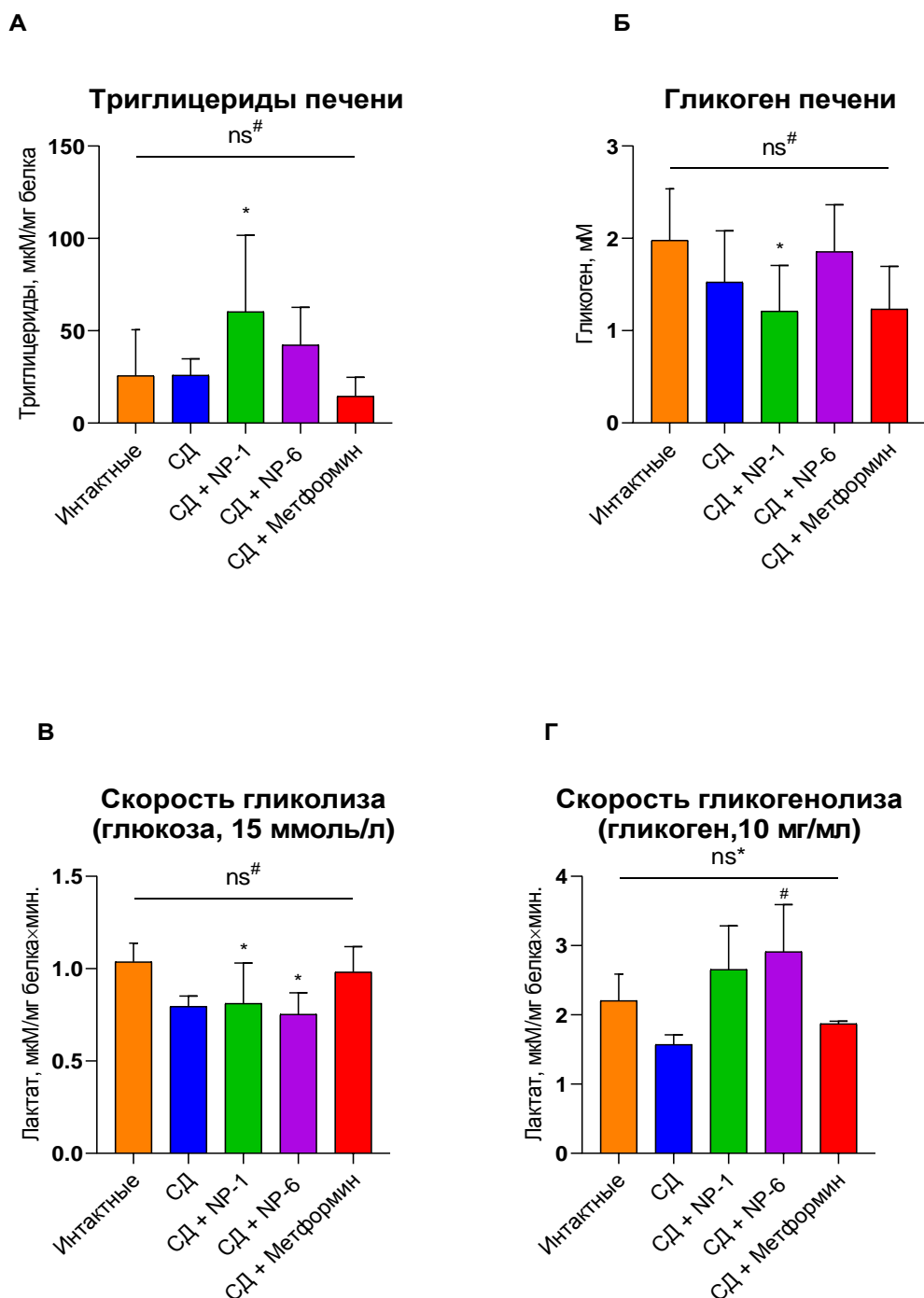
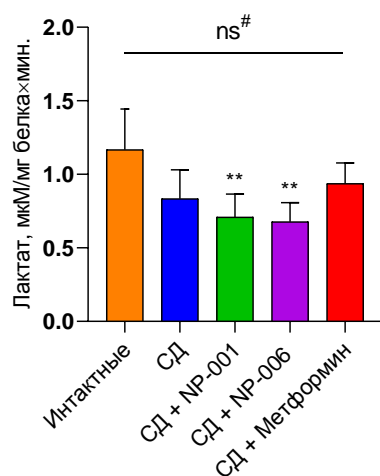


Рисунок 8.11 Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на биохимические показатели печени мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. **А** – Триглицериды печени; **Б** – Гликоген печени; **В** – Скорость гликолиза (субстрат: глюкоза, 15 ммоль/л); **Г** – Скорость гликогенолиза (гликоген, 10 мг/кг). Среднее ± SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p < 0,05$); по отношению к группе СД, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($^{\#}p < 0,05$); ns* по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$); ns# по отношению к группе СД, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$).

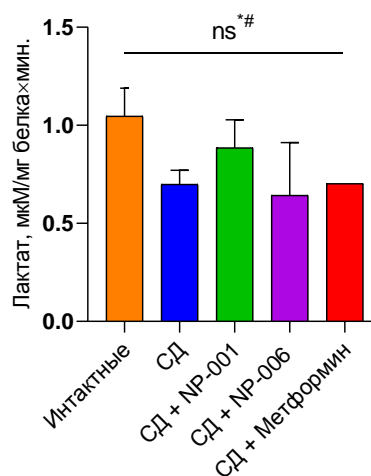
Д

**Скорость гликолиза
(глюкозо-6-фосфат, 15 ммоль/л)**



Е

**Скорость гликолиза
(глюкозо-1-фосфат, 15 ммоль/л)**



Ж

**Скорость гликолиза
(фруктозо-1,6-дифосфат, 15 ммоль/л)**

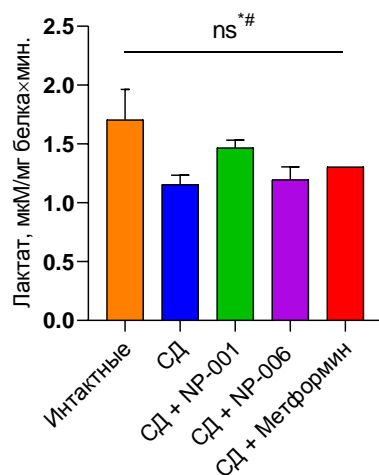


Рисунок 8.11 *Продолжение*. Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на биохимические показатели печени мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. Д – Скорость гликолиза (субстрат: глюкозо-6-фосфат, 15 ммоль/л); Е – Скорость гликолиза (субстрат: глюкозо-1-фосфат, 15 ммоль/л); Ж – Скорость гликолиза (субстрат: фруктозо-1,6-дифосфат, 15 ммоль/л). Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$); по отношению к группе СД, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета (## $p < 0,01$); ns* по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$); ns# по отношению к группе СД, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$).

Однако, скорость гликолиза по субстрату «глюкоза» в концентрации 15мМ в группах животных, получавших вещества NP-001 и NP-006, также не изменилась по сравнению с группой СД ($0,81 \pm 0,05$ мкМ/мг белка*мин и $0,75 \pm 0,11$ мкМ/мг белка*мин соответственно, против $0,79 \pm 0,05$ мкМ/мг белка*мин) (рис 8.11, В). В данном случае возможны 2 варианта: низкая активация глюкокиназы новыми субстанциями или увеличенная утилизация глюкозы до гликогена. Последнее было ранее подтверждено для соединения NP-006. Таким образом, следующим этапом необходимо было определить активность ГК под действием новых веществ. По данным рисунка 8.12 видно, что оба потенциальных активатора глюкокиназы способны эффективно увеличивать действие данного фермента (для NP-001 = $9,01 \pm 2,34$ мЕД/мг белка), а для соединения NP-006 найдено статистически значимое влияние ($12,1 \pm 3,36$ мЕД/мг белка) на соответствующий показатель по отношению к группе СД ($6,79 \pm 2,64$ мЕД/мг белка) и интактному контролю ($5,98 \pm 2,92$ мЕД/мг белка). Препарат сравнения проявлял незначимое повышение скорости гликолиза по глюкозе, не связанное с активацией глюкокиназы ($5,77 \pm 1,89$ мЕД/мг белка) или каких-либо других ферментов вышеописанного метаболического пути.

Активность глюкокиназы печени

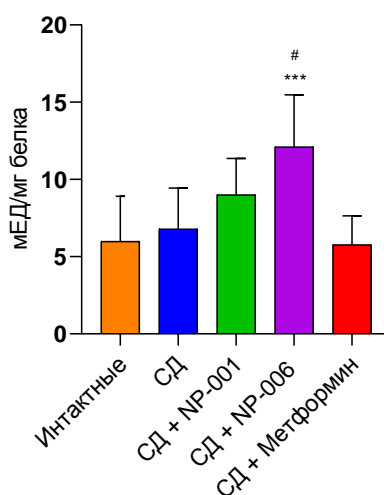


Рисунок 8.12 Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на активность глюкокиназы печени мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета (** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$); по отношению к группе СД, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета (## $p < 0,01$).

По данным литературы также известно, что активаторы глюкокиназы ингибируют глюконеогенез [Haeusler R. A. et al., 2015]. Для оценки аналогичного действия у новых изучаемых веществ измеряли уровни лактата и аланина в печени, а также концентрацию лактата и аланина в плазме крови.

Существенное снижение аланина в плазме крови под влиянием исследуемых соединений (NP-001= $0,09 \pm 0,02$ мг/мл и NP-006= $0,08 \pm 0,01$ мг/мл) по сравнению с СД ($0,16 \pm 0,05$ мг/кл) (рис.8.13, А) говорит об отсутствии мышечного голодания, а глюкоза, превращаясь в пируват участвует в общем пути катаболизма для оснащения клетки главным источником энергии – АТФ. Соединения NP-001 и NP-006 достоверно снижают уровень лактата в печени по отношению к интактному контролю (рис 8.13, Г), а также обе субстанции и препарат сравнения статистически значимо уменьшают содержание аланина в печени при сопоставлении с животными группы сахарного диабета в 3,3, 8,0 и 6,4 раза соответственно (рис. 8.13, Б), При измерении концентрации лактата в плазме крови статистических различий между опытными группами и животными с СД найдено не было, так же, как и с интактным контролем (рис. 8.13, В). Все приведенные данные свидетельствует о низкой скорости образования глюкозы из данных субстратов – ингибирование глюконеогенеза.

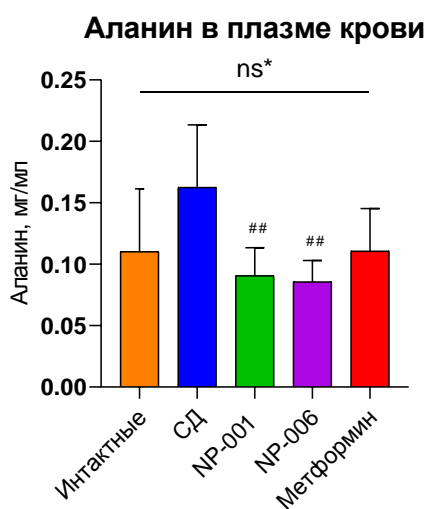
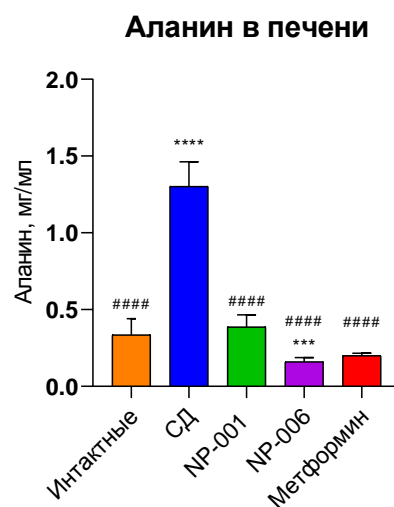
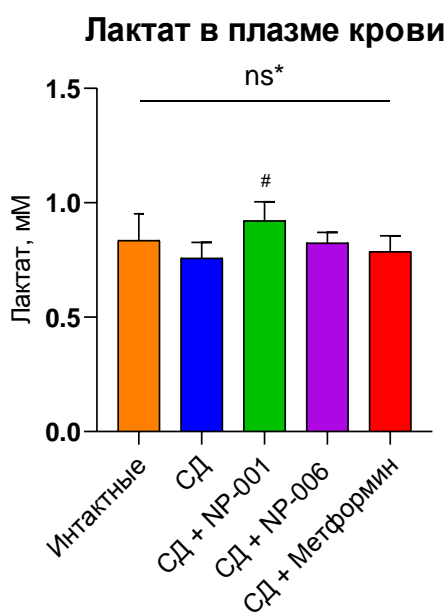
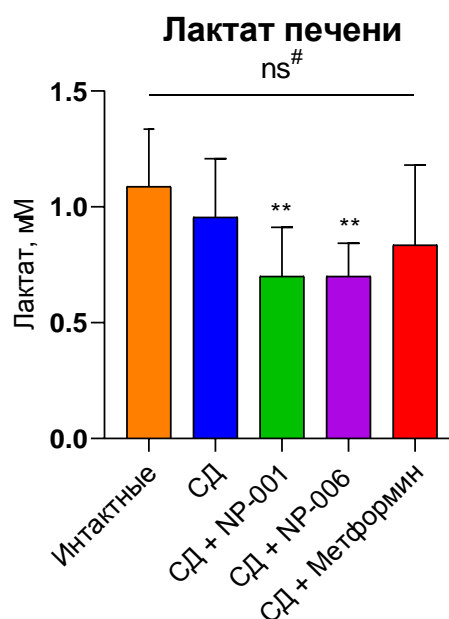
А**Б****В****Г**

Рисунок 8.13 Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на глюконеогенез мышей DIO-C57bl/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. **А** - аланин в плазме крови; **Б** - аланин в печени; **В** - лактат плазмы крови; **Г** - лактат печени. Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$); по отношению к группе СД, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($#p < 0,05$; $##p < 0,01$; $####p < 0,0001$); ns^* по отношению к интактному контролю, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$); $ns^{\#}$ по отношению к группе СД, критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$).

8.2 Заключение

По результатам изучения влияния соединений NP-001 и NP-006 на уровень глюкозы крови и массу тела мышей DIO-C57bl/6J при хроническом введении установлено, что наиболее выраженный антигипергликемический эффект, сопоставимый с таковым у препарата сравнения метформина, а также значимое снижение массы тела животных к концу 21-дневного введения и в динамике, превосходя данный показатель у референса, оказало соединение NP-006. Вещество NP-001 незначимо снижало массу тела мышей, однако, не проявило достоверного улучшения толерантности к глюкозе.

Из имеющихся данных изучения влияния исследуемых субстанций на уровень инсулина плазмы крови следует, что и NP-001, и NP-006 и препарат сравнения значительно улучшали чувствительности к гормону по сравнению с группой СД, где наблюдалась выраженная гиперинсулинемия, а также, судя по показателю НОМА-IR, снижали резистентность к данному гормону.

При рассмотрении вклада отдельных депо в общую массу жировой ткани было обнаружено, что в группе животных, которым вводили новое соединение NP-001, масса эпидидимальной жировой ткани не изменялась, а масса ретроперитонеальной и мезентериальной жировой ткани достоверно снизилась в 1,3 и 1,1 раза соответственно ($p < 0,01$) по отношению к интактному контролю. В группе, получавшей вещество NP-006, наблюдали незначимое снижение общей массы жировой ткани, преимущественно за счет снижения массы ретроперитонеального и мезентериального жира в 1,6 и 1,5 раз соответственно ($p < 0,001$) в сравнении с группой СД и интактным контролем, а в случае с эпидидимальным жиром, наблюдалась только тенденция к уменьшению количества жировой ткани. Для метформина существенного влияния на вес животных выявлено не было. Таким образом, снижение общей массы животных опытных групп, а также препарата сравнения коррелировало с морфометрическими

показателями, и осуществлялось, в основном, за счет ретроперитонеальных и мезентериальных висцеральных отложений.

Полученные данные влияния изучаемых субстанций на белые форменные элементы крови и содержания ЦИК, в полной мере отражают развитие воспалительного процесса и нарушение иммунной системы при моделировании сахарного диабета 2 типа на мышах линии C57bl/6J. Установлено, что соединения NP-001 и NP-006 достоверно восстанавливают количество сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, а также статистически незначимо снижают уровни палочкоядерных нейтрофилов и эозинофилов, что отражает положительное терапевтическое влияние данных веществ при системном воспалении СД 2 типа.

В ходе определения липидного профиля мышей DIO-C57bl/6J под влиянием соединений NP-001 и NP-006 было выяснено, что изучаемые субстанции и метформин не влияют на уровень холестерина и ЛПНП на модели сахарного диабета 2 типа, а также статистически незначимо снижают уровень триглицеридов в плазме крови.

Результаты, полученные в тестах на гомогенате печени, свидетельствуют о том, что в группе животных, получавших вещества NP-001 и NP-006, наблюдалось незначимое повышение триглицеридов, что коррелирует с литературными данными изученных активаторов глюкокиназы, при этом нет подтверждения развития стеатоза печени в клинических испытаниях [Leighton B., 2005], а также не регистрировалось внешних патологических изменений печени при аутопсии. По данным содержания гликогена в печени можно заметить недостоверное увеличение соответствующего показателя для группы вещества NP-006, в то время как соединение NP-001 и препарат сравнения метформин так же незначимо, но снижают концентрацию гликогена в печени. Вышеописанные данные коррелируют со скоростью гликогенолиза, рассчитанной по образованию конечного продукта – лактата.

При регистрации скорости гликолиза с применением субстратов глюкозо-6-фосфат, глюкозо-1-фосфат и фруктозо-1,6-дифосфат было показано отсутствие существенного статистически значимого влияния на образование конечного

продукта в сравнении с контрольной группой сахарного диабета всех трех опытных групп, что отражает неактивность промежуточных ферментов данного метаболического пути. Для оценки активности фермента, участвующего в утилизации глюкозы и играющего главную роль в механизме действия исследуемых субстанций - глюкокиназы, была оценена скорость гликолиза по субстрату «глюкоза» в концентрации 15мМ и, непосредственно, изучение активации ГК в печени в группах животных, получавших вещества NP-001 и NP-006. Полученные результаты характеризуют оба соединения как потенциальные активаторы глюкокиназы, поскольку показана высокая способность увеличивать действие данного фермента, а для соединения NP-006 найдено статистически значимое влияние на соответствующий показатель по отношению к группе СД и интактному контролю, а отсутствие изменений в концентрации лактата в тесте изучения скорости гликолиза по глюкозе может указывать на повышенную утилизацию ее до гликогена.

Существенное снижение лактата и аланина в печени, а также аланина в плазме крови под влиянием исследуемых соединений говорит об отсутствии мышечного голодания и низкой скорости образования глюкозы из вышеуказанных субстратов – ингибирование глюконеогенеза, что также подтверждается данными литературы для данной группы препаратов [Haeusler R. A. et al., 2015].

Таким образом, исходя из всего вышеописанного можно сделать вывод о том, что оба исследуемых соединения соответствуют большинству характеристик, выявленных для группы активаторов глюкокиназы. В ходе изучения антидиабетической активности соединений NP-001 и NP-006 при хроническом введении на мышах линии DIO-C57bl/6J выявлено наиболее активное соединение - NP-006, которое может быть рекомендовано для дальнейшего изучения в качестве потенциального перорального сахароснижающего препарата.

ГЛАВА 9. ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЙ NP-001 И NP-006 НА МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ПОЗДНИХ ОСЛОЖНЕНИЙ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Основную проблему диабетологии, как медицинскую, так и социальную, представляют поздние сосудистые осложнения сахарного диабета [Балаболкин М. И., 2002]. В данном разделе представлены результаты исследований влияния наиболее активных соединений NP-001 и NP-006 на такие отдаленные последствия СД как ангиопатия и нарушение коагуляции, причинами которых являются окислительный стресс, увеличение тромбогенного потенциала крови и повышенное гликирование белков, что в совокупности ведет к эндотелиальной дисфункции.

9.1 Антиоксидантные свойства соединений NP-001 и NP-006 на моделях *in vitro*

Окислительный стресс участвует в патогенезе ряда заболеваний, включая атеросклероз, нейродегенеративные заболевания, такие как болезни Альцгеймера и Паркинсона, рак, сахарный диабет, воспалительные заболевания, а также психические расстройства и процессы старения. Он определяется как дисбаланс между образованием свободных радикалов и реакционноспособных метаболитов и их устранением посредством защитных антиоксидантных систем [Bonini M.G., 2014].

Для подтверждения наличия антиоксидантной активности наиболее активных соединений были выбраны следующие методики: модель гемоглобин (Hb)-H₂O₂-люминол-зависимой хемилюминесценции и изучение способности веществ инактивировать свободный стабильный радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ•) *in vitro*.

По данным рисунка 9.1 видно, что изучаемое соединение NP-001 проявляет выраженное антиоксидантное действие в хемилюминесцентной методике окисления люминола, превосходя эффект препарата сравнения тролокс по параметру IC₅₀ (0,20±0,001 мкМ против 5,75±2,22 мкМ). Для вещества NP-006 в

ходе исследования не удалось построить кривую ингибирования IC_{50} , так как данная субстанция не показала выраженной АО-активности.

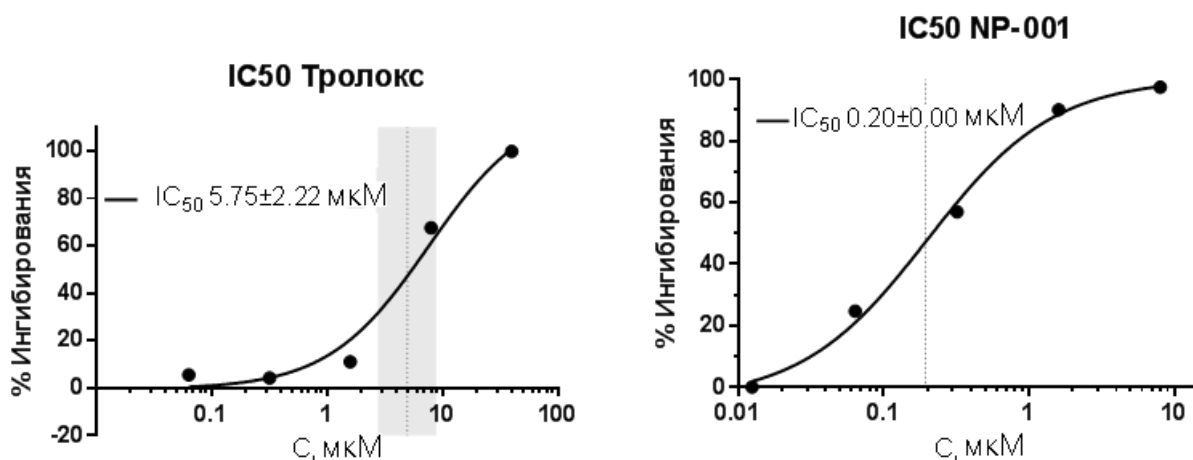


Рисунок 9.1 Влияние соединения NP-001 и препарата сравнения тролокс на АФК-зависимую хемилюминесценцию

Поскольку вышеуказанный метод не позволяет выяснить природу механизма антиоксидантного действия соединения-лидера NP-001, на втором этапе было решено провести дополнительное исследование с помощью методики определения антирадикальной активности с ДФПГ. Для проведения концентрационного исследования использовался диапазон концентраций от 500 до 1 мкМ, где наиболее активной концентрацией оказалась 1000 мкМ для тролокса и 200 мкМ для вещества NP-001. В данном тесте изучаемая субстанция проявила выраженную антирадикальную активность, однако, не превышала показатель EC_{50} препарата сравнения ($78,32 \pm 5,71$ мкМ против $44,16 \pm 11,97$).

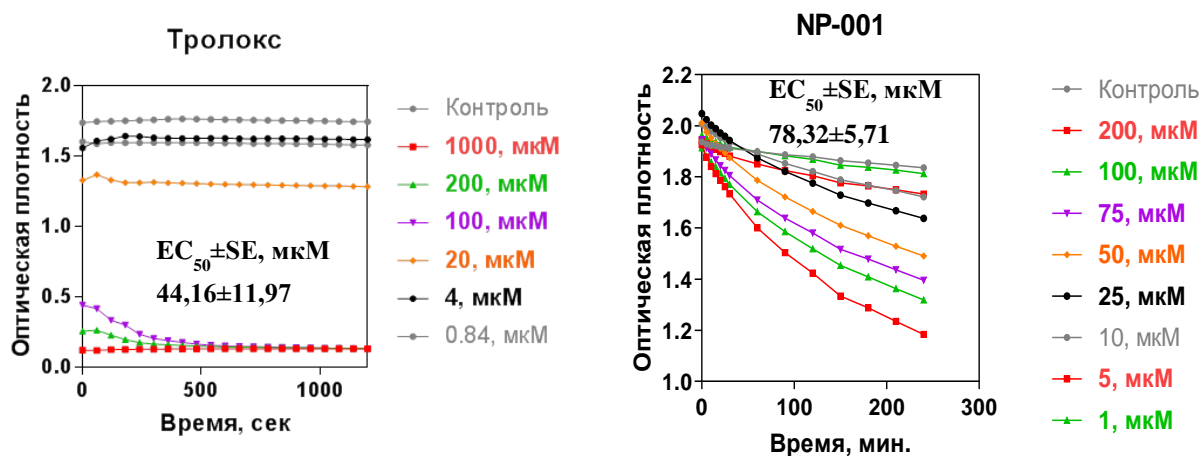


Рисунок 9.2 Влияние соединения NP-001 и препарата сравнения тролокс на оптическую плотность ДФПГ

Таким образом, при исследовании антиоксидантных свойств наиболее активных соединений было найдено, что вещество NP-006 не проявляло какой-либо АО-активности, когда как субстанция NP-001 в хемилюминесцентной методике окисления люминола показало активность выше ($EC_{50}=0,20\pm 0,001$) препарата сравнения (тролокс, $EC_{50}=5,75\pm 2,22$). Также, данное соединение проявило антирадикальные свойства в методике с ДФПГ, не превосходя при этом аналогичный эффект у референса тролокса.

9.2 Антигликирующее действие изучаемых соединений на моделях *in vitro*

Неферментативное взаимодействие белков с глюкозой (реакция Майяра) приводит к образованию химических соединений – конечных продуктов гликирования (КПГ). Внутри- и внеклеточное накопление КПГ считают важным фактором патогенеза атеросклероза, сердечной недостаточности, воспаления, ревматоидного артрита и остеоартрита, нейродегенеративных заболеваний, включая болезни Альцгеймера и Паркинсона. Особенно интенсивно данный процесс протекает при сахарном диабете и имеет немаловажное значение в развитии его осложнений [Jedsadayanmata A., 2013]. В связи с этим было проведено исследование наиболее активных веществ NP-001 и NP-006 на наличие антигликирующего эффекта.

Из данных таблицы 9.1 следует, что в тесте оценки антигликирующей активности в фосфатном буфере соединение NP-001 умеренно замедляет образование конечных продуктов гликирования, не превышая при этом таковое для препарата сравнения аминогуанидина по показателю IC_{50} (1909,9 мкМ против 765,0 мкМ). Субстанция NP-006 не проявила какой-либо активности на данной модели. Таблица 9.1 Значения, установленные для веществ NP-001 и NP-006 в тесте оценки антигликирующей активности в фосфатном буфере, ($M\pm m$)

Исследуемые соединения	Антигликирование, %		Антигликирование, IC_{50} , мкМ
	$C=1*10^{-3}$	$C=1*10^{-4}$	
NP-001	39,18±0,75*	-9,74±3,39	1909,9
NP-006	-1,30±1,56	16,96±2,90	—
Аминогуанидин	65,40±2,40*	6,00±2,60	765,0

* данные статистически значимы по критерию one-way ANOVA, пост-тест Даннета ($p\leq 0,05$).

На следующем этапе было проведено изучение антигликооксидативной активности исследуемых соединений. Реакция гликооксидации в присутствии меди характерна более выраженным свободнорадикальным и окислительным компонентом в ходе протекания, чем классическая реакция в среде с присутствием PBS, pH 7.4, где механизм во многом определяется прямой нуклеофильной атакой. КПГ при гликооксидации несколько отличаются от таковых при гликировании. Так, при гликооксидации образуются карбоксиметиллизин, пентозидин, при гликировании – пирралин. Результаты данного исследования представлены в таблице 9.2.

Таблица 9.2 Значения, установленные для веществ NP-001 и NP-006 в тесте оценки антигликирующей активности в присутствии меди, (M±m)

Исследуемые соединения	Антигликирование, %		Антигликирование, IC ₅₀ , мкМ
	C=1*10 ⁻³	C=1*10 ⁻⁴	
NP-001	52,29±4,71*	22,94±0,79	763,8
NP-006	37,04±8,74	31,25±9,40	2570,4
Лозартан	63,42±2,34*#	49,33±3,15*	130,0

* данные статистически значимы по критерию one-way ANOVA, пост-тест Даннета (p≤0,05).

- активность в концентрации 300 мкМ (3*10⁻⁴ М), по причине падения активности в более высоких концентрациях.

Обе изучаемые субстанции NP-001 и NP-006 не показали выраженной антигликооксидативной активности в тесте оценки антигликирования в присутствии меди, поскольку не превзошли соответствующий эффект препарата сравнения лозартана по показателю IC₅₀ (763,8 мкМ и 2570,4 мкМ соответственно, против 130,0 мкМ).

9.3 Изучение хелатирующих свойств соединений на модели медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты *in vitro*

Исследование хелатирующих свойств наиболее активных соединений проводили по методу металл-зависимого аутоокисления аскорбиновой кислоты. Активность веществ в данном тесте может быть связана как со способностью соединений подавлять реакции редокс-цикла металлов переходной валентности, значимые при образовании КПГ, так и со способностью соединения хелатировать катион меди. Методика отобрана благодаря способности определять действие на

оба этих механизма [Nishikimi M., 1987]. В качестве растворителя для соединений использован ДМСО, проявляющий антирадикальные свойства и поддерживающий редокс-цикл катионов меди смещенным в сторону образования Cu (II) (форма, требуемая для образования дегидроаскорбата) из Cu (I). Это повышает вклад хелатирования в конечный результат испытаний. По этой причине, а также для терминологического упрощения активность в данном тесте обозначали как «хелатирование».

В результате проведенных исследований установлено, что соединения NP-001 и NP-006 проявляют весьма высокую активность в рамках данной экспериментальной модели. Количественная оценка активностей субстанций и референта пиоглитазона представлена в таблице 9.3.

Таблица 9.3 Количественная оценка активностей соединений и референта пиоглитазона в тесте аутоокисления аскорбиновой кислоты, вызванного медью по показателю IC₅₀, мкМ

Исследуемые соединения	IC ₅₀ , мкМ
NP-001	2,7*
NP-006	3,3*
Пиоглитазон	40,1*

*Данные статистически значимы по отношению к контролю (Манн-Уитни, p <0,05)

Сравнительная оценка данных показывает, что соединения NP-001 и NP-006 превосходят вещество сравнения в 14,9 и 12,2 раза соответственно. Такая высокая хелатирующая способность изучаемых субстанций может быть использована в предотвращении формирования поздних осложнений сахарного диабета.

9.4 Антиагрегантное действие наиболее активных веществ на моделях *in vitro*

Повышенное тромбообразование как позднее осложнение сахарного диабета развивается вследствие нарушения коагуляции, которая, в свою очередь, проявляются снижением фибринолиза, повышением содержания фибриногена, а также увеличением экспрессии активатора тканевого плазминогена и ингибитора 1 типа активатора плазминогена (ИАП-1 или PAI-1) [Балаболкин М. И., 2002]. Все

вышеперечисленные факторы неизбежно приводят к нарушению функций эндотелия, атеросклерозу и другим микро-и макроангиопатиям.

Первоначально было исследовано действие соединений NP-001 и NP-006 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную различными агонистами (АДФ, адреналин, коллаген).

В ходе данного исследования было найдено, что тестируемая субстанция NP-001 в конечной концентрации 100 мкМ блокировала процессы агрегации тромбоцитов, индуцированные АДФ, адреналином и коллагеном на $60,1 \pm 10,1$; $8,3 \pm 2,0$ и $22,8 \pm 4,0\%$ соответственно. В то же время вещество NP-006 ингибировало АДФ-индуцируемую агрегацию тромбоцитов на $45,9 \pm 5,3\%$, адреналин-индуцируемую на $19,7 \pm 7,2\%$ и коллаген-индуцируемую на $28,4 \pm 7,8\%$ (табл. 9.4). Препарат сравнения (АСК) приводил к снижению амплитуды агрегации тромбоцитов на $52,1 \pm 4,2\%$ при добавлении индуктора АДФ. Адреналин- и коллаген-индуцированную агрегацию АСК ингибировала на $77 \pm 3,2$ и $83 \pm 1,9\%$ соответственно (табл. 9.4).

Таблица 9.4 Влияние соединений NP-001 и NP-006 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную различными агонистами ($M \pm m$) ($n=6$)

№ п/п	Тестируемый образец	Концентрация тестируемых образцов, мкМ	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов		
			АДФ (5 мкМ)	Адреналин (5 мкМ)	Коллаген (4 мкг/мл)
1.	NP-001	100	$60,1 \pm 10,1^*$	$8,3 \pm 2,0$	$22,8 \pm 4,0^*$
2.	NP-006		$45,9 \pm 5,3^*$	$19,7 \pm 7,2$	$28,4 \pm 7,8^*$
3.	АСК		$52,1 \pm 4,2^*$	$77,7 \pm 3,2^*$	$83,0 \pm 1,9^*$

Примечания:

*-данные достоверны относительно контроля, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$)

n-число проб в каждой группе

АСК-ацетилсалициловая кислота

Поскольку соединение NP-001 проявило антиагрегантную активность выше 50%, было проведено дальнейшее изучение дозозависимого эффекта с целью установления показателя IC_{50} . Для этого антиагрегантная активность была изучена в концентрациях 100, 10 и 1 мкМ. В указанных концентрациях вещество NP-001 блокировало агрегацию кровяных пластинок на $27,9 \pm 4,6$ и $20,3 \pm 4,7\%$

соответственно, значение IC_{50} при этом соответствовало 50 мкМ (табл. 9.5). Изучение препарата сравнения позволило заключить, что АСК также приводит к дозозависимому ингибированию агрегации тромбоцитов и показатель IC_{50} составил 104 мкМ (табл. 8.5).

Таблица 9.5 Влияние соединений NP-001 на АДФ-индуцированную (5 мкМ) агрегацию тромбоцитов ($M \pm m$) (n=6)

Исследуемое соединение	Δ % ингибирования агрегации тромбоцитов			IC_{50} , мкМ
	100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
NP-001	60,1±10,1*	27,9±4,6*	20,3±4,7	50
АСК	52,1±4,2*	20,8±3,5*	4,6±1,7	104,0

*-данные достоверны относительно контроля, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$)

n-число проб в каждой группе

АСК-ацетилсалициловая кислота

Известно, что сахарный диабет является протромботическим состоянием, при этом развиваются выраженные нарушения всех звеньев системы гемостаза, что способствует развитию и прогрессированию микро- и макрососудистых осложнений [Северина А. С., Шестакова М. В., 2004]. Так, было установлено, что изучаемая субстанция NP-001 проявила выраженную антиагрегантную активность на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, превосходя по показателю IC_{50} препарат сравнения в 2 раза, что, возможно, позволит снизить тромбогенный потенциал данной патологии.

9.5 Антитромбогенное действие наиболее активных веществ на моделях *in vivo*

Определение антитромбогенного потенциала наиболее активных веществ было выполнено в условиях стрептозоцин-индуцированного сахарного диабета крыс-самцов, находящихся на высокожировой диете. Моделирование тромбоза сонной артерии животных проводилось посредством индукции 50%-ного раствора $FeCl_3$. В качестве препарата сравнения использовалась ацетилсалициловая кислота (АСК).

В ходе исследования антитромботической активности соединений было установлено, что в группе контрольных животных (без экспериментальной

патологии) среднее время полной окклюзии сонной артерии составляло $18,2 \pm 0,6$ мин, в то время как в опытной группе животных (с экспериментальным сахарным диабетом) данный показатель составлял $15 \pm 1,1$ мин (табл. 9.6).

Такая тенденция к снижению времени образования стабильного тромба в сонной артерии в условиях сахарного диабета свидетельствует о наличии серьезных осложнений данного заболевания со стороны сердечно-сосудистой системы, а также системы гемостаза, а именно увеличение тромбогенного потенциала крови и развития эндотелиальной дисфункции [American Diabetes Association, 2003; Osende J. I., 2001].

В группе интактных животных, которым вводили соединение NP-001, наблюдали среднее пролонгирование времени окклюзии на $29,7 \pm 9,3\%$. В условиях экспериментального сахарного диабета соединение NP-001 проявило выраженную антитромботическую активность, пролонгируя время окклюзии сосуда на $46,7 \pm 6,0\%$, превосходя препарат сравнения в 1,7 раза (табл. 9.6). Таким образом, было установлено, что данное соединение оказывает наибольший фармакологический эффект в условиях экспериментального сахарного диабета.

При изучении антитромбогенной активности соединения NP-006 было выявлено, что в группе животных без экспериментальной патологии исследуемое вещество проявляло схожую активность с образцом NP-001, пролонгируя время образования сгустка на $27,0 \pm 4,9\%$, однако, в условиях экспериментального сахарного диабета соединение NP-006 проявило низкую антитромботическую активность: пролонгирование времени полной окклюзии сонной артерии составило $8,7 \pm 2,5\%$ (табл. 9.6).

В группе интактных животных, получавших ацетилсалициловую кислоту, наблюдалось удлинение времени окклюзии сосуда на $35,7 \pm 7,5\%$ (табл. 9.6). По данному показателю препарат сравнения превосходит по активности исследуемые соединения NP-001 и NP-006 в 1,2 и 1,3 раза соответственно в условиях отсутствия экспериментальной патологии. Однако, при наличии экспериментального сахарного диабета АСК уступает по активности соединению NP-001, что

свидетельствует о его неэффективности в качестве средства профилактики отдаленных осложнений сахарного диабета со стороны системы гемостаза.

Таблица 9.6 - Антитромботическая активность соединений NP-001, NP-006 и ацетилсалициловой кислоты у интактных животных и в условиях стрептозоцин-индуцированного сахарного диабета на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного 50%-ным раствором FeCl₃ (M±m) (n=5)

№ п/п	Тестируемый образец	Доза, мг/кг	Время окклюзии сонной артерии, мин		Δ% пролонгирования времени окклюзии сонной артерии	
			Интакт	СД	Интакт	СД
1.	Контроль		18,2±0,6	15,0±1,1		
2.	NP-001	237 ¹	23,6±1,7*	22,0±0,9*	29,7±9,3	46,7±6,0
3.	NP-006	260 ¹	22,6±0,9	16,3±0,4	27,0±4,9	8,7±2,5
4.	Ацетилсалициловая кислота	100	26,3±1,4*	20,0±1,6	35,7±7,5	28,3±12,6

Примечание:

n-число животных в группе

1-доза, эквивалентная 100 мг/кг ацетилсалициловой кислоты

*-данные достоверны по отношению к контролю, критерий one-way ANOVA с поправкой Бонферрони (p < 0,05)

Исходя из вышеописанных данных можно заключить, что в условиях стрептозоцин-индуцированного сахарного диабета на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного 50%-ным раствором FeCl₃, наибольшей антитромботической активностью обладала субстанция NP-001, превышая таковую у препарата сравнения АСК в 1,7 раз.

9.6 Заключение

При изучении антиоксидантных свойств *in vitro* наиболее активных субстанций было установлено, что вещество NP-001 проявило вышеуказанную активность в хемилюминесцентной методике окисления люминола, где показало эффект выше препарата сравнения тролокс почти в 4 раза. Была также выяснена антирадикальная природа данного свойства в тесте способности инактивировать

свободный стабильный радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ•), в ходе которого было проведено концентрационное исследование и рассчитан показатель EC_{50} ($78,32 \pm 5,71$ мкМ) для данного соединения, который не превосходил при этом таковой у препарата сравнения (тролокс $EC_{50} = 44,16 \pm 11,97$ мкМ). Вещество NP-006 в данном исследовании не проявило какой-либо антирадикальной (АРА) или антиоксидантной (АОА) активности.

Влияние субстанций NP-001 и NP-006 на образование конечных продуктов гликирования проводили в тесте оценки антигликирующей активности в фосфатном буфере и антигликооксидативных свойств в присутствии меди. Показано, что соединение NP-001 умеренно замедляет образование КПП в фосфатном буфере, не превышая при этом таковое для препарата сравнения аминогуанидина по показателю IC_{50} ($1909,9$ мкМ против $765,0$ мкМ). Субстанция NP-006 не проявила какой-либо активности на данной модели. Обе изучаемые субстанции NP-001 и NP-006 не показали выраженной антигликооксидативной активности в тесте оценки антигликирования в присутствии меди.

В ходе изучения хелатирующих свойств наиболее активных соединений на модели медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты *in vitro* было найдено, что соединения NP-001 и NP-006 превосходят вещество сравнения в 14,9 и 12,2 раза соответственно. Высокая активность в данном тесте, вероятно, определена присутствием в структуре соединений «-S-» и «-S-S-» фрагментов. При этом данные субстанции не вносят значимого вклада в тесте гликирования в среде с медью (гликооксидация). Одной из возможных причин подобного может быть то, что в условиях реакционной среды при гликооксидации катионы меди первично взаимодействуют с белком, образуя комплексные соединения с остатками аминокислот, а способность соединений NP-001 и NP-006 отделить катион-катализатор гликирования от белка не является достаточной при данных условиях реакционной среды. Также стоит отметить, что в отсутствии катионов меди как факторов течения реакции гликирования (гликирование без меди в фосфатном буферном растворе) оба вещества имеют менее выраженное действие, на грани отсутствия такового.

Тромбоциты при СД характеризуются высокой адгезивностью и склонностью к агрегации [Северина А. С., Шестакова М. В., 2004], что значительно увеличивает тромбогенный потенциал у больных с сахарным диабетом. Исследования влияния субстанций NP-001 и NP-006 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную различными агонистами, показали, что оба соединения наиболее активны в модели, где в качестве индуктора выступал АДФ, при этом вещество NP-001 проявило выраженную антиагрегантную активность, превосходя по показателю IC_{50} препарат сравнения (АСК) в 2 раза, тем самым, оказывая положительное влияние на систему гемостаза при СД.

Исходя из полученных данных по изучению антитромбогенной активности можно заключить, что в условиях стрептозоцин-индуцированного сахарного диабета на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного 50-%-ным раствором $FeCl_3$, наибольшей антитромботической активностью обладала субстанция NP-001, превышая таковую у препарата сравнения АСК в 1,7 раз.

Таким образом, в ходе изучения отдаленных последствий СД в тестах *in vitro* и *in vivo* было найдено соединение-лидер - NP-001, которое проявляло значительные антиоксидантные свойства в хемилюминесцентной методике окисления люминола, а также антирадикальный эффект в тесте с ДФПГ. Кроме того, данное вещество показало выраженные свойства хелаторов металлов переходной валентности. Также, был отмечен значительный антитромбогенный потенциал наиболее активной субстанции в условиях стрептозоцин-индуцированного сахарного диабета на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного 50-%-ным раствором $FeCl_3$. Все вышеперечисленное выполняет важную роль в предотвращении поздних сосудистых осложнений сахарного диабета.

ГЛАВА 10. ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЙ NP-001 И NP-006

Важным этапом при изучении биологических свойств новых соединений является определение токсикологических и фармакокинетических свойств наиболее активных веществ.

Для этого *in silico* были исследованы показатели ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity), причем, в первую очередь необходимо проанализировать параметры острой и специфической токсичности (Toxicity), поскольку чрезвычайно важно выяснить класс токсичности и допустимые дозировки исследуемых соединений на доэкспериментальных этапах. Для наиболее активных веществ и препарата сравнения PF-04937319 были также вычислены *in silico* такие характеристики, как всасывание, распределение, метаболизация и выведение – важнейшие составляющие фармакокинетики лекарственного вещества. На втором этапе была экспериментально изучена цитотоксичность соединений NP-001 и NP-006 на перитонеальных макрофагах мышей и неонатальных фибробластах сердца крыс. Также было проведено экспериментальное определение параметров острой токсичности (LD_{50}), величины, необходимой для определения класса токсичности соединений, а также, для подбора доз при экспериментальном изучении фармакологической активности веществ в исследованиях *in vivo*.

10.1 Оценка *in silico* показателей ADMET

Консенсусный прогноз показателей ADMET был выполнен для двух наиболее активных соединений NP-001 и NP-006 и препарата сравнения PF-04937319 с использованием нескольких программных систем и on-line сервисов, перечень которых приведен во 2 главе «Материалы и методы».

10.1.1 Консенсусный прогноз острой токсичности LD₅₀ и класса токсичности наиболее активных соединений

Определение средней прогнозной оценки острой токсичности изучаемых соединений проводилось для мышей и крыс при пероральном и внутрибрюшинном введении.

По данным таблиц 10.1 и 10.2, при п/о введении вещества NP-001 и NP-006, а также референсный препарат PF-04937319 можно отнести к 4 классу токсичности (малотоксичные), согласно классификации Организации Экономического Сотрудничества и Развития (OECD).

Таблица 10.1 Консенсусный прогноз острой токсичности LD₅₀ и класса токсичности наиболее активных соединений (п/о, крысы)

Параметры прогнозной оценки		Шифр химического соединения		
		NP-001	NP-006	PF-04937319
Молекулярная масса		396.4	428.5	432.4
МС ADMET	Медиана, мг/кг	—	—	1000
	Среднее, мг/кг	—	—	948
Admet SAR	Острая токсичность, мМ/кг	2.14	2.12	2.37
	Острая токсичность, мг/кг	849.5	908.72	1026.30
pkCSM	Острая токсичность, мМ/кг	2.21	2.21	2.14
	Острая токсичность, мг/кг	876.04	945.27	926.20
ProTox, мг/кг		3300	4000	1000
Среднее LD50, мг/кг		1014.66	1180.40	980.10
Класс по среднему LD50		4	4	4

Примечание. «—» – отказ от прогноза.

Таблица 10.2 Консенсусный прогноз острой токсичности LD₅₀ и класса токсичности наиболее активных соединений (п/о, мыши)

Шифр химического соединения	Молекулярная масса	МС ADMET		Среднее LD ₅₀ мг/кг	Класс по среднему LD ₅₀
		Медиана мг/кг	Среднее мг/кг		
NP-001	396.4	1125	1869	1497	4
NP-006	428.5	1125	1869	1497	4
PF-04937319	432.4	315	377	346	4

По результатам расчетных оценок в программе МС ADMET при внутрибрюшинном пути введения субстанции NP-001 и NP-006 имеют средние LD₅₀ 129,5 и 430 мг/кг (для крыс и мышей соответственно). Таким образом, данные соединения можно также отнести к 4 классу токсичности. Препарат сравнения является практически нетоксичным (5 класс по OECD) по результатам прогноза для обоих видов животных (табл. 10.3 и 10.4).

Таблица 10.3 Консенсусный прогноз острой токсичности LD₅₀ и класса токсичности наиболее активных соединений (в/б, крысы)

Шифр химического соединения	Молекулярная масса	МС ADMET		Среднее LD ₅₀ мг/кг	Класс по среднему LD ₅₀
		Медиана мг/кг	Среднее мг/кг		
NP-001	396.4	115	144	129.5	4
NP-006	428.5	115	144	129.5	4
PF-04937319	432.4	547	900	723.5	5

Таблица 10.4 Консенсусный прогноз острой токсичности LD₅₀ и класса токсичности наиболее активных соединений (в/б, мыши)

Шифр химического соединения	Молекулярная масса	МС ADMET		Среднее LD ₅₀ мг/кг	Класс по среднему LD ₅₀
		Медиана мг/кг	Среднее мг/кг		
NP-001	396.4	451	409	430	4
NP-006	428.5	451	409	430	4
PF-04937319	432.4	775	763	769	5

Из вышеуказанных данных следует, что оба изучаемых вещества NP-001 и NP-

006 можно предположительно отнести к 4 классу малотоксичных соединений, однако, прежде всего, необходимо выполнить экспериментальное подтверждение в дальнейших исследованиях острой токсичности на животных.

10.1.2 Консенсусный прогноз специфической токсичности наиболее активных соединений

Для общего прогноза специфической токсичности были исследованы канцерогенное и мутагенное влияние изучаемых соединений, влияние на ЦНС, а также гепато-, цито-, кардио-, иммуно-, нефро-, нейро- и гематотоксичность.

По итоговым расчетным оценкам таблицы 10.5 можно сделать вывод о том, что изучаемые субстанции и препарат сравнения возможно не будут оказывать канцерогенного действия на организм, поскольку по данным консенсусной оценки соответствующий эффект не прогнозируется.

Таблица 10.5 Консенсусный прогноз канцерогенной опасности наиболее активных соединений

Параметры прогнозной оценки		Шифр химического соединения			
		NP-001	NP-006	PF-04937319	
ADMETSAR		0	0	0	
ProTox		0	0	0	
Microcosm	General IARC or RoC	0	0	0	
	NonCanc IARC or RoC	0	0	0	
	IARC*	General	0	0	0
		Class1	0	0	0
		Class2A/2B	0	0	0
		Class2A	0	0	0
		Class2B	0	0	0
		Class3	0	0	0
	RoC	General	0	0	0
		ClassK	0	0	0
ClassR		0	0	0	
PASS	General	0	0	0	
	Group1	1	1	0	
	Group2A	0	0	0	
	Group2B	0	0	0	
	Group3	0	0	0	
Консенсусная оценка		0.06	0.06	0	

Примечание: 0 – отсутствие канцерогенной опасности; 1 – наличие канцерогенной опасности
*IARC – по данным международного агентства исследования рака; *RoC – по данным базы данных национальной токсикологической программы исследования рака США

Соединения NP-001 и NP-006 также не должны обладать мутагенной активностью, когда как для препарата сравнения, возможно, стоит ожидать проявления данного воздействия. Однако, поскольку общая расчетная оценка для PF-04937319 меньше 0,5, можно сделать вывод о том, что вышеуказанное влияние на организм будет незначительным (табл. 10.6).

Таблица 10.6 Консенсусный прогноз мутагенной активности наиболее активных соединений

Шифр химического соединения	admet SAR	PASS		pkCSM	ProTox	Консенсусная оценка
		Mutagenic	Mutagenic Salmonella	AMES toxicity	Mutagenicity	
NP-001	0	0	0	0	0	0.00
NP-006	0	0	0	0	0	0.00
PF-04937319	1	0	0	0	1	0.40

Примечание: 0 – отсутствие мутагенной активности; 1 – наличие мутагенной активности

Прогноз гепатотоксичности показал, что все три исследуемых соединения могут проявлять соответствующие свойства. Для субстанций NP-001 и NP-006 вероятность наличия вышеуказанной активности выше в 2 раза, чем для PF-04937319. Исходя из этого, можно предположить, что данные вещества более интенсивно метаболизируются ферментами печени по сравнению с препаратом сравнения (табл 10.7).

Таблица 10.7 Консенсусный прогноз гепатотоксичности наиболее активных соединений

Шифр химического соединения	PASS	pkCSM	ProTox	Консенсусная оценка
	Hepatotoxic	Hepatotoxicity	Hepatotoxicity	
00NP-001	1	1	0	0.67
NP-006	1	1	0	0.67
PF-04937319	0	1	0	0.33

Примечание: 0 – отсутствие гепатотоксичности; 1 – наличие гепатотоксичности

Из результатов таблицы 10.8 следует, что все исследуемые соединения не должны обладать цитотоксическими свойствами, поскольку, по данным двух используемых программ (PASS и ProTox) эффект не прогнозируется.

Таблица 10.8 Консенсусный прогноз цитотоксичности наиболее активных соединений

Шифр химического соединения	PASS	ProTox	Консенсусная оценка
	Cytotoxic	Cytotoxicity	
NP-001	0	0	0
NP-006	0	0	0
PF-04937319	0	0	0

Примечание: 0 – отсутствие цитотоксичности; 1 – наличие цитотоксичности

Был также выполнен прогноз кардиотоксичности, который представлен в таблице 10.9. По нижепредставленным данным видно, что соединения NP-001, NP-006 и референс PF-04937319 вероятнее всего не будут проявлять сколько-нибудь выраженного токсического действия на сердце.

Таблица 10.9 Консенсусный прогноз кардиотоксичности наиболее активных соединений

Шифр химического соединения	PASS	admet SAR	pkCSM		ADMET PreServ		Консенсусная оценка
			hERG1	hERG2	pK _i	pIC ₅₀	
			NP-001	1	0	0	
NP-006	1	0	0	0	0	0	0.17
PF-04937319	0	0	0	1	0	0	0.17

Примечание: 0 – отсутствие кардиотоксичности; 1 – наличие кардиотоксичности

Для таких параметров как иммунотоксичность, нефротоксичность, нейротоксичность и гематотоксичность, выполнить консенсусный прогноз по отдельности было невозможно, так как данные виды свойств прогнозируются с помощью только одного программного приложения, поэтому был рассчитан общий токсический эффект, который отражает консенсусная оценка в таблице 10.10. По результатам данного прогноза было выяснено, что новые субстанции могут негативно влиять на почки, иммунную, нервную и кровяную системы (консенсусная оценка = 0,75). В то время как для вещества сравнения не ожидается проявления изучаемых токсичностей. Однако достаточно точно утверждать о наличии указанных свойств изучаемых соединений не представляется возможным, поскольку исследование было проведено только с использованием одной программы.

Таблица 10.10 Консенсусная оценка иммунотоксичности, нефротоксичности, нейротоксичности и гематотоксичности наиболее активных соединений

Шифр химического соединения	Иммуно-токсичность	Нефро-токсичность	Нейро-токсичность	Гемато-токсичность	Консенсусная оценка
	ProTox	PASS	PASS	PASS	
NP-001	0	1	1	1	0.75
NP-006	0	1	1	1	0.75
PF-04937319	0	0	0	0	0.00

Примечание: 0 – отсутствие токсичности; 1 – наличие токсичности

Сводная таблица, обобщающая результаты консенсусного прогноза острой и специфической токсичности представлена ниже (табл. 10.11).

Таблица 10.11 Консенсусный прогноз интегральной оценки общей безопасности наиболее активных соединений

Параметры прогнозной оценки	Шифр химического соединения		
	NP-001	NP-006	PF-04937319
Острая токсичность	0.00	0.00	0.00
Канцерогенность	0.06	0.06	0.00
Мутагенность	0.00	0.00	0.40
Гепатотоксичность	0.67	0.67	0.33
Цитотоксичность	0.00	0.00	0.00
Кардиотоксичность	0.17	0.17	0.17
Нефротоксичность	0,75	0,75	0,00
Нейротоксичность			
Гематотоксичность			
Интегральная оценка	0.23	0.23	0.15

Примечание: 0 – отсутствие токсичности; 1 – наличие токсичности

Согласно вышеуказанным данным, обе изучаемые субстанции NP-001 и NP-006 характеризуются достаточно низкой интегральной оценкой острой и специфической токсичности и могут быть отнесены к 4 классу малотоксичных соединений. При этом при планировании экспериментальных токсикологических исследований особое внимание следует обратить на изучение действия веществ на печень, почки, нервную и кровяную системы.

10.1.3. Консенсусный компьютерный прогноз фармакокинетических параметров наиболее активных веществ

На следующем этапе расчетных исследований характеристик ADMET был выполнен прогноз параметров, связанных с транспортом новых химических соединений. Данные характеристики отражают фармакокинетические свойства лекарственных веществ.

Первостепенно необходимо выяснить, проникают ли данные субстанции через гематоэнцефалический барьер и исключить воздействие на сосудистый компонент и другие структуры головного мозга. Для решения поставленной цели было использовано 5 программных приложений, результаты прогноза которых представлены в таблицах 10.12 и 10.13.

В данном исследовании были определены как коэффициент распределения $\log BV$ (отношение концентрации субстанций в головном мозге к концентрации в периферической крови), так и индекс проникновения новых соединений через ГЭБ.

Для вещества NP-001 коэффициент распределения равен -1,25, что говорит о том, что количество данной субстанции в 17 раз меньше в сосудах головного мозга, чем в периферической крови, а для вещества NP-006 соответствующий коэффициент должен быть в 20 раз меньше указанного соотношения. По данным таблицы 10.12, для референсного препарата ожидается повышенное проникновение через гематоэнцефалический барьер, поскольку разница концентраций будет отличаться в 4 раза.

Таблица 10.12 Консенсусный прогноз проникновения наиболее активных соединений через ГЭБ $\log BV$

Шифр химического соединения	pkCSM	ADMET-PreServ	GEB	Среднее*
NP-001	-1.98	-0.76	-1.01	-1.25
NP-006	-2.17	-0.76	-1.01	-1.31
PF-04937319	-1.43	0.63	-1.07	-0.62

* - консенсусный коэффициент распределения $\log BV$ изучаемых соединений

Вышеописанные параметры подтверждают данные таблицы 10.13, где консенсусная оценка показывает проникает (1) или не проникает (0) изучаемая субстанция через ГЭБ.

Таким образом, по результатам консенсусного прогноза, оба исследуемые соединения NP-001 и NP-006 характеризуются низким индексом проникновения через гематоэнцефалический барьер, что отражает незначительное воздействие на структуры головного мозга, в том числе и на сосудистый компонент.

Таблица 10.13 Консенсусный прогноз индекса проникновения наиболее активных соединений через ГЭБ

Шифр химического соединения	admetSAR	pkCSM	Swiss ADME	ADMET PreServ	GEB	Консенсусная оценка
NP-001	1	0	0	0	0	0.20
NP-006	1	0	0	0	0	0.20
PF-04937319	1	0	0	1	0	0.40

Примечание: 0 – не проникает через ГЭБ; 1 – проникает через ГЭБ

Расчётная оценка прогноза численных значений всасываемости новых соединений через желудочно-кишечный тракт приведена в табл. 10.14, из которой следует, что все соединения возможно будут обладать умеренной способностью всасываться через ЖКТ, что подтверждается данными исследований *in vivo* в главе 5.

Таблица 10.14 Консенсусный прогноз всасываемости наиболее активных соединений через желудочно-кишечный тракт

Шифр химического соединения	admetSAR, %	pkCSM, %	ADMET-PreServ, %	Консенсусная оценка, %
NP-001	95	35	74	68.0
NP-006	93	36	74	67.7
PF-04937319	99	82	38	73.0

В качестве показателей метаболической устойчивости соединений была оценена способность изучаемых субстанций метаболизироваться как печеночными цитохромами, которые ответственны за выведение лекарственных средств, так и CYP450, распределёнными по всему организму.

Исходя из данных, полученных в ходе прогноза метаболизации веществ

всеми цитохромоксидазами, было найдено, что соединения NP-001 и NP-006 более подвержены данному воздействию, когда как для влияния печеночных ферментов расчетные оценки были значительно ниже. Вышеуказанное свойство изучаемых веществ можно характеризовать как положительное, поскольку при прохождении через печеночный барьер, соединения будут менее склонны к разрушению и выведению, следовательно, ожидается более продолжительный фармакологический эффект. Для препарата сравнения общая консенсусная оценка выше, чем у новых химических соединений за счет прогнозных показателей метаболизации в печени, что может привести к более интенсивной его дезактивации (табл. 10.15).

Таблица 10.15 Консенсусный прогноз способности наиболее активных соединений метаболизироваться CYP450

Шифр химического соединения	Все CYP450	Печеночные CYP450				Консенсусная оценка
		admet SAR	PASS	pkCSM	Swiss ADME	
NP-001	0.49	0.63	0.80	0.00	0.00	0.36
NP-006	0.43	0.50	0.80	0.00	0.00	0.33
PF-04937319	0.06	0.63	0.40	0.57	0.40	0.50

Примечание: 0 – не метаболизируются CYP450; 1 – метаболизируются CYP450

Для обобщённой оценки соответствия новых соединений «эталонному» образу лекарственного вещества был проведен анализ всего спектра прогнозных ADMET характеристик, параметры которого представлены в таблице 10.16.

Определяя заключительную оценку, использовали суммативную систему индексов лекарственного соответствия от 0 до 1, где 0 – не соответствует свойствам лекарственного средства, а 1 - полностью соответствует.

Таблица 10.16 Компьютерный прогноз токсичности, проникновения через биологические мембраны и индекса лекарственного соответствия изучаемых веществ

Параметры прогнозной оценки	Шифр химического соединения		
	NP-001	NP-006	PF-04937319
Отсутствие токсичности	0.77	0.77	0.85

Окончание таблицы 10.16

Параметры прогнозной оценки	Шифр химического соединения		
	NP-001	NP-006	PF- 04937319
Отсутствие проникновения через ГЭБ	0.80	0.80	0.60
Всасываемость	0.68	0.68	0.73
Не метаболизируется цитохромами	0.64	0.67	0.50
Индекс лекарственного соответствия	0.73	0.73	0.67

Исходя из данных таблицы 10.16 можно предположить, что все исследованные соединения являются малотоксичными и обладают достаточно надежным профилем безопасности. Установлено, что все 3 изучаемые вещества не должны проникать через гематоэнцефалический барьер. Умеренная всасываемость через ЖКТ для данных субстанций может говорить о незначительном пассивном транспорте и среднем активном транспорте путем переноса их во внутриклеточное пространство посредством транспортеров органических катионов. Также, является благоприятным тот факт, что исследуемые субстанции слабо разрушаются цитохромоксидазами при первичном прохождении через печеночный барьер, что замедляет их метаболизацию и сохраняет действующую концентрацию в организме.

По совокупности параметров, характеризующих лекарственное вещество, соединение PF-04937319 (проходит клинические испытания) обладает достаточно высоким подобием к эталону лекарственного средства по всем показателям ADMET, что отражает адекватность проведенного консенсусного прогноза. Следует также отметить, что рассчитанные средние индексы лекарственного соответствия двух наиболее активных соединений были выше, чем для препарата сравнения.

На основании прогноза токсикологических и фармакокинетических свойств, а также расчета индекса лекарственного соответствия можно заключить, что новые

соединения NP-001 и NP-006 могут использоваться в качестве потенциальных субстанций в доклинических исследованиях.

10.2 Исследование цитотоксических свойств соединений NP-001 и NP-006

В данном разделе показаны результаты методов исследования токсичности, альтернативных классическим тестам на экспериментальных животных, а именно, на моделях с использованием культур клеток *in vitro*. В качестве субстрата использовались перитонеальные макрофаги мышей, как стандартные мишени изучения цитотоксичности, поскольку данные клетки наиболее чувствительны к чужеродным воздействиям на организм; а также неонатальные фибробласты крыс, как колониальные клетки, способные к быстрой пролиферации и дифференцировке, представляющие собой полноценную модель для фундаментальных исследований, а также для поиска и тестирования лекарственных препаратов. В качестве детекции использовался колориметрический МТТ-тест, основанный на способности митохондриальных ферментов жизнеспособных клеток превращать тетразолиевую соль МТТ в ее производное синего формазана. Подробная пробоподготовка и измерение выживаемости клеток описано в материалах и методах (глава 2).

Определение цитотоксичности исследуемых соединений NP-001 и NP-006 (10 мкМ) и препарата сравнения метформина (10 мкМ) на перитонеальных макрофагах мышей представлено на рисунке 10.1, по данным которого можно сделать вывод о том, что жизнеспособность клеток под влиянием субстанции NP-006 достоверно выше по сравнению с положительным контролем ДМСО, когда как для вещества NP-001 и препарата сравнения статистически значимой выживаемости не наблюдалось.

Перитонеальные макрофаги мышей

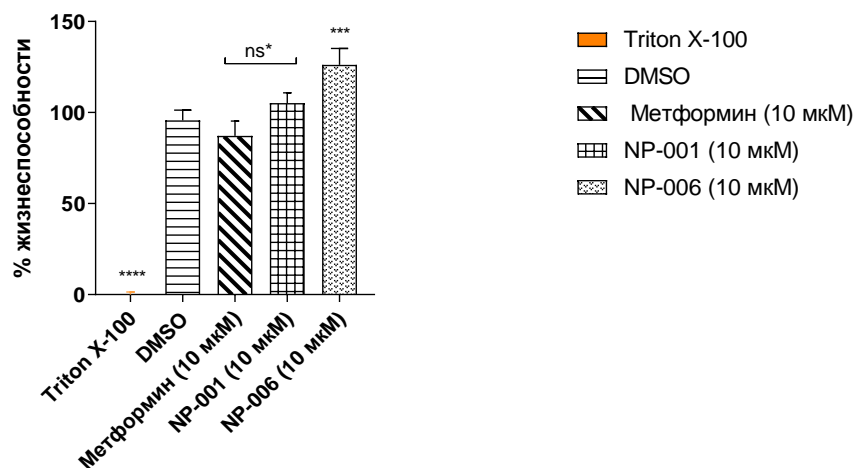


Рисунок 10.1 Влияние соединений NP-001 и NP-006 (10 мкМ) и препарата сравнения метформина (10 мкМ) на жизнеспособность перитонеальных макрофагов мышей в МТТ-тесте. Среднее \pm SD, $n=3$; статистическая значимость по отношению к положительному контролю (DMSO), критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета (** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$); ns* по отношению к положительному контролю (DMSO), критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$).

По данным рисунка 10.2 видно, что статистически достоверной способности к выживанию неонатальных фибробластов сердца крыс под действием соединений NP-001 и NP-006 (10 мкМ) и препарата сравнения метформина (10 мкМ) по отношению к положительному контролю не обнаружено.

Неонатальные фибробласты сердца крыс

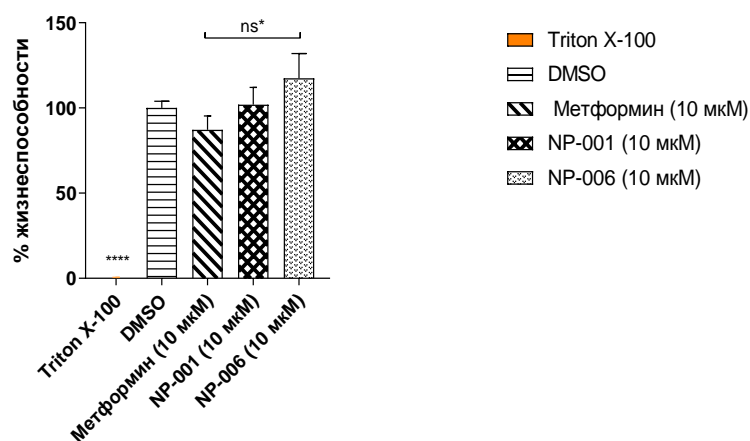


Рисунок 10.2 Влияние соединений NP-001 и NP-006 (10 мкМ) и препарата сравнения метформина (10 мкМ) на жизнеспособность неонатальных фибробластов сердца крыс в МТТ-тесте. Среднее \pm SD, $n=3$; статистическая значимость по отношению к положительному контролю (DMSO), критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета (** $p < 0,0001$); ns* по отношению к положительному контролю (DMSO), критерий 1-way ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$).

Таким образом, обе изучаемые субстанции не проявляют цитотоксических свойств в тестах на культурах клеток. Для соединения NP-001 наблюдался рост выживаемости макрофагов и фибробластов, однако, различия не достигали уровня статистической значимости в сравнении с положительным контролем. В то же время, жизнеспособность перитонеальных макрофагов под влиянием вещества NP-006 достоверно увеличивалась по отношению к ДМСО.

10.3 Изучение острой токсичности соединений при пероральном и интраперитонеальном путях введения

При пероральном введении крысам и мышам соединений NP-001 и NP-006 в токсико-летальных дозах (2 г/кг) наблюдалось снижение двигательной активности в течение первых суток. Гибели животных в течение 2 недель зафиксировано не было. Изменение поведения и реакций животных регистрировали индивидуально, по крайней мере один раз в течение первых 30 минут в течение 24 часов, особое внимание экспериментальным животным уделяли в течение первых 4 часов, а затем ежедневно в течение 14 дней (табл 10.17).

Таблица 10.17 Результаты определения острой токсичности соединений NP-001 и NP-006 при пероральном введении

Соединения	NP-001	NP-006
	LD ₅₀ , мг/кг	
Крысы /самки (n=6)	>2000	>2000
Крысы /самцы (n=6)	>2000	>2000
Мыши /самцы (n=5)	>2000	>2000

При в/б введении мышам исследуемых веществ в дозе (1 г/кг), через 30 минут у животных группы NP-001 наблюдали симптомы раздражения брюшины, снижение двигательной активности и мышечного тонуса, тремор и гибель всех животных данной группы в течение 2 часов на фоне судорог и асфиксии, а при использовании меньших доз наблюдали симптомы раздражения брюшины и

снижение спонтанной двигательной активности. Гибель мышей происходила в зависимости от введенной дозы в течение 2 недель.

В группе животных соединения NP-006 при однократном в/б введении в токсико-летальной дозе (1 г/кг) через 30 мин было отмечено снижение спонтанной двигательной активности. В течение 2 недель гибели животных зафиксировано не было. Введение данного вещества в дозе 2 г/кг также показало 100% выживаемость. Таблица 10.18 Результаты определения острой токсичности соединений NP-001 и NP-006 при в/б введении

Соединения	NP-001	NP-006
	LD ₅₀ , мг/кг	
Мыши /самцы (n=5)	944	>2000

При изучении острой токсичности изучаемых веществ перорально на мышах и крысах было найдено, что значение LD₅₀ для данных веществ составляет более 2000 мг/кг (табл. 10.17). При внутрибрюшинном пути введения соединений NP-001 и NP-006 на мышах было рассчитано значение LD₅₀, которое составляло менее 1000 мг/кг и более 2000 мг/кг соответственно (табл. 10.18). Выявленные значения позволяют отнести изучаемые соединения к 4 классу малотоксичных соединений [И.В. Березовская, 2003]. Для расчета величины токсикологического показателя LD₅₀ использовали пробит-анализ по методу Блисса-Прозоровского [Сергиенко В. И., 2012].

10.4 Заключение

По расчетным оценкам консенсусного прогноза ADMET характеристик соединений NP-001 и NP-006 было установлено, что данные субстанции превосходят препарат сравнения PF-04937319 по всем параметрам лекарственного соответствия, при этом средний индекс подобия обоих веществ составлял 0,73 (против 0,67 у референса). Установлено, что изучаемые вещества не должны проникать через гематоэнцефалический барьер, а также возможно будут умеренно всасываться через ЖКТ и слабо разрушаться цитохромоксидазами при первичном

прохождении через печеночный барьер, что, вероятно, замедлит их метаболизацию и сохранит действующую концентрацию в организме. Вместе с тем выявлено, что данные вещества могут неблагоприятно влиять на печень, почки, нервную и кровяную системы. В соответствии с этим, при планировании доклинических токсикологических исследований, особое внимание следует уделить функциональной активности вышеперечисленных органов и систем.

В ходе изучения цитотоксичности на перитонеальных макрофагах мышей и неонатальных фибробластах крыс было показано, что обе изучаемые субстанции не проявляют цитотоксических свойств. Установлено, что жизнеспособность перитонеальных макрофагов под влиянием вещества NP-006 достоверно увеличивалась по отношению к положительному контролю (ДМСО).

В исследованиях острой токсичности на крысах и мышах было определено, что субстанции NP-001 и NP-006 относятся к 4 классу малотоксичных соединений, что подтверждено данными виртуального прогноза *in silico*.

ГЛАВА 11. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одним из наиболее распространенных хронических заболеваний в мире является сахарный диабет, которым страдают более 425 миллионов человек, при этом сахарный диабет 2 типа (СД2) является преобладающей формой заболевания (90-95% всех пациентов с диабетом), тогда как на долю СД 1 типа приходится около 5-10% всех зарегистрированных случаев болезни [Fujieda H., 2018]. Нарушение гомеостаза глюкозы при СД 2 типа вызвано как снижением секреции инсулина, так и резистентностью к нему. Многие авторы отмечают, что достижение оптимального контроля уровня глюкозы у пациентов с СД2 является сложной задачей. [American Diabetes Association, 2019; Chatterjee S., 2017; DeFonzo R.A., 2013]. Несмотря на то, что для лечения данной патологии доступно большое количество групп препаратов, ни одно лекарственное средство не позволяет достичь длительного контроля уровня глюкозы в крови, кроме того, большинство из них обладают высоким риском гипогликемии и быстрым развитием резистентности. По этой причине, в настоящее время большинство врачей рекомендуют лечение комбинацией противодиабетических средств на ранней стадии расстройства [Charaya N., 2018].

Современные тенденции разработок лекарственных средств для лечения сахарного диабета 2 типа включают пероральные препараты, которые будут не только устранять гипергликемию, стимулировать секрецию инсулина независимо от уровня глюкозы в плазме, но также защитить β -клетки поджелудочной железы от продолжающейся потери их функциональной активности [Laight D., 2014]. В настоящее время большое количество исследований сосредоточено на разработке новых, безопасных и клинически дифференцированных противодиабетических средств, которые можно использовать в качестве монотерапии с улучшенной эффективностью. Результаты исследований, включая клинические данные, продемонстрировали, что активаторы глюкокиназы (ГК) могут стать перспективным направлением в создании лекарственных препаратов для лечения СД2 [Grimsby J., 2003].

Глюкокиназа (ГК), цитоплазматический фермент, который катализирует фосфорилирование глюкозы в глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф), и играет важную роль в регуляции метаболизма глюкозы, поэтому является потенциальной мишенью для лечения пациентов с СД 2 типа [Vella A., 2019]. Недавние исследования показали, что активаторы глюкокиназы могут непосредственно влиять на β -клетки поджелудочной железы, независимо от концентрации глюкозы. Что касается диабета в целом, способность данного класса препаратов к стимуляции секреции инсулина и защиты β -клеток от потери функциональной массы может стать новым подходом к лечению СД 2 типа [Xu J., 2017a].

На данный момент существует 7 активаторов ГК (ГКА), находящиеся на различных стадиях клинических испытаний, которые можно классифицировать на две группы: ГКА двойного действия, которые действуют как на панкреатическую, так и на печеночную глюкокиназу, и селективные печеночные ГКА [Zhu X. X., 2018b]. Недавно разработан препарат под шифром TPP399, который в настоящее время проходит фазу II клинических испытаний, и его механизм действия специфически связан с печеночной глюкокиназой [Vella A., 2019]. Другой изучаемый препарат, Дорзаглиатин (HMS5552), обладает механизмом действия, который считается ГКА двойного действия, поскольку он активирует как ГК в поджелудочной железе, так и в печени [Zhu X. X., 2018]. Наиболее важно то, что в недавних клинических испытаниях эти препараты показали положительные результаты в снижении уровней гемоглобина A_{1c} и поддержании этих уровней, не вызывая гипогликемии, повышения артериального давления и не влияя на изменения как липидов плазмы, так и ферментов печени [Vella A., 2019; Xu J., 2017a; Zhu X. X., 2018].

Широкий спектр молекул, в том числе бензамиды [Singh R., 2017], ацетамиды [Cheruvallath Z. S., 2013], карбоксамиды [Pfefferkorn J. A., 2012], акриламиды [Sidduri A., 2010], бензимидазолы [Ishikawa M., 2009], хиназолины [Iino T., 2009], тиазолы [Hinklin R. J., 2013] и пиримидины [Filipski K. J., 2013] был представлен за последние несколько лет в качестве потенциальных активаторов ГК. Опираясь на вышеописанные данные исследования соединений различных химических групп, а

также на структуры субстанций имеющихся в библиотеке субстанций химических соединений кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО ВолгГМУ, выбор которых был основан на синтетических возможностях партнеров кафедры, был проведен виртуальный скрининг веществ на наличие глюкокиназной активности. В результате было отобрано 154 новых субстанций, из которых было сформировано 14 классов химических структур для анализа перспективности последующего экспериментального изучения производных данных скаффолдов в отношении глюкокиназы.

В первую очередь был создан банк данных по структуре и уровню активности известных активаторов глюкокиназы, на который получено свидетельство о государственной регистрации [Свидетельство, 2016], которое приведено в приложении 1. С целью дальнейшего использования в компьютерных системах прогноза была сформирована база данных по структуре 155 новых соединений (в том числе референсного препарата PF-04937319), являющихся производными 14 скаффолдов.

В ходе подструктурного поиска в банке данных известных структур было найдено 8 из 14 классов химических соединений, включая бензимидазолы, хиначолины и пиримидины. Для 6 исследуемых классов химических структур (дiazепинобензимидазолы, имидазобензимидазолы, бис-пиримидины, тиазолбензимидазолы, триазолопиримидины и пептидомиметики) было впервые спрогнозировано наличие активности в отношении глюкокиназы. В результате консенсусного виртуального скрининга с помощью трех компьютерных систем (ИТ «Микрокосм» (прогноз по стратегиям); Microcosm BioS (прогноз по сходству с эталонами) и методом докинга) было обнаружено, что наиболее активными классами соединений в отношении ГК можно считать производные бифенилоксида, биспиримидина, пиримидина, пиримидина, хиначолина, тиазолидиндиона и тиазолбензимидазола. Также, для препарата сравнения PF-04937319 была получена довольно высокая прогнозная оценка, что подтверждает наличие вышеуказанной активности [Sharma R., 2014] и адекватности проведенного виртуального исследования.

Для создания системы направленного поиска активаторов глюкокиназы среди изучаемых 14 скаффолдов, была построена нейросеть с использованием пяти расчётных оценок, полученных в трех различных системах прогноза, а именно: 3 оценки по консервативной, нормальной и рискованной стратегиям прогноза в ИТ «Микрокосм»; оценка, полученная в Microcosm BioS; оценка, полученная с помощью докинга. По данным чувствительности нейронов искусственной нейронной сети было показано, что к высокоактивным соединениям относятся производные биспиридина (точный критерий Фишера $p < 5 \cdot 10^{-5}$).

На следующем этапе был выполнен скрининг способности 155 новых химических соединений влиять на активность глюкокиназы *in vitro* в концентрации 100 мкМ в сравнении с эталонным веществом PF-04937319, и проведен кластерный анализ экспериментальных значений глюкокиназной активности новых соединений в соответствии с химическим классом вышеуказанных субстанций. По результатам кластеризации к высокоактивным скаффолдам в отношении глюкокиназы относятся производные биспиридина и тиазолобензимидазола. И поскольку наибольшее количество активных соединений было характерно для производных биспиридина, где согласно значениям, полученным по EC_{50} , количество субстанций с высокой ГК-активностью составляло 4 из 5 (80%), для веществ данного класса было проведен анализ структура-активность, эффективность которых зависит от строения линкерного фрагмента следующим образом: S > S-S > S=O > SO₂ > S-S и 2HCl. Можно также предположить, что присутствие солевого компонента снижает количество гидрофобных взаимодействий с сайтом связывания ГК, и, соответственно, активность в отношении данного фермента.

Так как наиболее эффективными соединениями по данным направленного скрининга *in vitro* и значениям EC_{50} были субстанции под шифром NP-001 (33,40 мкМ) и NP-006 (18,56 мкМ против препарата сравнения PF-04937319 $EC_{50}=6,80$ мкМ) из группы биспиридина, был проведен анализ механизма молекулярного взаимодействия субстанций с активным аллостерическим сайтом глюкокиназы, в ходе которого было выяснено, что присоединение к углероду между атомом серы

и пиридиновым циклом полужесткой цепочки с ароматическим гидрофобным заместителем способно существенно увеличить ГК-активирующие свойства вышеуказанных соединений.

На 2 этапе изучалось влияние на углеводный обмен наиболее активных соединений при однократном введении для первичной оценки эффективности периферического влияния субстанций в условиях целого организма. Данное исследование проводилось с помощью перорального теста толерантности к глюкозе (глюкозная нагрузка 2 г/кг) на интактных нелинейных крысах-самцах. В качестве препарата сравнения использовался вилдаглиптин (10 мг/кг). По результатам эксперимента установлено, что из 6 наиболее активных соединений, отобранных по итогам прогнозной оценки и экспериментальной проверки *in vitro*, гипогликемическое действие проявили субстанции NP-001 и NP-006, при этом соответствующий эффект регистрировался только при внутрибрюшинном пути введения. Для вещества NP-006 наблюдалось статистически значимое улучшение толерантности к глюкозе в дозах 300 (площадь под кривой глюкоза-время -21,5% против -20,9% вилдаглиптина) и 500 (площадь под кривой глюкоза-время -37,1% против -30,7% вилдаглиптина) мг/кг (в/б) при однократном введении интактным животным, при этом, не наблюдалось развития гипогликемии. Низкую всасываемость через ЖКТ для данных субстанций можно, предположительно, скорректировать с помощью фармацевтической модификации субстанции в сторону увеличения липофильности.

Поскольку известно, что помимо функционирования в качестве сенсора глюкозы для регуляции секреции инсулина в островках поджелудочной железы, глюкокиназа играет важную роль в пролиферации и апоптозе β -клеток [Terauchi Y., 2007], на 3 этапе было решено изучить новые соединения на модели экспериментального стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета 1 типа у нелинейных мышей-самцов при однократном введении для определения влияния на β -клетки поджелудочной железы.

По данным исследования установлено, что оба исследуемые соединения NP-001 и NP-006 увеличивали пролиферативную активность эндокриноцитов

островков Лангерганса на модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета, что подтверждается морфологическими данными. Для вещества NP-006 отмечалось статистически достоверное увеличение инсулоцитов с восстановлением удельного количества глюкагон-позитивных клеток при введении соединения. Данное вещество незначимо превосходит по пролиферативной активности препарат сравнения – активатор глюकोкиназы - PF-04937319, а также увеличивает количество инсулин-позитивных клеток в 1,86 раз по сравнению с группой животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом 1 типа. Таким образом, результаты вышеописанного эксперимента подтверждают литературные данные, из которых известно, что активаторы ГК увеличивают пролиферацию β -клеток в поджелудочной железе [Nakamura A., 2012; Oh Y. S., 2014; Vella A., 2019]. Также можно ожидать, что полученные результаты приведут к разработке препаратов, улучшающих выживаемость эндогенных β -клеток в условиях сахарного диабета. Подобные средства позволят замедлить прогрессирование и, возможно, вызвать регресс диабета 1 и 2 типа.

Далее, для определения экстрапанкреатического компонента, на 4 этапе исследования изучалась антидиабетическая активность соединений NP-001 и NP-006 при хроническом введении на мышцах-самцах линии C57BL/6J. Данная линия животных подвержена ожирению при нахождении на высокожировой диете (ВЖД), в результате чего быстро развивается резистентность тканей к инсулину, нарушение толерантности к глюкозе, гипогликемия и дислипидемия [Reuter T. Y., 2007], что позволяет использовать вышеуказанную линию мышей для исследования антидиабетических свойств при СД 2 типа.

По результатам изучения влияния соединений NP-001 и NP-006 на уровень глюкозы крови и массу тела мышей DIO-C57bl/6J при хроническом введении установлено, что наиболее выраженный антигипергликемический эффект, сопоставимый с таковым у препарата сравнения метформина, а также значимое снижение массы тела животных к концу 21-дневного введения и в динамике, превосходя данный показатель у референса, оказало соединение NP-006. Вещество

NP-001 незначимо снижало массу тела мышей, однако, не проявило достоверного улучшения толерантности к глюкозе.

Из имеющихся данных изучения влияния исследуемых субстанций на биохимические показатели плазмы крови следует, что и NP-001, и NP-006 и препарат сравнения значительно улучшали чувствительности к инсулину по сравнению с группой СД, где наблюдалась выраженная гиперинсулинемия, а также, судя по показателю НОМА-IR ($2,21 \pm 1,51$ усл. ед, $1,36 \pm 0,64$ усл. ед против $4,93 \pm 1,9$ усл. ед в группе СД), снижали резистентность к данному гормону. В качестве препарата сравнения в данном хроническом исследовании был использован метформин именно из-за его способности снижать инсулинорезистентность тканей, что и было продемонстрировано в ходе изучения соответствующего параметра [Tahrani A. A., 2016].

При изучении висцеральных жировых отложений было обнаружено, что снижение общей массы животных опытных групп, а также препарата сравнения коррелировало с морфометрическими показателями, и осуществлялось, в основном, за счет ретроперитонеальных и мезентериальных жировых депо. Для метоформина не отмечалось значимого снижения веса, как и во многих исследованиях препарата [Tahrani A. A., 2016; Hundal R. S., 2000], а для соединений NP-001 и NP-006 масса ретроперитонеальной жировой ткани снижалась в 1,3 и 1,6 раз соответственно ($p < 0,01$; $p < 0,001$), а масса мезентериального жира достоверно снизилась в 1,1 и 1,5 раз соответственно ($p < 0,01$; $p < 0,001$).

По данным исследования хронической воспалительной реакции при сахарном диабете, для всех исследуемых групп (NP-001, NP-006 и метформин) выявлено достоверное по отношению к группе СД уменьшение доли сегментоядерных нейтрофилов ($27,8 \pm 6,3\%$, $29,3 \pm 4,7\%$ и $26,3 \pm 3,5\%$ против $51,8 \pm 5,8\%$) ($p < 0,0001$), а также статистически значимое восстановление уровня лимфоцитов до нормальных значений в сравнении с группой СД ($64,3 \pm 3,8\%$, $61,4 \pm 5,8\%$ и $67,33 \pm 2,5\%$ соответственно, против $38,25 \pm 3,8\%$) ($p < 0,0001$). В дополнение, показано статистически незначимое снижение уровня палочкоядерных нейтрофилов для всех опытных групп, а под влиянием соединения

NP-001 и рефернса метформина уменьшалась процентная доля эозинофилов, достигая уровня нормы у самцов мышей линии C57BL/6J [Spinelli M. O., 2014]. Все вышеописанное свидетельствует о развившейся патологии (СД 2 типа), а также о положительном терапевтическом влиянии на лейкоциты крови новых субстанций и препарата сравнения при системном воспалении СД 2 типа. Были также получены данные о нарушении звеньев иммунной системы в ходе определения содержания ЦИК в периферической крови под действием изучаемых веществ, где было найдено характерное повышение циркулирующих иммунных комплексов ($17,8 \pm 1,5$ усл. ед) для группы с сахарным диабетом, в группах животных, которые получали соединения NP-001, NP-006 и метформин отмечалось выраженное снижение аналогичного показателя в 2,3, 2,4 и 2,1 раз соответственно ($p < 0,001$). Полученные данные, возможно, отражают увеличение концентрации С-реактивного белка, а совместно со значениями снижения доли лимфоцитов доказывают нарушения иммунных процессов и развитие воспалительного процесса.

В ходе определения липидного профиля мышей DIO-C57bl/6J под влиянием соединений NP-001 и NP-006 установлено, что изучаемые субстанции и метформин не влияют на уровень холестерина и ЛПНП на модели сахарного диабета 2 типа, а также статистически незначимо снижают уровень триглицеридов в плазме крови. Полученные результаты совпадают с обзорами исследований в литературе для активаторов глюкокиназы [Tsumura Y., 2017; Nakamura A., 2008; Futamura M., 2012], когда как для метформина известно, что под его влиянием происходит снижение уровня холестерина и ЛПНП при данной патологии [Hundal R. S., 2000].

В результате проведенных исследований печени установлено, что в группе животных, получавших вещества NP-001 и NP-006, наблюдалось незначимое повышение триглицеридов, что коррелирует с литературными данными изученных активаторов глюкокиназы, при этом нет подтверждения развития стеатоза печени в клинических испытаниях [Leighton B., 2005; Tsumura Y., 2017], а также не регистрировалось внешних патологических изменений печени при аутопсии. По данным содержания гликогена в печени можно заметить недостоверное увеличение соответствующего показателя для группы вещества NP-006, в то время

как соединение NP-001 и препарат сравнения метформин так же незначимо, но снижают концентрацию гликогена в печени. Вышеописанные данные коррелируют со скоростью гликогенолиза, рассчитанной по образованию конечного продукта – лактата.

При регистрации скорости гликолиза с применением субстратов глюкозо-6-фосфат, глюкозо-1-фосфат и фруктозо-1,6-дифосфат существенного статистически значимого влияния на образование конечного продукта в сравнении с контрольной группой сахарного диабета у всех трех опытных групп показано не было, что отражает отсутствие действия соединений NP-001, NP-006 и метформина на такие ключевые ферменты гликолиза как фосфоглюкоизомераза, фосфоглюкомутаза и фосфофруктокиназа. Для оценки активности фермента, участвующего в утилизации глюкозы и играющего главную роль в механизме действия исследуемых субстанций - глюкокиназы, была оценена скорость гликолиза по субстрату «глюкоза» в концентрации 15мМ и, непосредственно, изучение активации ГК в печени в группах животных, получавших вещества NP-001 и NP-006. Полученные результаты характеризуют оба соединения как потенциальные активаторы глюкокиназы, поскольку показана высокая способность увеличивать действие данного фермента, а для соединения NP-006 найдено статистически значимое влияние на соответствующий показатель по отношению к группе СД и интактному контролю, а отсутствие изменений в концентрации лактата в тесте изучения скорости гликолиза может указывать на повышенный синтез гликогена.

Существенное снижение лактата и аланина в печени, а также аланина в плазме крови под влиянием исследуемых соединений предполагает отсутствие «мышечного голодания» и низкую скорость образования глюкозы из вышеуказанных субстратов – ингибирование глюконеогенеза, что также подтверждается данными литературы для данной группы препаратов [Haeusler R. A. et al., 2015]. Для метформина так же показано статистически значимое уменьшение содержание аланина в печени при сопоставлении с животными группы сахарного диабета в 6,4 раза, что говорит о снижении синтеза глюкозы из данной аминокислоты и коррелирует с информацией, полученной из обзоров

исследований глюконеогенеза вышеуказанного производного бигуанидов [Bailey C. J., 2015].

Таким образом, исходя из всего вышеописанного можно сделать вывод о том, что оба исследуемых соединения соответствуют большинству характеристик, выявленных для группы активаторов глюкокиназы. При этом было выявлено соединение-лидер в данном исследовании - NP-006, которое соответствовало таким параметрам группы активаторов ГК как: нормализация показателей гликемии, снижение массы тела, улучшение чувствительности к инсулину, стимулирование гликолиза и синтеза гликогена, ингибирование глюконеогенеза, активирование глюкокиназы и увеличение ТГ печени, не вызывающего внешних патологических изменений печени при аутопсии. Можно также предположить, что выраженный антигипергликемический эффект вышеописанной субстанции, вероятно, был обусловлен повышенным поглощением и метаболизмом глюкозы печенью, и этот дополнительный вклад в гликемическую регуляцию вполне мог снизить метаболический стресс в β -клетках поджелудочной железы и увеличить их пролиферацию.

На 5 этапе было исследовано влияние соединений NP-001 и NP-006 на механизмы развития поздних осложнений сахарного диабета. В патогенезе микрососудистых и макрососудистых осложнений играют роль метаболические, гемодинамические и генетические факторы. Согласно метаболической теории, причиной изменений является длительно существующая гипергликемия и связанные с ней нарушения: неферментное гликозилирование белков, полиоловый путь обмена глюкозы, прямая глюкозотоксичность, оксидантный стресс и изменения в системах коагуляции и фибринолиза [Ярек-Мартынова И. Р., 2004]. В данной работе представлены результаты исследований влияния наиболее активных соединений на такие отдаленные последствия СД как ангиопатия и нарушение коагуляции, окислительный стресс, увеличение тромбогенного потенциала крови и повышенное гликирование белков.

Поскольку известно, что пиридоксин обладает антиоксидантными свойствами [Шилов А. М., 2009], а изучаемые субстанции также являются

производными пиридоксина, можно предположить наличие соответствующей активности у данных веществ. Вещество NP-006 в данном исследовании не проявило какой-либо антирадикальной (АРА) или антиоксидантной (АОА) активности, тогда как NP-001, его аналог с двумя атомами серы, проявил вышеуказанную (АОА) активность в хемилюминесцентной методике окисления люминола, где показало эффект выше препарата сравнения тролокс почти в 4 раза, а также выраженную антирадикальную активность в тесте с ДФПГ ($EC_{50}=78,32\pm 5,71$ мкМ, тролокс $EC_{50}=44,16\pm 11,97$ мкМ). Можно предположить, что проявление выраженного антиоксидантного эффекта у данной субстанции по сравнению с NP-006 связано с дополнительным атомом серы линкерного фрагмента.

Далее было выполнено исследование влияния субстанций NP-001 и NP-006 на образование конечных продуктов гликирования в тесте оценки антигликирующей активности с бычьим альбумином и антигликооксидативных свойств в присутствии меди *in vitro*. Оба изучаемые вещества не показали выраженной антигликооксидативной активности в тесте оценки антигликирования в присутствии меди, а для NP-001 показано умеренное замедление образования КПП, не превышая при этом таковое для препарата сравнения аминоксидина по показателю IC_{50} (1909,9 мкМ против 765,0 мкМ). Субстанция NP-006 не проявила какой-либо активности на данной модели. Когда как в ходе изучения хелатирующих свойств наиболее активных соединений на модели медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты *in vitro* было найдено, что субстанции NP-001 и NP-006 превосходят вещество сравнения в 14,9 и 12,2 раза соответственно.

Согласно данным литературы [Nagai R., 2012], способность соединений проявлять антигликирующую активность коррелируют с их возможностью замедлить процесс аутоокисления аскорбиновой кислоты, вызванного медью, чувствительного к обоим указанным активностям.

Относительно исследуемых веществ, можно выдвинуть предположение, что в их структуре содержатся элементы, определяющие высокую активность в тесте

аутоокисления аскорбиновой кислоты и не имеющие столь сильного влияния в условиях реакционной среды при гликировании. Учитывая способность катионов меди (II) образовывать комплексные соединения с атомами серы различной валентности [York J. T., 2008], можно предположить, что имеющиеся в структуре обоих соединений атомы серы определяют высокую активность в тесте аутоокисления аскорбиновой кислоты. При этом данные субстанции не вносят значимого вклада в варианте гликирования в среде с медью (гликоксидация). Одной из возможных причин подобного может быть то, что в условиях реакционной среды при гликоксидации катионы меди первично взаимодействуют с белком, образуя комплексные соединения с остатками аминокислот, а способность соединений NP-001 и NP-006 отделить катион-катализатор гликирования от белка не является достаточной при данных условиях реакционной среды.

Исследования влияния субстанций NP-001 и NP-006 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную различными агонистами, показали, что оба соединения наиболее активны в модели, где в качестве индуктора выступал АДФ, при этом вещество NP-001 проявило выраженную антиагрегантную активность, превосходя по показателю IC50 препарат сравнения (АСК) в 2 раза, тем самым, оказывая положительное влияние на систему гемостаза при СД, поскольку тромбоциты при СД характеризуются высокой адгезивностью и склонностью к агрегации, что значительно увеличивает тромбогенный потенциал у больных с сахарным диабетом [Северина А. С., Шестакова М. В., 2004].

Исходя из вышеописанных данных было проведена экспериментальная работа по изучению антитромбогенной активности, из которой можно заключить, что в условиях стрептозоцин-индуцированного сахарного диабета на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного 50%-ным раствором FeCl₃, наибольшей антитромботической активностью обладала субстанция NP-001, превышая таковую у препарата сравнения АСК в 1,7 раз. Такое значительное пролонгирование времени образования стабильного тромба в сонной артерии в условиях сахарного диабета, возможно, позволит снизить осложнения со стороны

системы гемостаза, а именно уменьшение тромбогенного потенциала крови и развития эндотелиальной дисфункции.

Таким образом, все вышеперечисленное позволяет предположить наличие у вещества NP-001 положительного влияния на отдаленные последствия сахарного диабета.

Важным этапом при изучении биологических свойств новых соединений является определение токсикологических и фармакокинетических свойств наиболее активных веществ. Для этого, на последнем этапе, были исследованы показатели ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity) *in silico* для исследуемых веществ и препарата сравнения PF-04937319, определение цитотоксичности соединений NP-001 и NP-006 на перитонеальных макрофагах мышей и неонатальных фибробластах сердца крыс, а также изучение параметров острой токсичности (LD₅₀) *in vivo*.

По расчетным оценкам консенсусного прогноза ADMET характеристик соединений NP-001 и NP-006 было установлено, что данные субстанции превосходят препарат сравнения PF-04937319 по всем параметрам лекарственного соответствия, при этом средний индекс подобия обоих веществ составлял 0,73 (против 0,67 у референса). Однако, изучаемые соединения характеризовались неблагоприятным действием на печень, почки, нервную, иммунную и кровяную системы. В связи с этим, при планировании доклинических токсикологических исследований, особое внимание следует уделить функциональной активности вышеперечисленных органов и систем. В исследованиях острой токсичности на крысах и мышах было определено, что субстанции NP-001 и NP-006 относятся к 4 классу малотоксичных соединений, что подтверждено данными виртуального прогноза *in silico*.

В ходе изучения цитотоксичности на перитонеальных макрофагах мышей и неонатальных фибробластах крыс было показано, что обе изучаемые субстанции не проявляют цитотоксических свойств.

Таким образом, на основании литературных данных и собственных экспериментальных исследований можно заключить, что активаторы глюкокиназы

являются перспективным классом соединений для создания препаратов для лечения сахарного диабета 2 типа. Так, по данным консенсусного компьютерного прогноза и направленного скрининга *in vitro*, из изученных 14 классов химических структур, был найден наиболее эффективный скаффолд в отношении ГК - производные биспиридина, а наиболее активными соединениями из этой группы по значениям EC_{50} были субстанции под шифром NP-001 и NP-006. При изучении влияния на углеводный обмен наиболее активных соединений при однократном введении на интактных животных, статистически значимое улучшение толерантности к глюкозе наблюдалось у субстанции под шифром NP-006 в дозах 300 и 500 мг/кг (в/б), при этом, не наблюдалось развития гипогликемии. Также, для данного вещества отмечалось статистически достоверное увеличение инсулоцитов, сопоставимое с таковым по пролиферативной активности у препарата сравнения – активатора глюкокиназы - PF-04937319, на модели сахарного диабета 1 типа при однократном введении. Соединение NP-006, помимо прочего, соответствуют большинству характеристик, присущих для группы активаторов глюкокиназы, выявленных в исследовании антидиабетической активности при хроническом введении на мышцах-самцах линии C57BL/6J, наиболее значимые из которых – выраженный антигипергликемический эффект, достоверное снижение массы тела и значительное улучшение чувствительности к инсулину. Однако, при исследовании влияния на отдаленные последствия СД, наиболее активным было вещество NP-001, которое характеризовалось антирадикальными, хелатирующими, антиагрегантными и антитромбогенными свойствами. В заключительной части исследования было определено, что субстанции NP-001 и NP-006 относятся к 4 классу малотоксичных соединений, что подтверждено данными виртуального прогноза *in silico*. Кроме того, по расчетным оценкам консенсусного прогноза ADMET характеристик был определен высокий средний индекс лекарственного подобия обоих веществ. Таким образом, наиболее перспективным антидиабетогенным профилем обладает соединение NP-006. Оно может быть рекомендовано для дальнейшего изучения и оптимизации для разработки перспективного антидиабетического средства.

ВЫВОДЫ

1. На основании комплексного подхода – виртуального прогноза наличия активности в отношении глюкокиназы и тестирования *in vitro* – показано, что производные бифенила, бифенилоксида, diaзепинобензимидазола, дигидробензофурана, пептидомиметиков, пиридина (в том числе биспиридина), пиримидина, хиназолина, тиазолидиндиона, тиазолбензимидазола и триазолопиримидина являются перспективными химическими классами для поиска активаторов глюкокиназы.
2. По величине гипогликемического эффекта на интактных животных наибольшая активность отмечалась у производных биспиридина – соединения NP-001 и NP-006. Вещество NP-006 при внутрибрюшинном введении в дозах 300 и 500 мг/кг улучшает толерантность к глюкозе у интактных крыс сопоставимо с препаратом сравнения вилдаглиптином в дозе 10 мг/кг.
3. На модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета соединения NP-001 и NP-006 повышали пролиферативную активность эндокриноцитов островков Лангерганса поджелудочной железы мышей при однократном введении в дозе 50 мг/кг. Наиболее выраженный эффект выявлен для соединения NP-006, для которого отмечено увеличение удельного количества инсулин-позитивных клеток, сопоставимое с таковым у соединения сравнения – активатора глюкокиназы PF-04937319 ($43,2 \pm 22,6\%$ против $42,4 \pm 12,1\%$).
4. Соединение NP-006 в дозе 300 мг/кг обладает антидиабетической активностью на модели сахарного диабета 2 типа у мышей DIO-C57BL/6J при 3-х недельном внутрибрюшинном введении. Для вещества отмечалось значительное снижение уровня инсулина плазмы крови ($5,57 \pm 2,6$ мкЕд/мл против $16,3 \pm 2,38$ мкЕд/мл в группе СД), а также снижение инсулинорезистентности по показателю HOMA-IR ($1,36 \pm 0,64$ усл. ед против $4,93 \pm 1,9$ усл. ед в группе СД). Данное вещество обладало выраженной способностью улучшать толерантность к глюкозе, сопоставимой с таковой у

препарата сравнения метформина в дозе 150 мг/кг внутривенно (площадь под кривой глюкоза-время -27,9% против -31,3%). Кроме того, выявлено восстановление синтеза гликогена ($1,85 \pm 0,05$ мМ против $1,52 \pm 0,05$ мМ), ингибирование глюконеогенеза и активирование глюкокиназы печени ($12,1 \pm 3,36$ мЕД/мг белка против $6,79 \pm 2,64$ мЕД/мг белка) по отношению к группе СД.

5. При 21-дневном введении соединения NP-006 мышам линии DIO-C57BL/6J с экспериментальным СД2 показано снижение массы тела животных, которое осуществлялось, в основном, за счет ретроперитонеальных и мезентериальных висцеральных жировых отложений (в 1,6 и 1,5 раз соответственно по сравнению с группой сахарного диабета). В то же время отсутствовало влияние на уровень холестерина и ЛПНП при незначимом снижении содержания триглицеридов в плазме крови.
6. Для субстанции NP-006 отмечалось снижение признаков системного воспалительного процесса на фоне экспериментального сахарного диабета 2 типа. Было показано достоверное восстановление количества сегментоядерных нейтрофилов ($29,3 \pm 4,7\%$ против $51,8 \pm 5,8\%$) и лимфоцитов ($61,4 \pm 5,8\%$ против $38,25 \pm 3,8\%$) по отношению к группе с СД, статистически незначимое снижение уровня палочкоядерных нейтрофилов ($2,67 \pm 1,3\%$ против $4,25 \pm 1,25\%$ у группы с СД), а также выраженное уменьшение содержания циркулирующих иммунных комплексов в 2,4 раза по сравнению с группой СД.
7. В ходе исследования возможного влияния наиболее активных веществ NP-001 и NP-006 на механизмы развития отдаленных последствий СД было выявлено наличие антирадикальной активности для соединения NP-001 в хемилюминесцентной методике окисления люминола, где соединение показало эффект, превосходящий препарат сравнения тролокс (EC_{50} $0,20 \pm 0,001$ мкМ и $5,75 \pm 2,22$ мкМ, соответственно). У крыс с экспериментальным сахарным диабетом соединение NP-001 проявило выраженную антитромботическую активность, пролонгируя время окклюзии

сосуда на $46,7 \pm 6,0\%$ и превосходя препарат сравнения в 1,7 раза. Соединение NP-006 оказалось низкоактивным в вышеуказанных тестах. При этом для обеих субстанций показано выраженное хелатирующее действие на модели медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты *in vitro*, где вещества превзошли вещество сравнения пиоглитазон в 14,9 и 12,2 раза, соответственно.

8. По расчетным оценкам консенсусного прогноза характеристик ADMET, соединения NP-001 и NP-006 превосходят препарат сравнения PF-04937319 по всем параметрам лекарственного подобия, при этом средний индекс подобия обоих веществ составлял 0,73 (против 0,67 у референсного соединения).
9. LD₅₀ соединений NP-001 и NP-006 более 2000 мг/кг на мышах и крысах при пероральном введении. При внутрибрюшинном введении LD₅₀ соединений NP-001 и NP-006 944 мг/кг и более 1000 мг/кг. Изучаемые соединения можно отнести к 4 классу токсичности, что согласуется с данными виртуального прогноза острой токсичности *in silico*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Поиск активаторов глюкокиназы среди соединений – производных биспиридина, в качестве потенциальных средств для коррекции сахарного диабета является перспективным.

Полученные данные о характере молекулярного взаимодействия активных соединений с аллостерическим сайтом ГК в дальнейшем могут быть использованы для направленного конструирования новых активаторов ГК с высокой активностью.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АСК – ацетилсалициловая кислота

АТФ – аденозинтрифосфат

ВЖД – высокожировая диета

Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

ГК – глюкокиназа

ГКА – активаторы глюкокиназы

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДМСО – диметилсульфоксид

ДФПГ - 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил

МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза

КПП – конечные продукты гликирования

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид

НАДН – восстановленная форма кофермента НАД

ПМ - перитонеальные макрофаги

СД2 – сахарный диабет 2 типа

ТГ - триглицериды

ЦИК - циркулирующие иммунные комплексы

ДИО – ожирение, индуцированное высокожировой диетой

ЕС50 – полумаксимальная эффективная концентрация

НОМА-IR - индекс инсулинорезистентности

IC50 – концентрация полумаксимального ингибирования

LD50 – доза, вызывающая гибель 50% животных

STZ – стрептозотоцин

СПИСК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аметов А. С., Демидова Т. Ю., Кочергина И. И. Эффективность препаратов метформина в лечении сахарного диабета 2-го типа // Медицинский совет. – 2016. – №. 3.
2. Аметов А. С. Сахарный диабет 2 типа // Проблемы и решения. М. – 2017.
3. Балаболкин М. И. Роль гликирования белков, окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений при сахарном диабете // Сахарный диабет. – 2002. – №. 4.
4. Березовская И. В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения // Хим.-фарм. журн. — 2003. — Т. 37. — № 3. — С. 32–34.
5. Биззаро Т.Ф. и др. Активаторы глюкокиназы. Патент РФ № 2242469 по заявке: 2001126559/04, от 20.03.2000г.
6. Бильдюг Н.Б., Воронкина И.В., Смагина Л.В., Юдинцева Н.М., Пинаев Г.П. (2015) Матриксные металлопротеиназы в первичной культуре КМЦ. Биохимия, 80(10): 1595–1604.
7. Васильев П. М., Спасов А.А., Кочетков А. Н., Ворфоломеева В.В., Яналиева Л.Р. Консенсусный подход к поиску *in silico* противодиабетических соединений // Мишень-ориентированный поиск антидиабетических средств / под ред. А.А.Спасова, В.И.Петрова. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2016. – 232 с. – Гл. 9. – С. 126-181.
8. Габбасов, З.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов / Габбасов З.А., Попов Е. Г., Гаврилова И. Ю., Позин Е.Я., Маркосян Р. А. // Лабораторное дело. - 1989. - №10. - С.15-18.22.
9. Дедов И. И, Шестакова М. В., Аметов А. С., Анциферов М. и др. Консенсус совета экспертов Российской ассоциации эндокринологов по инициации и интенсификации сахароснижающей терапии у больных сахарным диабетом 2 типа // Сахарный диабет. – 2011. – №. 4.

10. Дедов И.И., Шестакова М. В., Галстян Г.Р. Распространенность сахарного диабета 2 типа у взрослого населения России (исследование NATION) // Сахарный диабет. — 2016. — Т.19. — №2. — С.104-112. doi: 10.14341/DM2004116-17
11. Дедов И. И. Шестакова М. В., Майоров А. Ю., Викулова О. К., и др. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом // Сахарный диабет. — 2017. — №. С.1-112.
12. Дедов И. И., Шестакова, М. В., Викулова, О. К., Железнякова, А. В., Исаков, М. А. Сахарный диабет в Российской Федерации: распространенность, заболеваемость, смертность, параметры углеводного обмена и структура сахароснижающей терапии по данным федерального регистра сахарного диабета, статус 2017 г // Сахарный диабет. — 2018. — Т. 21. — №. 3.
13. Дедов И. И., Мельниченко Г. А., Шестакова М. В.1, Трошина Е. А. и др. Национальные клинические рекомендации по лечению морбидного ожирения у взрослых. 3-ий пересмотр (лечение морбидного ожирения у взрослых) // Ожирение и метаболизм. — 2018. — Т. 15. — №. 1.
14. Добрынина И. Ю., Добрынин Ю. В., Еськов В. М. Нарушения иммунологического статуса, у больных сахарным диабетом типа 2 с различными клиническими вариантами течения, постоянно проживающих в условиях Севера РФ // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). — 2006. — Т. 59. — №. 1.
15. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. Джонс К. Справочник биохимика. — 1991. М.: «МИР»
16. Иванов А. В., Шамшина Д.Д., Литвинов Р. А., Батраков В.В., Иванов А. В. Оптимизация методики медь-зависимого аутоокисления аскорбиновой кислоты. анализ в реальном времени с применением интегральных вычислений // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. — 2018. — №. 2 (66).
17. Корокин М.В., Покровский М.В., Покровская Т.Г., Корокина Л.В. и др. Способ коррекции стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у

крыс с использованием лекарственного средства на основе амида гетероциклических кислот. Патент на изобретение RU 2687979, 17.05.2019. Заявка № 2018109513 от 19.03.2018.

18. Куркин Д. В., Бакулин, Д. А., Волотова, Е. В., Тюренков, И. Н и др. Влияние комбинации агониста рецептора GPR119 с метформином и ситаглиптином на мозговой кровоток, функциональное состояние эндотелия и уровень липидов у животных, содержащихся в условиях высокожировой и калорийной диеты //Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2018. – Т. 17. – №. 2. – С. 71-77.
19. Люсов, В.А. Метод графической регистрации агрегации тромбоцитов и изменения ее при ишемической болезни сердца /В.А. Люсов, Ю.Б. Белоусов //Кардиология. – 1971. - №8. – С.459-461.
20. Озерова И. В., Поварнина П. Ю., Островская Р. У., Гудашева Т. А., Воронина Т. А. и др. Изучение эффекта димерного дипептидного миметика NGF человека на модели диабета у крыс //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76. – №. 5. – С. 10-13.
21. Петров В. И., Недогода С. В., Фролов М. Ю., Саласюк А. С. и др. Сравнительный Клинико-экономический анализ интенсификации терапии базальным инсулином или дапаглифлозином у пациентов с неконтролируемым сахарным диабетом 2-го типа //Фармакоэкономика. Современная фармакоэкономика и фармакоэпидемиология. – 2016. – Т. 9. – №. 1.
22. Руководство по доклиническому исследованию лекарственных средств /Под ред. А.Н. Миронова. – Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. – 944.37.
23. Северина А. С., Шестакова М. В. Нарушение системы гемостаза у больных сахарным диабетом //Сахарный диабет. – 2004. – №. 1.
24. Сергиенко, В. И. Методические рекомендации по статистической обработке результатов доклинических исследований лекарственных средств [Текст] / В. И. Сергиенко, И. Б. Бондарева, Е. И. Маевский // Руководство по проведению

- доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А. Н. Миронов. – Ч.1. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 889–940.
25. Спасов А.А., Косолапов В. А., Бабков Д. А., Майка О. Ю. Влияние агониста рецептора GPR119 соединения MBX-2982 на активность глюкокиназы человека // Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины. 2017. Т. 163. № 5. С. 657.
26. Тюренков И. Н., Куркин Д. В., Волотова Е. В., Бакулин Д. А., Ломкина Е. М. Десять новых мишеней для разработки лекарственных средств для лечения сахарного диабета 2 типа и метаболического синдрома // Сахарный диабет. – 2015. – Т. 18. – №. 1.
27. Филимонов Д. А., Поройков В.В. Прогноз спектра биологической активности органических соединений // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева). – 2006. – Т. 50. – № 2. – С. 66-75.
28. Шамшина Д. Д., Литвинов Р. А. Валидация методики медь-зависимого аутоокисления аскорбиновой кислоты как способа оценки активности соединений, связывающих d-элементы // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2018. – №. 1 (65).
29. Шилов А. М., Авшалумов А. Ш. Препараты с метаболическим действием (Мильгамма, Мильгамма композитум) в комплексном лечении осложнений сахарного диабета (полинейро-и ангиопатии) // Трудный пациент. – 2009. – Т. 7. – №. 11.
30. Ярек-Мартынова И. Р., Шестакова М. В. Сахарный диабет и эндотелиальная дисфункция // Сахарный диабет. – 2004. – №. 2.
31. Agius L. Targeting hepatic glucokinase in type 2 diabetes: weighing the benefits and risks // Diabetes. – 2009. – Vol. 58. – №. 1. – P. 18-20.
32. Alam M. N., Bristi N. J., Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity // Saudi Pharmaceutical Journal. – 2013. – Vol. 21. – №. 2. – P. 143-152.
33. Alexander B., Browse, D. J., Reading, S. J., & Benjamin, I. S. A simple and accurate mathematical method for calculation of the EC50 // Journal of

- pharmacological and toxicological methods. – 1999. – T. 41. – №. 2-3. – С. 55-58.
34. American Diabetes Association 8. Pharmacologic approaches to glycemic treatment: Standards of Medical Care in Diabetes-2018 //Diabetes care. – 2018. – Vol. 41. – №. Suppl 1. – P. S73.
35. American Diabetes Association 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes—2018 //Diabetes care. – 2018. – Vol. 41. – №. Supplement 1. – P. S13-S27.
36. American Diabetes Association 12. Older adults: standards of medical care in diabetes—2019 //Diabetes Care. – 2019. – Vol. 42. – №. Supplement 1. – P. S139-S147.
37. American Diabetes Association. Peripheral arterial disease in people with diabetes //Diabetes care. – 2003. – Vol. 26. – №. 12. – P. 3333-3341.
38. Baig M. R., Shahiwala A., Khan S. A. Sensible Use of Technologies to Increase Solubility and Bioavailability in Formulation Development //Advancements in Bioequivalence & Bioavailability. – 2018. – Vol. 1. – №. 1. – P. 1-4.
39. Bailey C. J. The current drug treatment landscape for diabetes and perspectives for the future //Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2015. – Vol. 98. – №. 2. – P. 170-184.
40. Bailey C. J., Day C. The future of new drugs for diabetes management //diabetes research and clinical practice. – 2019. – P. 107785.
41. Bakulina O. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel derivatives of dithiodiglycolic acid prepared via oxidative coupling of thiols //Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry. – 2019. – Vol. 34. – №. 1. – P. 665-671.
42. Barker S. B., Summerson, W. H. The colorimetric determination of lactic acid in biological material //Journal of Biological Chemistry. – 1941. – Vol. 138. – P. 535-554
43. Baskin, I. I. A neural device for searching direct correlations between structures and properties of chemical compounds [Text] / I. I. Baskin, V. A. Palyulin, N. S. Zefirov // J. Chem. Inf. Comput. Sci. – 1997. – Vol. 37, № 4. – P. 715–721.

44. Bonini M. G., Dull R. O., Minshall R. D. Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants //Berlin: Springer. – 2014. – P. 1343-1363.
45. Bouchard C., Pérusse L. Genetics of obesity //Annual review of nutrition. – 1993. – Vol. 13. – №. 1. – P. 337-354.
46. Bøyum A. Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes //Tissue antigens. – 1974. – Vol. 4. – №. 3. – P. 269-274.
47. Bertram L. S., Black D., Briner P. H., Chatfield R. et al. SAR, pharmacokinetics, safety, and efficacy of glucokinase activating 2-(4-sulfonylphenyl)-N-thiazol-2-ylacetamides: discovery of PSN-GK1 //Journal of medicinal chemistry. – 2008. – Vol. 51. – №. 14. – P. 4340-4345.
48. Briones-Aranda A., Ramírez-Carballo, J., Gómez, B. A. R., Villa, V. M. V., et al. Influence of Bromocriptine Plus Metformin Treatment on Glycaemia and Blood Pressure in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus //Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases. – 2018. – Vol. 25. – №. 1. – P. 59-66.
49. Brunerova L., Rahelić D., Ceriello A., Broz J. et al. Use of oral antidiabetic drugs in the treatment of maturity-onset diabetes of the young: A mini review //Diabetes/metabolism research and reviews. – 2018. – T. 34. – №. 1. – C. e2940.
50. Calle M. C., Fernandez M. L. Inflammation and type 2 diabetes //Diabetes & metabolism. – 2012. – Vol. 38. – №. 3. – P. 183-191.
51. Charaya N., Pandita D., Grewal A. S., Lather V. Design, synthesis and biological evaluation of novel thiazol-2-yl benzamide derivatives as glucokinase activators //Computational biology and chemistry. – 2018. – Vol. 73. – P. 221-229.
52. Chatterjee S., Khunti K., Davies M. J. Type 2 diabetes //The Lancet. – 2017. – Vol. 389. – №. 10085. – P. 2239-2251.
53. Chawla A., Nguyen K. D., Goh Y. P. S. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease //Nature Reviews Immunology. – 2011. – Vol. 11. – №. 11. – P. 738.
54. Cheruvallath Z. S., Gwaltney II S. L., Sabat M., Tang M. et al. Design, synthesis and SAR of novel glucokinase activators //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2013. – Vol. 23. – №. 7. – P. 2166-2171.

55. Clarke M. J. Ruthenium metallopharmaceuticals //Coordination Chemistry Reviews. – 2002. – Vol. 232. – №. 1-2. – P. 69-93.
56. Coghlan M., Leighton B. Glucokinase activators in diabetes management //Expert opinion on investigational drugs. – 2008. – Vol. 17. – №. 2. – P. 145-167.
57. Coope G. J. Atkinson, A. M., Allott, C., McKerrecher, D., Johnstone, C., Pike, K. G., Leighton, B. Predictive blood glucose lowering efficacy by glucokinase activators in high fat fed female Zucker rats //British journal of pharmacology. – 2006. – Vol. 149. – №. 3. – P. 328-335.
58. Deacon C. F., Lebovitz H. E. Comparative review of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and sulphonylureas //Diabetes, Obesity and Metabolism. – 2016. – Vol. 18. – №. 4. – P. 333-347.
59. De Ceuninck F. Kargar, C., Ilic, C., Caliez, A., Rolin, J. O., Umbdenstock, T., Sadlo, M. Small molecule glucokinase activators disturb lipid homeostasis and induce fatty liver in rodents: a warning for therapeutic applications in humans //British journal of pharmacology. – 2013. – Vol. 168. – №. 2. – P. 339-353.
60. DeFronzo R. A., Eldor R., Abdul-Ghani M. Pathophysiologic approach to therapy in patients with newly diagnosed type 2 diabetes //Diabetes care. – 2013. – Vol. 36. – №. Supplement 2. – P. S127-S138.
61. Deshpande A. M., Bhuniya D., De S., Dave B., Vyavahare V. P. et al. Discovery of liver-directed glucokinase activator having anti-hyperglycemic effect without hypoglycemia //European journal of medicinal chemistry. – 2017. – Vol. 133. – P. 268-286.
62. Desouza C. V., Shivaswamy V. Pioglitazone in the treatment of type 2 diabetes: safety and efficacy review //Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes. – 2010. – Vol. 3. – P. CMED. S5372.
63. Dubey R. K., Gillespie D. G., Mi Z., Jackson, E. K. Exogenous and endogenous adenosine inhibits fetal calf serum-induced growth of rat cardiac fibroblasts: role of A2B receptors //Circulation. – 1997. – Vol. 96. – №. 8. – P. 2656-2666.
64. Eiki J., Nagata Y., Futamura M., Sasaki-Yamamoto K. et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of the glucokinase activator MK-0941 in rodent

- models of type 2 diabetes and healthy dogs //Molecular pharmacology. – 2011. – Vol. 80. – №. 6. – P. 1156-1165.
65. Erion D. M., Lapworth A., Amor P. A., Bai G. The hepatoselective glucokinase activator PF-04991532 ameliorates hyperglycemia without causing hepatic steatosis in diabetic rats //PloS one. – 2014. – Vol. 9. – №. 5. – P. e97139.
66. Filipski K. J., Stevens B. D., Pfefferkorn J. A. Glucokinase activators in development //New Strategies for Type. – 2012. – Vol. 2. – P. 88-100.
67. Filipski K. J., Guzman-Perez A., Bian J., Perreault C., et al. Pyrimidone-based series of glucokinase activators with alternative donor–acceptor motif //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2013. – Vol. 23. – №. 16. – P. 4571-4578.
68. Finney, D. J. Probit analysis [Text] / D. J. Finney. – Cambridge: Cambridge University Press, 1971. – 338 p.
69. Fujieda H., Kogami M., Sakairi M., Kato N. et al. Discovery of a potent glucokinase activator with a favorable liver and pancreas distribution pattern for the treatment of type 2 diabetes mellitus //European journal of medicinal chemistry. – 2018. – Vol. 156. – P. 269-294.
70. Furman B. L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats //Current protocols in pharmacology. – 2015. – Vol. 70. – №. 1. – P. 5.47. 1-5.47. 20.
71. Futamura M. et al. An allosteric activator of glucokinase impairs the interaction of glucokinase and glucokinase regulatory protein and regulates glucose metabolism //Journal of Biological Chemistry. – 2006. – Vol. 281. – №. 49. – P. 37668-37674.
72. Futamura M., Yao J., Li X., Bergeron R., Tran J. L. et al. Chronic treatment with a glucokinase activator delays the onset of hyperglycaemia and preserves beta cell mass in the Zucker diabetic fatty rat //Diabetologia. – 2012. – Vol. 55. – №. 4. – P. 1071-1080.
73. Fyfe M. C. T. et al. Glucokinase activator PSN-GK1 displays enhanced antihyperglycaemic and insulinotropic actions //Diabetologia. – 2007. – Vol. 50. – №. 6. – P. 1277.
74. Fyfe M. C. T., Procter M. J. Glucokinase activators as potential antidiabetic agents possessing superior glucose-lowering efficacy //Drugs of the Future. – 2009. – Vol.

34. – №. 8. – P. 641.
75. Glavind, J. Antioxidants in animal tissue [Text] / J. Glavind // Acta chemica scand. – 1963. – Vol. 17, № 6. – P. 1635–1640.
76. GoTo Y., Kakizaki M., Masaki N. Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats // Proceedings of the Japan Academy. – 1975. – Vol. 51. – №. 1. – P. 80-85.
77. Grimsby J. Sarabu, R., Corbett, W. L., Haynes, N. E., Bizzarro, F. T., Coffey, J. W., Marcus, L. Allosteric activators of glucokinase: potential role in diabetes therapy // Science. – 2003. – Vol. 301. – №. 5631. – P. 370-373.
78. Haeusler R. A., Camastra S., Astiarraga B., Nannipieri M. Decreased expression of hepatic glucokinase in type 2 diabetes // Molecular metabolism. – 2015. – Vol. 4. – №. 3. – P. 222-226.
79. Huey R., Morris G. M., Olson A. J., Goodsell D. S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation // Journal of computational chemistry. – 2007. – Vol. 28. – №. 6. – P. 1145-1152.
80. Hale C., Lloyd D. J., Pellacani A., Véniant M. M. Molecular targeting of the GK-GKRP pathway in diabetes // Expert opinion on therapeutic targets. – 2015. – Vol. 19. – №. 1. – P. 129-139.
81. Haynes N. E. et al. Discovery, Structure– Activity Relationships, Pharmacokinetics, and Efficacy of Glucokinase Activator (2 R)-3-Cyclopentyl-2-(4-methanesulfonylphenyl)-N-thiazol-2-yl-propionamide (RO0281675) // Journal of medicinal chemistry. – 2010. – Vol. 53. – №. 9. – P. 3618-3625.
82. Hinklin R. J., Boyd S. A., Chicarelli M. J., Condroski K. R. et al. Identification of a new class of glucokinase activators through structure-based design // Journal of medicinal chemistry. – 2013. – Vol. 56. – №. 19. – P. 7669-7678.
83. Holland, G. F. Hypoglycemic activity in a series of 1-aryl-3-arylsulphonylureas [Text] / G. F. Holland, D. A. Jaeger, R. L. Wagner [et al.] // J. Med. Pharm. Chem. – 1961. – Vol. 3, № 1. – P. 99–110.

84. Holt R. I., Barnett A. H., Bailey C. J. Bromocriptine: old drug, new formulation and new indication. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. – 2010. - №12. – P.1048–1057.
85. Hundal R. S., Krssak M., Dufour S., Laurent, D. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes // *Diabetes*. – 2000. – Vol. 49. – №. 12. – P. 2063-2069.
86. Ishikawa M., Nonoshita K., Ogino Y., Nagae Y. et al. Discovery of novel 2-(pyridine-2-yl)-1H-benzimidazole derivatives as potent glucokinase activators // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2009. – Vol. 19. – №. 15. – P. 4450-4454.
87. Jang E. H., Kim H. K., Park C. S., Kang J. H. Increased expression of hepatic organic cation transporter 1 and hepatic distribution of metformin in high-fat diet-induced obese mice // *Drug metabolism and pharmacokinetics*. – 2010. – Vol. 25. – №. 4. – P. 392-397
88. Jedsadayamata A. In vitro antiglycation activity of arbutin // *Naresuan University Journal: Science and Technology*. – 2013. – Vol. 13. – №. 2. – P. 35-41.
89. Johnson P. R., Hirsch J. Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice // *Journal of lipid research*. – 1972. – Vol. 13. – №. 1. – P. 2-11.
90. Johansson B. B., Irgens H. U., Molnes J., Sztrömwater P. et al. Targeted next-generation sequencing reveals MODY in up to 6.5% of antibody-negative diabetes cases listed in the Norwegian Childhood Diabetes Registry // *Diabetologia*. – 2017. – Vol. 60. – №. 4. – P. 625-635.
91. Jones D. C., Hallyburton I., Stojanovski L., Read K. D. et al. Identification of a κ -opioid agonist as a potent and selective lead for drug development against human African trypanosomiasis // *Biochemical pharmacology*. – 2010. – Vol. 80. – №. 10. – P. 1478-1486.
92. Kamata K., Mitsuya M., Nishimura T., Eiki J. I. et al. Structural basis for allosteric regulation of the monomeric allosteric enzyme human glucokinase // *Structure*. – 2004. – Vol. 12. – №. 3. – P. 429-438.

93. Khomenko T.M., Korchagina D.V., Baev D.S., Vassiliev P.M., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F. Antimicrobial Activity of Substituted Benzopentathiepin-6-amines // *The Journal of Antibiotics (Tokyo)*. – 2019. – Vol. 72. – Iss. 8 – P. 590-599.
94. Kitao N., Nakamura A., Miyoshi H., Nomoto H. et al. The role of glucokinase and insulin receptor substrate-2 in the proliferation of pancreatic beta cells induced by short-term high-fat diet feeding in mice // *Metabolism*. – 2018. – Vol. 85. – P. 48-58.
95. Kondoh Y., Kawase M., Hirata M., Ohmori, S. Carbon sources for D-lactate formation in rat liver // *The Journal of Biochemistry*. – 1994. – Vol. 115. – №. 3. – P. 590-595.
96. Kozlov I. A., Novitskiĭ V. V., Baĭkov A. N. Kinetics of blood leukocytes in mice with alloxan diabetes // *Biulleten'eksperimental'noi biologii i meditsiny*. – 1995. – Vol. 120. – №. 7. – P. 33-35.
97. Krentz A. J. Evolution of Glucose-Lowering Drugs for Type 2 Diabetes: A New Era of Cardioprotection // *Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome*. – Academic Press, 2018. – P. 431-454.
98. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P. D. Analysis of cell viability by the MTT assay // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2018. – Vol. 2018. – №. 6. – P. pdb. prot095505.
99. Kurnianta P. D. M., Suksomboon N. Efficacy and safety of glucokinase activators for type 2 diabetes mellitus: A systematic review. *Pharmaceutical Sciences Asia*. – 2020. – Vol.47. - №.1. - P.1-20.
100. Kurz K.D. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride // *Thrombosis Research*. -1990. -15.- P.269-280.
101. Kwon H. W., Shin J. H., Lim D. H., Ok W. J. et al. Antiplatelet and antithrombotic effects of cordycepin-enriched WIB-801CE from *Cordyceps militaris* ex vivo, in vivo, and in vitro // *BMC complementary and alternative medicine*. – 2016. – Vol. 16. – №. 1. – P. 508.

102. Lago F., Dieguez C., Gómez-Reino J., Gualillo, O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses //Cytokine & growth factor reviews. – 2007. – Vol. 18. – №. 3-4. – P. 313-325.
103. Laight D. The pharmacology of oral antidiabetic agents //Nurse Prescribing. – 2014. – Vol. 12. – №. 12. – P. 604-607.
104. Leighton B., Atkinson A., Coghlan M. P. Small molecule glucokinase activators as novel anti-diabetic agents. – 2005.
105. Iino T., Sasaki Y., Bamba M., Mitsuya M. et al. Discovery and structure–activity relationships of a novel class of quinazoline glucokinase activators //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2009. – Vol. 19. – №. 19. – P. 5531-5538.
106. Lu M., Li P., Bandyopadhyay G., Lagakos W. et al. Characterization of a novel glucokinase activator in rat and mouse models //PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – №. 2.
107. Mangat C.S., Bharat A., Gehrke S. S., Brown E. D. Rank ordering plate data facilitates data visualization and normalization in high-throughput screening // J. Biomol. Screen. - 2014. - Vol. 19. - № 9. - P. 1314–1320
108. Matschinsky F. M. Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy //Nature reviews Drug discovery. – 2009. – Vol. 8. – №. 5. – P. 399.
109. Matschinsky F. M., Porte Jr D. Glucokinase activators (GKAs) promise a new pharmacotherapy for diabetics //F1000 medicine reports. – 2010. – Vol. 2.
110. Matschinsky F. M., Zelent B., Doliba N., Li, C., Vanderkooi J. M. et al. Glucokinase activators for diabetes therapy: May 2010 status report //Diabetes Care. – 2011. – Vol. 34. – №. Supplement 2. – P. S236-S243.
111. McGlasson L., Best L., Brown P. D. The glucokinase activator GKA50 causes an increase in cell volume and activation of volume-regulated anion channels in rat pancreatic β -cells //Molecular and cellular endocrinology. – 2011. – Vol. 342. – №. 1-2. – P. 48-53.
112. Meininger G. E. Scott, R., Alba, M., Shentu, Y., Luo, E., Amin, H., Goldstein, B. J. Effects of MK-0941, a novel glucokinase activator, on glycemic control in insulin-treated patients with type 2 diabetes //Diabetes care. – 2011. – Vol. 34. –

- №. 12. – C. 2560-2566.
113. Meglasson M. D., Matschinsky F. M. Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion //Diabetes/metabolism reviews. – 1986. – Vol. 2. – №. 3-4. – P. 163-214.
114. Min Q. et al. Identification of mangiferin as a potential Glucokinase activator by structure-based virtual ligand screening //Scientific reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 44681.
115. Moller D. E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome //Nature. – 2001. – Vol. 414. – №. 6865. – P. 821.
116. Mosi R., Seguin B., Cameron B., Amankwa L. Mechanistic studies on AMD6221: a ruthenium-based nitric oxide scavenger //Biochemical and biophysical research communications. – 2002. – Vol. 292. – №. 2. – P. 519-529.
117. Muñoz A., Garcia E., Gonzalez D., Zuñiga L. antioxidant activity and in vitro antiglycation of the fruit of *Spondias purpurea* //Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2018. – Vol. 2018.
118. Muoio D. M., Newgard C. B. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes //Nature reviews Molecular cell biology. – 2008. – Vol. 9. – №. 3. – P. 193.
119. Nagai R. et al. Chelation: a fundamental mechanism of action of AGE inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications //Diabetes. – 2012. – Vol. 61. – №. 3. – P. 549-559.
120. Nakamura A., Terauchi, Y., Ohyama, S., Kubota, J., Shimazaki, H., Nambu, T., Kadowaki, T. Impact of small-molecule glucokinase activator on glucose metabolism and β -cell mass //Endocrinology. – 2008. – Vol. 150. – №. 3. – P. 1147-1154.
121. Nakamura A. Togashi, Y., Orime, K., Sato, K., Shirakawa, J., Ohsugi, M., Terauchi, Y. Control of beta cell function and proliferation in mice stimulated by small-molecule glucokinase activator under various conditions //Diabetologia. – 2012. – Vol. 55. – №. 6. – P. 1745-1754.
122. Nakamura A. Takamoto, I., Kubota, N., Ohyama, S., Shimazaki, H., Eiki, J.,

- Terauchi, Y. Impact of Small Molecule Glucokinase Activator on Glucose Metabolism in Response to High-Fat-Diet in Mice with β -Cell Specific Haploinsufficiency of Glucokinase Gene //Diabetes. – 2007. – Vol. 56.
- 123.Nishikimi M., Ozawa T. Stabilization of ascorbate solution by chelating agents that block redox cycling of metal ions //Biochemistry international. – 1987. – Vol. 14. – №. 1. – P. 111-117.
- 124.Nir T., Melton D. a, Dor Y. Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. // J. Clin. Invest. - 2007. - Vol. 117. - № 9. - P. 2553–2561.
- 125.Oh Y. S., Lee Y. J., Park K., Choi H. H. et al. Treatment with glucokinase activator, YH-GKA, increases cell proliferation and decreases glucotoxic apoptosis in INS-1 cells //European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2014. – Vol. 51. – P. 137-145.
- 126.Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction //Analytical biochemistry. – 1979. – Vol. 95. – №. 2. – P. 351-358.
- 127.Osende J. I. et al. Blood thrombogenicity in type 2 diabetes mellitus patients is associated with glycemic control //Journal of the American College of Cardiology. – 2001. – Vol. 38. – №. 5. – P. 1307-1312.
- 128.Ohshita K., Yamane K., Hanafusa M., Mori H. Elevated white blood cell count in subjects with impaired glucose tolerance //Diabetes care. – 2004. – Vol. 27. – №. 2. – P. 491-496.
129. Paczal A., Bálint B., Wéber C., Szabó Z. B., Ondi L. et al. Structure–activity relationship of azaindole-based glucokinase activators //Journal of medicinal chemistry. – 2016. – Vol. 59. – №. 2. – P. 687-706.
- 130.Pihoker C., Gilliam L. K., Ellard S., Dabelea D. et al. Prevalence, characteristics and clinical diagnosis of maturity onset diabetes of the young due to mutations in HNF1A, HNF4A, and glucokinase: results from the SEARCH for Diabetes in Youth //The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2013. – Vol. 98. – №. 10. – P. 4055-4062.

131. Porat S., Weinberg-Corem N., Tornovsky-Babaey S., Schyr-Ben-Haroush R. et al. Control of pancreatic β cell regeneration by glucose metabolism // *Cell metabolism*. – 2011. – Vol. 13. – №. 4. – P. 440-449.
132. Postic C. Shiota, M., Niswender, K. D., Jetton, T. L., Chen, Y., Moates, J. M., Magnuson, M. A. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic β cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – Vol. 274. – №. 1. – P. 305-315.
133. Pfefferkorn J. A., Jeffrey A. Strategies for the design of hepatoselective glucokinase activators to treat type 2 diabetes // *Expert opinion on drug discovery*. – 2013. – Vol. 8. – №. 3. – P. 319-330.
134. Pfefferkorn J. A., Tu M., Filipski K. J., Guzman-Perez A. The design and synthesis of indazole and pyrazolopyridine based glucokinase activators for the treatment of type 2 diabetes mellitus // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2012. – Vol. 22. – №. 23. – P. 7100-7105.
135. Rahman W., Solinsky, P. J., Munir, K. M., Lamos, E. M. Pharmacoeconomic evaluation of sodium-glucose transporter-2 (SGLT2) inhibitors for the treatment of type 2 diabetes // *Expert opinion on pharmacotherapy*. – 2019. – Vol. 20. – №. 2. – P. 151-161.
136. Rees M.G., Gloyn A.L. Small molecular glucokinase activators: has another new anti-diabetic therapeutic lost favour? // *British journal of pharmacology*. – 2013. – Vol. 168. – №. 2. – P. 335-338.
137. Reid S., Masters C. On the developmental properties and tissue interactions of hexokinase // *Mechanisms of ageing and development*. – 1985. – Vol. 31. – №. 2. – P. 197-212.
138. Reuter T. Y. Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes // *Drug Discovery Today: Disease Models*. – 2007. – Vol. 4. – №. 1. – P. 3-8.
139. Rice-Evans, C. Total antioxidant status in plasma and body fluids [Text] / C. Rice-Evans, N. J. Miller // *Methods Enzymol*. – 1994. – Vol. 234, Part D. – P. 278–293.

140. Robey R.B., Hay N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. // *Oncogene*. 2006. - Vol. - 25. P. 4683–4696.
141. Rossmeisl M., Rim J. S., Koza R. A., Kozak L. P. Variation in type 2 diabetes-related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity // *Diabetes*. – 2003. – Vol. 52. – №. 8. – P. 1958-1966.
142. Salt D. SIGMA QUALITY CONTROL TEST PROCEDURE Enzymatic Assay of GLUCOKINASE (EC 2.7.1.2) PRINCIPLE: P. 7–10.
143. Sarabu R. et al. Discovery of piragliatin- first glucokinase activator studied in type 2 diabetic patients // *Journal of medicinal chemistry*. – 2012. – Vol. 55. – №. 16. – P. 7021-7036.
144. Savateev K., Fedotov V., Butorin I., Eltsov O. et al. Nitrothiadiazolo [3, 2-a] pyrimidines as promising antiglycating agents // *European journal of medicinal chemistry*. – 2020. – Vol. 185. – P. 111808.
145. Scheen A. J. Effects of glucose-lowering agents on surrogate endpoints and hard clinical renal outcomes in patients with type 2 diabetes // *Diabetes & metabolism*. – 2019. – Vol. 45. – №. 2. – P. 110-121.
146. Schober E., Rami, B., Grabert, M., Thon, A., Kapellen, T., Reinehr, T., Holl, R. W. Phenotypical aspects of maturity-onset diabetes of the young (MODY diabetes) in comparison with Type 2 diabetes mellitus (T2DM) in children and adolescents: Experience from a large multicentre database // *Diabetic Medicine*. – 2009. – Vol. 26. – №. 5. – P. 466-473.
147. Sharma R., Litchfield J., Atkinson K., Eng H. et al. Metabolites in safety testing assessment in early clinical development: a case study with a glucokinase activator // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2014. – Vol. 42. – №. 11. – P. 1926-1939.
148. Shirakawa J., Togashi Y., Sakamoto E., Kaji M. et al. Glucokinase activation ameliorates ER stress-induced apoptosis in pancreatic β -cells // *Diabetes*. – 2013. – Vol. 62. – №. 10. – P. 3448-3458.

149. Sidduri A., Grimsby J. S., Corbett W. L., Sarabu R. et al. 2, 3-Disubstituted acrylamides as potent glucokinase activators // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2010. – Vol. 20. – №. 19. – P. 5673-5676.
150. Singh R., Lather V., Pandita D., Judge V. et al. Synthesis, docking and antidiabetic activity of some newer benzamide derivatives as potential glucokinase activators // *Letters in Drug Design & Discovery*. – 2017. – Vol. 14. – №. 5. – P. 540-553.
151. Soler-Rivas C., Espín J. C., Wichers H. J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs // *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. – 2000. – Vol. 11. – №. 5. – P. 330-338.
152. Spasov A. A. et al. 6-Nitroazolo [1, 5-a] pyrimidin-7 (4H)-ones as Antidiabetic Agents // *Archiv der Pharmazie*. – 2017. – Vol. 350. – №. 12. – P. 1700226.
153. Spasov A. A., Brel A. K., Litvinov R. A., Lisina S. V. et al. Evaluation of N-Hydroxy-, N-Methoxy-, and N-Acetoxybenzoyl-Substituted Derivatives of Thymine and Uracil as New Substances for Prevention and Treatment of Long-Term Complications of Diabetes Mellitus // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2018. – Vol. 44. – №. 6. – P. 769-777.
154. Spasov A. A., Vassiliev P. M., Anisimova V. A., Zhukovskaya O. N. Antidiabetogenic Features of Benzimidazoles // *Chemistry and Applications of Benzimidazole and its Derivatives*. – IntechOpen, 2019.
155. Spinelli M. O., Motta M. C., Cruz R. J., Godoy, C. M. S. C. Intervalos de referência para alguns parâmetros hematológicos de animais criados e mantidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo // *Acta Scientiarum. Health Sciences*. – Vol. 36. – №. 1. – P. 1-4.
156. Srinivasan K., Viswanad B., Asrat L., Kaul C. L. et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening // *Pharmacol. Res.* — 2005. — Vol. 52, № 4. — P. 313—320

157. Starup-Linde J., Gregersen S., Frost M., Vestergaard P. Use of glucose-lowering drugs and risk of fracture in patients with type 2 diabetes //Bone. – 2017. – Vol. 95. – P. 136-142.
158. Stepanenko A. A., Dmitrenko V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability //Gene. – 2015. – Vol. 574. – №. 2. – P. 193-203.
159. Stolovich-Rain M., Hija A., Grimsby J., Glaser B., Dor Y. Pancreatic beta cells in very old mice retain capacity for compensatory proliferation // J. Biol. Chem. 2012. - Vol. 287. - № 33. - P. 27407–27414.
160. Surwit R. S., Wang S., Petro A. E., Sanchis D., et al. Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – Vol. 95. – №. 7. – P. 4061-4065.
161. Tahrani A. A., Barnett A. H., Bailey C. J. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus //Nature Reviews Endocrinology. – 2016. – Vol. 12. – №. 10. – P. 566.
162. Takamoto I., Terauchi Y., Kubota N., Ohsugi M. et al. Crucial role of insulin receptor substrate-2 in compensatory β -cell hyperplasia in response to high fat diet-induced insulin resistance //Diabetes, Obesity and Metabolism. – 2008. – Vol. 10. – P. 147-156.
163. Tao X., Fan J., Kao G., Zhang X., Su L., Yin Y., Zrenner B. Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced signalling associated with activation of a tyrosine phosphatase in Sprague-Dawley rats cardiac fibroblasts, Biology of the cell 106 (2014) 182-192.
164. Terauchi Y., Takamoto I., Kubota N., Matsui J. et al. Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory β cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance //The Journal of clinical investigation. – 2007. – Vol. 117. – №. 1. – P. 246-257.
165. Tibullo D., Volti G. L., Giallongo C., Grasso S., et al. Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity,

- molecular pathways and therapeutic potential // *Inflammation Research*. – 2017. – Vol. 66. – №. 11. – P. 947-959.
166. Tong P. C., Lee K. F., So W. Y., Ng M. H. White blood cell count is associated with macro-and microvascular complications in Chinese patients with type 2 diabetes // *Diabetes care*. – 2004. – Vol. 27. – №. 1. – P. 216-222.
167. Torres T. Restoration of Hepatic Glucokinase Expression Corrects Hepatic Glucose Flux and Normalizes Plasma Glucose in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Diabetes*, vol. 58. 2009.
168. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading // *J. Comp. Chem.* – 2010. – Vol. 31. – Iss. 2. – P. 455-461.
169. Tsumura Y., Tsushima Y., Tamura A., Hasebe M. et al. TMG-123, a novel glucokinase activator, exerts durable effects on hyperglycemia without increasing triglyceride in diabetic animal models // *PloS one*. – 2017. – Vol. 12. – №. 2. – P. e0172252.
170. Ueno H., Tsuchimochi W., Wang H. W., Yamashita E. et al. Effects of miglitol, acarbose, and sitagliptin on plasma insulin and gut peptides in type 2 diabetes mellitus: a crossover study. *Diabetes Ther.* – 2015. - №6. – P.87–196.
171. Valdés-Ramos R., Ana Laura G. L., Beatriz Elina M. C., Alejandra Donaji B. A. Vitamins and type 2 diabetes mellitus // *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*. – 2015. – Vol. 15. – №. 1. – P. 54-63.
172. Vassiliev P.M., Spasov A.A., Kosolapov V.A., Kucheryavenko A.F., Gurova N.A., Anisimova V.A. Consensus Drug Design Using IT Microcosm // *Application of Computational Techniques in Pharmacy and Medicine* / Eds. L. Gorb, V. Kuz'min, E. Muratov / *Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics* / Ed. J. Leszczynski. – Vol. 17. – Dordrecht (Netherlands): Springer Science + Business Media, 2014. – 550 p. – P. 369-431.

173. Vella A., Freeman J. L., Dunn I., Keller K. et al. Targeting hepatic glucokinase to treat diabetes with TTP399, a hepatoselective glucokinase activator //Science translational medicine. – 2019. – Vol. 11. – №. 475. – P. eaau3441.
174. Vieira-Potter, V. J. Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. Cell. Microbiol. 16, 1484–1492 (2014).
175. Villarreal F. J., Kim N. N., Ungab G. D., Printz M. P. et al. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts //Circulation. – 1993. – Vol. 88. – №. 6. – P. 2849-2861.
176. Wei, M., Wei, L. Ong, M.T. Smith, F.B. Ross, K. Schmid, A.J. Hoey, D. Burstow, L. The Streptozotocin-Diabetic Rat as a Model of the Chronic Complications of Human Diabetes /. Brown // Heart, Lung and Circulation – 2003. – Vol. 12. – P. 44–50.
177. Wei P., Shi M., Barnum S., Cho H., Carlson T. et al. Effects of glucokinase activators GKA50 and LY2121260 on proliferation and apoptosis in pancreatic INS-1 beta cells //Diabetologia. – 2009. – Vol. 52. – №. 10. – P. 2142-2150.
178. Winzell M. S., Ahrén B. The high-fat diet–fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes //Diabetes. – 2004. – Vol. 53. – №. suppl 3. – P. S215-S219.
179. Xu J., Lin S., Myers R. W., Addona G. et al. Novel, highly potent systemic glucokinase activators for the treatment of Type 2 Diabetes Mellitus //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2017a. – Vol. 27. – №. 9. – P. 2069-2073.
180. Xu J., Lin S., Myers R. W., Trujillo. Discovery of orally active hepatoselective glucokinase activators for treatment of Type II Diabetes Mellitus //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2017b. – Vol. 27. – №. 9. – P. 2063-2068.
181. Yamagishi S., Matsui T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy //Oxidative medicine and cellular longevity. – 2010. – Vol. 3. – №. 2. – P. 101-108.
182. York J. T., Bar-Nahum I., Tolman W. B. Copper–sulfur complexes supported by N-donor ligands: Towards models of the CuZ site in nitrous oxide reductase

- //Inorganica chimica acta. – 2008. – Vol. 361. – №. 4. – P. 885-893.
183. Younk L. M., Mikeladze M., Davis S. N. Pramlintide and the treatment of diabetes: a review of the data since its introduction //Expert Opin. Pharmacother. – 2011. - №12. – P.1439–1451.
184. Chen Y., Fan J., Cao L., Han et al. Unique mechanistic insights into the beneficial effects of angiotensin-(1-7) on the prevention of cardiac fibrosis: A metabolomic analysis of primary cardiac fibroblasts //Experimental cell research. – 2019. – Vol. 378. – №. 2. – P. 158-170.
185. Zefirov, N. S. Fragmental approach in QSPR [Text] / N. S. Zefirov, V. A. Palyulin // J. Chem. Inf. Comput. Sci. – 2002. – Vol. 42, № 5. – P. 1112–1122.
186. Zhang P., Su J., King M. E., Maldonado A. E. et al. Regulator of G protein signaling 2 is a functionally important negative regulator of angiotensin II-induced cardiac fibroblast responses //American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2011. – Vol. 301. – №. 1. – P. H147-H156.
187. Zhi J., Zhai S. Effects of piragliatin, a glucokinase activator, on fasting and postprandial plasma glucose in patients with type 2 diabetes mellitus //The Journal of Clinical Pharmacology. – 2016. – Vol. 56. – №. 2. – P. 231-238
188. Zhi J., Zhai S., Boldrin M. Dose-Dependent Effect of Piragliatin, a Glucokinase Activator, on the QT Interval Following Short-Term Multiple Doses in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus //Clinical pharmacology in drug development. – 2017. – Vol. 6. – №. 3. – P. 258-265.
189. Zhu D., Gan S., Liu Y., Ma J. et al. Dorzagliatin monotherapy in Chinese patients with type 2 diabetes: a dose-ranging, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study //The Lancet Diabetes & Endocrinology. – 2018. – Vol. 6. – №. 8. – P. 627-636.
190. Zhu X. X., Zhu D. L., Li X. Y., Li Y. L. et al. Dorzagliatin (HMS5552), a novel dual-acting glucokinase activator, improves glycaemic control and pancreatic β -cell function in patients with type 2 diabetes: A 28-day treatment study using biomarker-guided patient selection //Diabetes, Obesity and Metabolism. – 2018. – Vol. 20. – №. 9. – P. 2113-2120.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2016621022

Активаторы глюкокиназы

Правообладатель: *Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Васильев Павел Михайлович (RU), Спасов Александр Алексеевич (RU), Майка Ольга Юрьевна (RU), Ворфоломеева Виктория Викторовна (RU), Яналиева Лаура Рифатовна (RU)*


Заявка № **2016620206**

Дата поступления **04 марта 2016 г.**

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных **26 июля 2016 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 **Г.П. Ившин**

