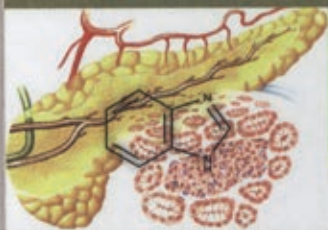


# АНТИДИАБЕТОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ БЕНЗИМИДАЗОЛОВ:

*химия,  
фармакология,  
клиника*



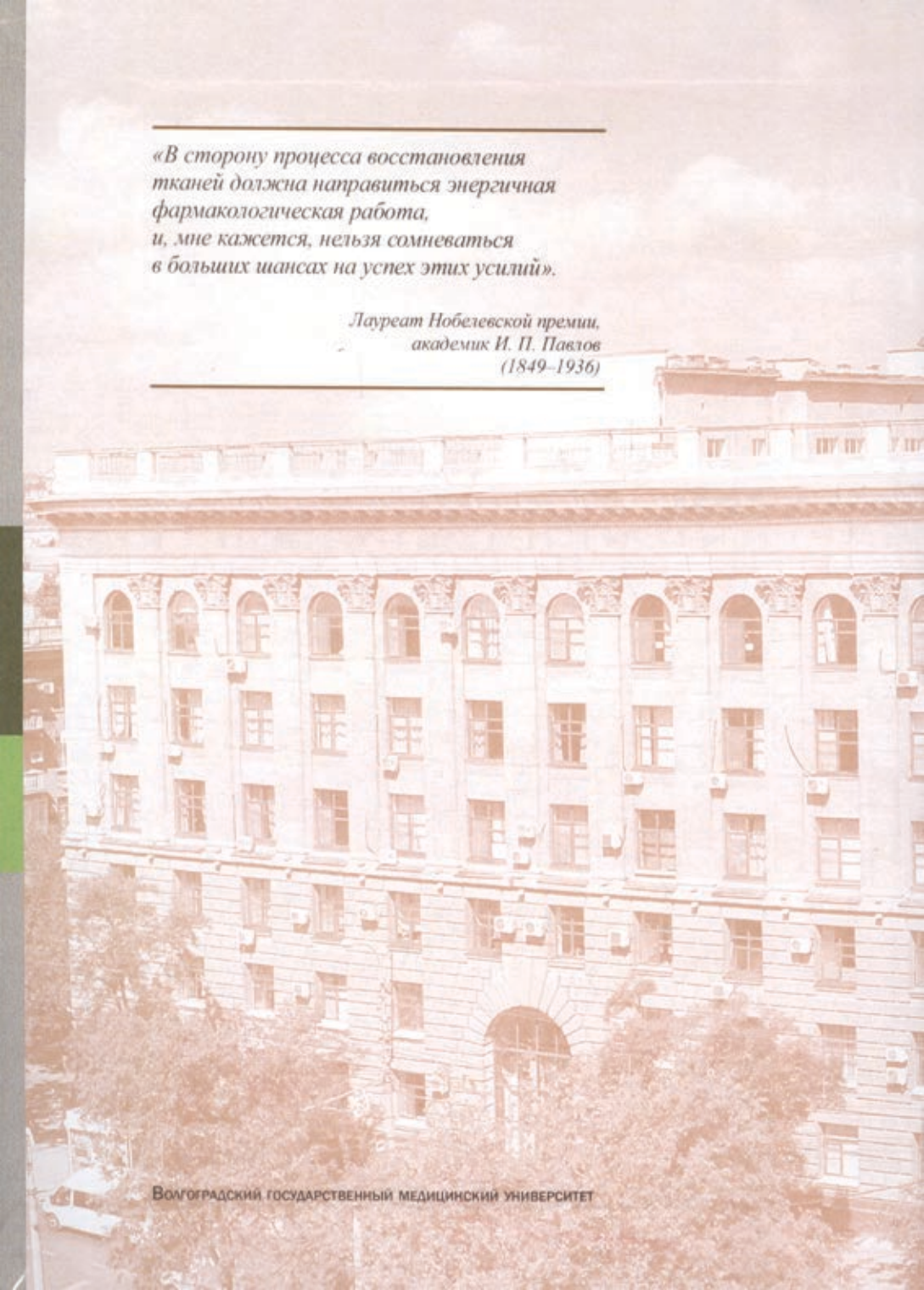
*Волгоград, 2016*

---

*«В сторону процесса восстановления тканей должна направиться энергичная фармакологическая работа, и, мне кажется, нельзя сомневаться в больших шансах на успех этих усилий».*

*Лауреат Нобелевской премии,  
академик И. П. Павлов  
(1849–1936)*

---



Волгоградский государственный медицинский университет



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

**АНТИДИАБЕТОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ  
БЕНЗИМИДАЗОЛОВ:  
ХИМИЯ, ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИКА**

*Монография*

*Под редакцией*

*академика РАН А. А. Спасова,  
академика РАН В. И. Петрова,  
академика РАН В. И. Минкина*



Волгоград, 2016



MINISTRY OF HEALTHCARE  
OF THE RUSSIAN FEDERATION

VOLGOGRAD STATE  
MEDICAL UNIVERSITY

**ANTIDIABETOGENIC POTENTIAL  
OF BENZIMIDAZOLES:  
CHEMISTRY, PHARMACOLOGY, CLINICS**

*Monograph*

*Edited by:*

*RAS Academician A. A. Spasov,*

*RAS Academician V. I. Petrov,*

*RAS Academician V. I. Minkin*



Volgograd, 2016

УДК 615.011:615.015

ББК 52.8

А 721

### Рецензенты:

зав. кафедрой аналитической, физической химии и физико-химии полимеров,  
президент ВолгГТУ, академик РАН *И. А. Новаков*;  
зав. кафедрой клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней  
Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова,  
заслуженный деятель науки РФ, академик РАН *В. Г. Кукес*;  
зав. кафедрой фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ,  
чл.-кор. РАН, профессор *И. Н. Тюренков*

### Авторы:

А. А. Спасов (предисловие, введение, гл. 1, 2, 4, 5–11, 13–16, заключение);  
В. И. Петров (гл. 1, 16); С. В. Недогода (гл. 16); Г. П. Дудченко (гл. 4–6);  
П. М. Васильев (гл. 2, 4); М. П. Воронкова (гл. 5, 16); Г. Л. Снигур (гл. 7–9);  
А. Ф. Кучерявенко (гл. 10); Л. В. Науменко (гл. 11); Л. И. Бугаева (гл. 15);  
Л. А. Смирнова (гл. 13); В. А. Анисимова (гл. 2–4); Н. И. Чепляева (гл. 1, 6–9);  
К. В. Ленская (гл. 1, 2, 4, 6, 7, 10); О. Н. Жуковская (гл. 3); Т. А. Кузьменко (гл. 3);  
П. А. Галенко-Ярошевский (гл. 12); А. В. Тегай (гл. 12); В. Н. Анисимов (гл. 14);  
М. А. Забежинский (гл. 14); И. Г. Попович (гл. 14);  
И. Н. Алимова (гл. 14); П. А. Егормин (гл. 14)

---

*Издание одобрено и рекомендовано к печати Ученым советом ФГБОУ ВПО ВолгГМУ,  
Ученым советом ФГОУ ВПО ЮФУ*

**А 721 Антидиабетогенный потенциал бензимидазолов: химия, фармакология, клиника: монография / Под ред. акад. РАН А. А. Спасова; акад. РАН В. И. Петрова, акад. РАН В. И. Минкина. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2016. – 548 с.**

**ISBN 978-5-9652-0425-0**

В монографии рассматриваются современные вопросы патогенеза сахарного диабета 2-го типа и основные направления поиска и создания лекарственных средств для лечения данной патологии.

В книге подведены итоги совместной работы исследователей Волгоградского государственного медицинского университета и Южного федерального университета по синтезу новых производных бензимидазола, изучению их антидиабетогенных свойств. Отдельные главы посвящены компьютерным технологиям оптимизации скрининга веществ, проявляющих сахароснижающее действие, подробному доклиническому изучению антидиабетогенных свойств, механизма действия, возможным мультитаргетным свойствам, фармакокинетике, токсикологическим эффектам. Специальная глава посвящена результатам клинических исследований препарата «Диабенол». Монография предназначена для специалистов в области медицинской химии, фармакологии, экспериментальной и клинической диабетологии, аспирантов и студентов фармацевтических, медицинских и биологических факультетов вузов.

**УДК 615.011:615.015**

**ББК 52.8**

**ISBN 978-5-9652-0425-0**

© Волгоградский государственный  
медицинский университет, 2016  
© Издательство ВолгГМУ, 2016

UDK 615.011:615.015  
BBK 52.8  
A 721

### Reviewers:

- I. A. Novakov, President of the Volgograd State Technical University, RAS Academician, head of the Analytical, Physical, and Polymer Physico-Chemistry Department;  
V. G. Kukes, RAS Academician, Honored Scientist of Russia, head of the Clinical Pharmacology and Propaedeutic of Internal Diseases Department of the I.M. Sechenov First Moscow State Medical University;  
I. N. Tyurenkov, RAS Corresponding Member, professor, head of the Pharmacology and Biopharmacy Department of the Volgograd State Medical University

### Authors:

- A. A. Spasov (preface, introduction, chapters 1, 2, 4, 5–11, 13–16, conclusion);  
V. I. Petrov (chapters 1, 16); S. V. Nedogoda (chapter 16); G. P. Dudchenko (chapters 4–6);  
P. M. Vasil'ev (chapters 2, 4); M. P. Voronkova (chapters 5, 16); G. L. Snigur (chapters 7–9);  
A. F. Kucheryavenko (chapter 10); L. V. Naumenko (chapter 11); L. I. Bugaeva (chapter 15);  
L. A. Smirnova (chapter 13); V. A. Anisimova (chapters 2–4); N. I. Cheplyaeva (chapters 1, 6–9);  
K. V. Lenskaya (chapters 1, 2, 4, 6, 7, 11); O. N. Zhukovskaya (chapter 3);  
T. A. Kuzmenko (chapter 3); P. A. Galenko-Yaroshevskiy (chapter 12); A. V. Tegay (chapter 12);  
V. N. Anisimov (chapter 14); M. A. Zabezhinskiy (chapter 14); I. G. Popovich (chapter 14);  
I. N. Alimova (chapters 14); P. A. Egormin (chapters 14)

---

*Approved and recommended for publication by VolgSMU Academic Council,  
SFU Academic Council*

**A 721 Antidiabetogenic Potential of Benzimidazoles: Chemistry, Pharmacology, Clinics / Edited by RAS Academician A. A. Spasov, RAS Academician V. I. Petrov, RAS Academician V. I. Minkin. – Volgograd: VolgSMU Publishing, 2016. – 548 p.**

**ISBN 978-5-9652-0425-0**

The book addresses current issues of the pathogenesis of type 2 diabetes and the main directions of search and development of drugs for the treatment of this pathology.

The book summed up the results of joint work of researchers from Volgograd State Medical University and Southern Federal University on the synthesis of novel benzimidazole derivatives and study of their antidiabetogenic properties. Several chapters are devoted to computer technologies aiming to optimize screening of glucose-lowering substances, a detailed study of preclinical evaluation of antidiabetogenic properties, mechanism of action, possible multitarget actions, pharmacokinetics, and toxicological effects. A special chapter discuss the results of clinical trials of the drug diabenol. The monograph is intended for specialists in the field of medicinal chemistry, pharmacology, experimental and clinical diabetology, and students of pharmaceutical, medical and biological university faculties.

**UDK 615.011:615.015**

**BBK 52.8**

© Volgograd State  
Medical University, 2016  
© VolgSMU Publishing, 2016

**ISBN 978-5-9652-0425-0**

# ОГЛАВЛЕНИЕ

---

Список сокращений.....	20
Предисловие.....	23
Введение.....	26
ГЛАВА 1	
Фундаментальные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа	
<i>Петров В. И., Спасов А. А., Чепляева Н. И., Ленская К. В.</i> .....	30
1.1. Нормализация механизмов биологического действия инсулина и снижение инсулиновой резистентности.....	32
1.2. Восстановление физиологических механизмов секреции инсулина.....	35
1.3. Соединения, снижающие продукцию глюкозы печенью.....	39
1.4. Препараты на основе моноклональных антител в терапии сахарного диабета.....	41
1.5. Препараты с различными механизмами действия.....	42
ГЛАВА 2	
Антидиабетогенный потенциал производных бензимидазола	
<i>Спасов А. А., Ленская К. В., Васильев П. М., Анисимова В. А.</i> .....	45
ГЛАВА 3	
Синтез производных бензимидазола и конденсированных систем на его основе	
<i>Анисимова В. А., Жуковская О. Н., Кузьменко Т. А.</i> .....	56
3.1. Синтез 1-замещенных-2-бензиламинобензимидазолов с метоксигруппами в фенильном кольце .....	56
3.2. Синтез хлоридов 1- $R_1$ -3-( $NR_2R_3$ -ацетамидо)-2- аминобензимидазолия.....	61
3.3. Синтез 3-(ароил)- и 3- (гетароил)имидазо- [1,2-а]бензимидазолов.....	62
3.4. 9-Замещенные 2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы.....	67
3.5. Синтез 1-аминоэтил-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолов...	77

3.6. Синтез 1- и 10-N-замещенных 1(10),2,3,4-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолов.....	81
3.7. Синтез 10-алкиламиноэтил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолов.....	86
3.8. Синтез N-ацилметилзамещенных 9H-2,3-дигидроимидазо- и 10H-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолов и продуктов их восстановления.....	91
3.9. Синтез ароилметилзамещенных трициклических бензимидазольных систем, содержащих гидроксигруппы в ароильном радикале.....	97
3.10. Синтез амидов 2,3-дигидроимидазо- и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолил N-уксусных кислот...	102
3.11. Синтез 2-алкил-4-диалкиламиноалкил-1,2,4-триазоло-[1,5-а]бензимидазолов.....	103
<b>ГЛАВА 4</b>	
<b>Направленный поиск соединений, снижающих содержание сахара в крови</b>	
<i>Васильев П. М., Спасов А. А., Дудченко Г. П., Ленская К. В., Анисимова В. А.</i> .....	106
4.1. Влияние производных бензимидазола на уровень глюкозы в крови крыс.....	106
4.2. Планирование <i>in silico</i> скрининга и экспериментальное изучение гипогликемических свойств производных бензимидазола.....	113
4.3. Подструктурный анализ гипогликемической активности производных бензимидазола.....	119
4.4. Анализ перспективности химических классов производных бензимидазола методом медианных и супремальных оценок.....	123
4.5. Подструктурный анализ уровня гипогликемической активности в ряду N <sup>9</sup> -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолов.....	128
4.6. Частотный анализ физико-химических параметров производных N <sup>9</sup> -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола с различным уровнем гипогликемической активности.....	132
4.7. Анализ <i>in silico</i> по показателям ADME перспективности изучения гипогликемических свойств соединения диабенол.....	138
4.8. Экспериментальное изучение гипогликемических свойств соединения диабенол.....	144



4.9. Изучение сахароснижающего эффекта диабенола при внутривенной глюкозной нагрузке на интактных крысах.....	147
4.10. Заключение.....	149
<b>ГЛАВА 5</b>	
Антидиабетогенные свойства соединения диабенол	
<i>Спасов А. А., Дудченко Г. П., Воронкова М. П.</i> .....	151
5.1. Изучение гипогликемического действия диабенола на животных с нарушенной толерантностью к глюкозе.....	152
5.1.1. Действие диабенола на содержание глюкозы в крови животных с латентной формой стрептозотоцинового диабета.....	153
5.1.2. Оценка эффективности диабенола у крыс с экзогенной гиперинсулинемией.....	155
5.1.3. Исследования на животных с экспериментальным ожирением.....	157
5.2. Исследование действия диабенола на животных с экспериментальным сахарным диабетом.....	159
5.3. Влияние диабенола на животных с острой инсулиновой недостаточностью.....	161
5.4. Влияние диабенола на сахароснижающее действие экзогенно введенного инсулина.....	162
5.5. Заключение.....	165
<b>ГЛАВА 6</b>	
Изучение механизма антидиабетогенного действия диабенола	
<i>Спасов А. А., Дудченко Г. П., Чепляева Н. И., Ленская К. В.</i> .....	166
6.1. Влияние соединения диабенол на секрецию инсулина.....	168
6.2. Влияние диабенола на утилизацию глюкозы периферическими тканями.....	172
6.3. Действие диабенола на сахароснижающую активность инсулина..	174
6.4. Действие диабенола на некоторые показатели углеводного обмена..	176
6.5. Влияние диабенола на активность дипептидил пептидазы 4 (ДПП-4) при стрептозотоциновом сахарном диабете.....	180
6.6. Действие диабенола на всасывание углеводов в кишечнике.....	186
6.7. Заключение.....	188
<b>ГЛАВА 7</b>	
Антидиабетогенное действие диабенола при стрептозотин-никотинамидной интоксикации крыс	
<i>Снигур Г. Л., Спасов А. А., Чепляева Н. И., Ленская К. В.</i> .....	190

7.1. Влияние диабенола на морфофункциональные особенности панкреатических островков при стрептозотоцин-никотинамидном диабете.....	196
7.2. Заключение.....	203
ГЛАВА 8	
Мультиаргетная терапия сахарного диабета 2-го типа	
<i>Спасов А. А., Чепурнова М. В., Чепляева Н. И., Снизгур Г. Л.</i> .....	205
8.1. Научные подходы к комбинированной фармакотерапии сахарного диабета типа 2.....	207
8.2. Антидиабетическая активность комбинаций диабенола и метформина, диабенола и глибенкламида.....	217
8.3. Заключение.....	232
ГЛАВА 9	
Окислительный стресс при сахарном диабете и пути его фармакологической коррекции	
<i>Спасов А. А., Чепляева Н. И., Снизгур Г. Л.</i> .....	234
9.1. Источники свободных радикалов при сахарном диабете.....	235
9.2. Роль свободных радикалов в прогрессировании дисфункции $\beta$ -клеток и инсулинрезистентности.....	241
9.3. Антиоксиданты в терапии сахарного диабета.....	246
9.4. Антидиабетические свойства комбинации диабенола и альфа-липоевой кислоты.....	253
9.5. Заключение.....	272
ГЛАВА 10	
Антитромбогенное действие диабенола	
<i>Спасов А. А., Кучерявенко А. Ф., Ленская К. В.</i> .....	274
10.1. Действие диабенола на агрегацию тромбоцитов.....	275
10.2. Антитромботическое действие диабенола на различных моделях артериальных тромбозов.....	279
10.3. Влияние диабенола на время кровотечения.....	287
10.4. Влияние диабенола на рецепторные механизмы агрегации тромбоцитов.....	289
10.5. Действие диабенола на баланс простаглицина и тромбоксана (ТХА <sub>2</sub> ) в организме крыс.....	292
10.6. Влияние диабенола на уровень кальция в тромбоцитах животных.....	296

10.7. Влияние диабенола на тромбоцитарно-сосудистый гемостаз при аллоксановом диабете.....	300
10.8. Заключение.....	305
<b>ГЛАВА 11</b>	
Исследование влияния диабенола на гемореологические показатели крови	
<i>Спасов А. А., Науменко Л. В.</i> .....	307
11.1. Влияние диабенола и препарата сравнения пентоксифиллина при однократном введении на реологические свойства крови крыс с синдромом гипервязкости.....	309
11.2. Влияние диабенола и препарата сравнения гликлазида при семидневном внутрижелудочном введении на реологические свойства крови крыс с синдромом гипервязкости.....	311
11.3. Действия диабенола на реологические свойства и гемостаз крови доноров и больных сахарным диабетом (опыты <i>in vitro</i> ).....	313
11.4. Влияние диабенола и препарата сравнения гликлазида на реологические свойства и гемостаз крови больных сахарным диабетом.....	315
11.5. Влияние диабенола на мембраны эритроцитов.....	318
11.6. Влияние соединения диабенол и пентоксифиллина на агрегацию эритроцитов, индуцированную хлоридом лантана.....	331
11.7. Заключение.....	332
<b>ГЛАВА 12</b>	
Влияние диабенола на выживаемость кожного лоскута в условиях гипергликемии	
<i>Галенко-Ярошевский П. А., Тегай А. В.</i> .....	334
12.1. Влияние диабенола на выживаемость кожного лоскута при экспериментальном сахарном диабете.....	341
12.2. Влияние на микроциркуляцию в коже.....	345
12.3. Ультраструктурный анализ дерматопротекторного действия при микроциркуляторных нарушениях в коже.....	345
12.4. Влияние на жизнеспособность и метаболизм изолированных фибробластов кожи.....	349
12.5. Влияние диабенола на показатели энергетического обеспечения, антиоксидантной системы и активность лизосомальных ферментов в кожном лоскуте.....	350

12.6. Заключение.....	354
ГЛАВА 13	
Фармакинетические свойства диабенола	
<i>Спасов А. А., Смирнова Л. А.</i> .....	355
13.1. Фармакокинетика диабенола при внутривенном введении.....	358
13.2. Фармакокинетика диабенола при пероральном введении.....	362
13.3. Зависимость фармакодинамических свойств от фармакокинетических параметров диабенола.....	364
13.4. Связывание диабенола с сывороточным альбумином.....	368
13.5. Возможные пути метаболизма диабенола.....	368
13.6. Токсико-кинетические параметры лекарственного средства диабенол.....	372
13.7. Биофармацевтическое исследование гранулята диабенола.....	377
13.8. Заключение.....	379
ГЛАВА 14	
Влияние диабенола на канцерогенез	
<i>Анисимов В. Н., Забежинский М. А., Попович И. Г., Алимова И. Н., Егормин П. А., Спасов А. А.</i> .....	380
14.1. Исследование диабенола на мышях NMR1.....	392
14.2. Изучение диабенола на мышях HER-2/neu.....	403
14.3. Действие диабенола на крысах ЛЮ.....	413
14.4. Заключение.....	428
ГЛАВА 15	
Доклиническое исследование безопасности	
<i>Спасов А. А., Бугаева Л. И., Мазанова Л. С.</i> .....	429
15.1. Исследования общетоксикологических свойств.....	429
15.1.1. Острая токсичность.....	429
15.1.2. Изучение кумулирующих свойств.....	431
15.1.3. Хроническая токсичность.....	432
15.1.3.1. Изучение хронической токсичности на крысах.....	432
15.1.3.2. Изучение хронической токсичности на собаках.....	437
15.1.4. Заключение.....	439
15.2. Влияние на репродуктивную функцию.....	440
15.2.1. Гонадотропное действие.....	440
15.2.2. Влияние диабенола на антенатальное развитие плодов.....	442
15.2.3. Действие диабенола на постнатальное развитие плодов....	444
15.2.4. Заключение.....	444

15.3. Изучение аллергенности.....	445
15.4. Иммуотропные свойства.....	446
15.5. Влияние на мутагенез.....	447
15.6. Заключение.....	448
ГЛАВА 16	
Клиническая эффективность препарата диабенол при сахарном диабете 2-го типа	
<i>Петров В. И., Спасов А. А., Недогода С. В., Воронкова М. П. ....</i>	451
16.1. Дизайн исследования.....	451
16.2. Результаты оценки эффективности препарата диабенол.....	455
16.3. Заключение.....	463
Заключение.....	465
Литература.....	474
Conclusion.....	539



# CONTENT

List of abbreviations.....	20
Preface.....	23
Introduction.....	26
CHAPTER 1	
Fundamentals of the search for drugs to fight type 2 diabetes	
<i>Petrov V. I., Spasov A. A., Cheplyaeva N. I., Lenskaya K. V.</i> .....	30
1.1. Normalization of insulin biological action mechanisms and reduction of insulin resistance.....	32
1.2. Recovery of physiological mechanism of insulin secretion.....	35
1.3. Compounds that reduce glucose liver production.....	39
1.4. Monoclonal antibodies-based drugs in the treatment of diabetes.....	41
1.5. Drugs with different mechanisms of action.....	42
CHAPTER 2	
Antidiabetogenic potential of benzimidazole derivatives	
<i>Spasov A. A., Lenskaya K. V., Vasil'ev P. M., Anisimova V. A.</i> .....	45
CHAPTER 3	
Synthesis of benzimidazole derivatives and corresponding fused ring systems	
<i>Anisimova V. A., Zhukovskaya O. N., Kuzmenko T. A.</i> .....	56
3.1. Synthesis of 1-substituted 2-(benzylamino)benzimidazoles with the methoxy-substituted phenyl ring.....	56
3.2. Synthesis of 1-R <sub>1</sub> -3-(NR <sub>2</sub> R <sub>3</sub> -acetamide)-2-amino- benzimidazole chlorides.....	61
3.3. Synthesis of 3-(aroyl)- and 3-(heteroaroyl)imidazo- [1,2 <i>a</i> ]benzimidazoles.....	62
3.4. 9-Substituted 2,3-dihydroimidazo[1,2- <i>a</i> ]benzimidazoles.....	67
3.5. Synthesis of 1-aminoethyl-2,3-dihydroimidazo- [1,2- <i>a</i> ]benzimidazoles.....	77
3.6. Synthesis of 1- and 10- <i>N</i> -substituted 1(10),2,3,4- tetrahydropyrimido[1,2- <i>a</i> ]benzimidazoles.....	81

3.7. Synthesis of 10-alkylaminoethyl-2,3,4,10-tetrahydropyrimido[1,2- <i>a</i> ]benzimidazoles.....	86
3.8. Synthesis of <i>N</i> -acyl substituted 9 <i>H</i> -2,3-dihydroimidazo- and 10 <i>H</i> -2,3,4,10-tetrahydropyrimido[1,2- <i>a</i> ]benzimidazoles and products of their reduction.....	91
3.9. Synthesis of aroylmethyl substituted tricyclic benzimidazole systems containing hydroxyl groups in the aroyl radical.....	97
3.10. Synthesis of amides of 2,3-dihydroimidazo and 2,3,4,10-tetrahydropyrimido[1,2- <i>a</i> ]benzimidazolyl <i>N</i> -acetic acids.....	102
3.11. Synthesis of 2-alkyl-4-dialkylaminoalkyl-1,2,4-triazolo-[1,5- <i>a</i> ]benzimidazoles.....	103

#### CHAPTER 4

##### Directed search for blood sugar reducing compounds

<i>Vasil'ev P. M., Spasov A. A., Dudchenko G. P., Lenskaya K. V., Anisimova V. A.</i> .....	106
4.1. Effect of benzimidazole derivatives on blood glucose levels in rats.....	106
4.2. Planning <i>in silico</i> screening and experimental evaluation of a hypoglycemic properties of benzimidazole derivatives.....	113
4.3. Substructural analysis of the hypoglycemic activity of benzimidazole derivatives.....	119
4.4. Analysis of the prospects of the benzimidazole chemical classes by median and supremal ratings.....	123
4.5. Substructural analysis of the level of hypoglycemic activity of <i>N</i> <sup>9</sup> -2,3-dihydroimidazo[1,2- <i>a</i> ]benzimidazoles.....	128
4.6. Frequency analysis of physico-chemical parameters of <i>N</i> <sup>9</sup> -2,3-dihydroimidazo[1,2- <i>a</i> ]benzimidazole derivatives with different levels of hypoglycemic activity.....	132
4.7. <i>In silico</i> analysis of the ADME properties to define the prospects of diabenol hypoglycemic properties study.....	138
4.8. Experimental study of the diabenol hypoglycemic properties.....	144
4.9. Study of glucose lowering effect of diabenol upon intravenous glucose load in intact rats.....	147
4.10. Conclusion.....	149

## CHAPTER 5

### Antidiabetogenic properties of diabenol

<i>Spasov A. A., Dudchenko G. P., Voronkova M. P.</i> .....	151
5.1. Study of diabenol hypoglycemic effect in animals with impaired glucose tolerance.....	152
5.1.1. Action of diabenol on blood glucose levels in animals with latent streptozotocin diabetes.....	153
5.1.2. Evaluation of the diabenol effectiveness in rats with exogenous hyperinsulinemia.....	155
5.1.3. Studies in experimental animals with obesity.....	157
5.2. Study of diabenol action on animals with experimental diabetes mellitus.....	159
5.3. Diabenol effects in animals with acute insulin deficiency.....	161
5.4. Diabenol influence on glucose-lowering effect of exogenously administered insulin.....	162
5.5. Conclusion.....	165

## CHAPTER 6

### Study of the mechanism of diabenol antidiabetogenic action

<i>Spasov A. A., Dudchenko G. P., Cheplyaeva N. I., Lenskaya K. V.</i> .....	166
6.1. Effect of diabenol on insulin secretion.....	168
6.2. Influence of diabenol on utilization of glucose in peripheral tissues.....	172
6.3. Action of diabenol on glucose-lowering activity of insulin.....	174
6.4. Action of diabenol on some aspects of carbohydrate metabolism.....	176
6.5. Influence of diabenol on dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) activity in streptozotocin-induced diabetes.....	180
6.6. Action of diabenol on the intestinal absorption of carbohydrates.....	186
6.7. Conclusion.....	188

## CHAPTER 7

### Antidiabetogenic action of diabenol

#### in streptozotocin-nicotinamide-treated rats

<i>Snigur G. L., Spasov A. A., Cheplyaeva N. I., Lenskaya K. V.</i> .....	190
7.1. Influence of diabenol on morphofunctional features of pancreatic islets in streptozotocin-nicotinamide- induced diabetes.....	196

7.2. Conclusion.....	203
CHAPTER 8	
Multitarget therapy of type 2 diabetes	
<i>Spasov A. A., Chepurnova M. V., Cheplyaeva N. I., Snigur G. L.</i> .....	205
8.1. Scientific approaches to combination drug therapy of type 2 diabetes.....	207
8.2. Antidiabetic activity of diabenol-metformin and diabenol-glibenclamide combinations.....	217
8.3. Conclusion.....	232
CHAPTER 9	
Oxidative stress in diabetes and its pharmacological correction	
<i>Spasov A. A., Cheplyaeva N. I., Snigur G. L.</i> .....	234
9.1. Sources of free radicals in diabetes.....	235
9.2. The role of free radicals in $\beta$ -cell dysfunction and progression of insulin resistance.....	241
9.3. Antioxidants in diabetes therapy.....	246
9.4. Antidiabetic properties of diabenol- $\alpha$ -lipoic acid combination.....	253
9.5. Conclusion.....	272
CHAPTER 10	
Antithrombogenic action of diabenol	
<i>Spasov A. A., Kucheryavenko A. F.</i> .....	274
10.1. Action of diabenol on platelet aggregation.....	275
10.2. Antithrombotic effect of diabenol in various models of arterial thrombosis.....	279
10.3. Effect of diabenol on bleeding time.....	287
10.4. Effect of diabenol on receptor mechanisms of platelet aggregation.....	289
10.5. Action of diabenol on the balance of prostacyclin and thromboxane (TXA <sub>2</sub> ) in rats.....	292
10.6. Influence of diabenol on calcium levels in animal platelets....	
10.7. Effect of diabenol on platelet-vascular hemostasis in alloxan diabetes.....	296
10.8. Conclusion.....	300
CHAPTER 11	
Influence of diabenol on blood viscosity	
<i>Spasov A. A., Naumenko L. V., Lenskaya K. V.</i> .....	305

11.1. Influence of a single dose of diabenol and reference drug pentoxifylline on blood rheology of rats with hyperviscosity syndrome.....	307
11.2. Effect of seven-day intragastric administration of diabenol and reference drug gliclazide on blood rheology of rats with hyperviscosity syndrome.....	309
11.3. Action of diabenol on rheological properties and hemostasis of blood from donors and diabetes mellitus patients <i>in vitro</i> .....	311
11.4. Influence of diabenol and reference drug gliclazide on the rheological properties of blood and hemostasis in patients with diabetes mellitus.....	313
11.5. Effect of diabenol on erythrocyte membranes.....	315
11.6. Study of the effect of diabenol and pentoxifylline on lanthanum chloride-induced aggregation of red blood cells.....	318
11.7. Conclusion.....	331
<b>CHAPTER 12</b>	
Influence of diabenol on skin flap survival under hyperglycemia conditions	
<i>Galenko-Yaroshevskii P. A., Tegaj A. V.</i> .....	332
12.1. Influence of diabenol on skin flap survival in experimental diabetes.....	334
12.2. Effect on the skin microcirculation.....	341
12.3. Ultrastructural analysis of dermo-protective effect in microcirculatory disorders of the skin.....	345
12.4. Effect on the viability and metabolism of isolated skin fibroblasts.....	349
12.5. Influence of diabenol on energy supply indicators, antioxidant system, and activity of lysosomal enzymes in the skin flap.....	350
12.6. Conclusion.....	354
<b>CHAPTER 13</b>	
Pharmacokinetic properties of diabenol	
<i>Spasov A. A., Smirnova L. A.</i> .....	355
13.1. Diabenol pharmacokinetics upon intravenous Administration.....	358
13.2. Diabenol pharmacokinetics upon oral administration.....	362



13.3. Relation between pharmacodynamic properties and pharmacokinetic parameters of diabenol.....	364
13.4. Diabenol binding to serum albumin.....	368
13.5. Possible ways of diabenol biotransformation.....	368
13.6. Toxicokinetic parameters of diabenol.....	372
13.7. Biopharmaceutical evaluation of diabenol granulate.....	377
13.8. Conclusion.....	379
CHAPTER 14	
Influence of diabenol on carcinogenesis	
<i>Anisimov V. N., Zabezhinskiy M. A., Popovich I. G., Alimov I. N., Egormin P. A., Spasov A. A.</i> .....	380
14.1. Study of diabenol on NMR1 mice.....	392
14.2. Study of diabenol on HER-2/NEU mice.....	403
14.3. Study of diabenol on LIO rats.....	413
14.4. Conclusion.....	428
CHAPTER 15	
Preclinical safety studies	
<i>Spasov A. A., Bugaeva L. I., Mazanova L .S.</i> .....	429
15.1. Study of general toxicity.....	429
15.1.1. Acute toxicity.....	429
15.1.2. Study of cumulative properties.....	431
15.1.3. Chronic toxicity.....	432
15.1.3.1. Study of chronic toxicity in rats.....	432
15.1.3.2. Study of chronic toxicity in dogs.....	437
15.1.4. Conclusion.....	439
15.2. Effects on reproductive function.....	440
15.2.1. Gonadotropic action.....	440
15.2.2. Influence of diabenol on antenatal fetal development.....	442
15.2.3. Influence of diabenol on postnatal fetal development.....	444
15.2.4. Conclusion.....	444
15.3. Study of allergenicity.....	445
15.4. Immunotropic properties.....	446
15.5. Effect on mutagenesis.....	447
15.6. Conclusion.....	448

## CHAPTER 16

### Clinical efficacy of diabenol in patients with type 2 diabetes mellitus

<i>Petrov V. I., Spasov A. A., Nedogoda S. V., Voronkova M. P. ....</i>	451
16.1. Study design.....	451
16.2. Results of diabenol efficacy evaluation.....	455
16.3. Conclusion.....	463
Conclusion.....	465
Literature.....	474
Conclusion.....	539

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

---

2-АмБИ – 2-аминобензимидазол

АДФ – аденозиндифосфат/аденозиндифосфорная кислота

АЖИ, АЦИ, РУ, РУС – лабораторный шифр веществ производных бензимидазола

АИС – инсулин-нейтрализующая активность

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДАВ – диаминобензидин

ДАД – диастолическое артериальное давление

ДБ – диабенол

ИАТ – индекс агрегации тромбоцитов

ИГХ – иммуногистохимическое исследование

ИДТ – индекс дезагрегации тромбоцитов

ИМТ – индекс массы тела

ИРИ – иммунореактивный инсулин

Кк – коэффициент кумуляции

КЭД – коэффициент эндотелиальной дисфункции

ЛД-50 – летальная доза, при которой погибает 50 % животных

ЛК – липоевая кислота

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

МДА – малоновый диальдегид

мкЕд/мл – условная единица, количество содержания инсулина в крови

мкм – микрометр

мл – миллилитр

мм рт. ст. – миллиметры ртутного столба  
ммоль/л – миллимолярная концентрация вещества (количество миллимолей в 1 л раствора)  
МН – максимальный наклон агрегатогаммы  
моль/л – молярная концентрация вещества (количество молей в 1 л раствора)  
ОМЖ – опухоли молочной железы  
ОХ – общий холестерин (ммоль/л)  
ПГТТ – пероральный глюкозотолерантный тест  
ПЖ – поджелудочная железа  
ПОЛ – перекисное окисление липидов  
ПрмБИ – пиримидо[1,2-а]бензимидазол  
САД – системное артериальное давление  
СД – сахарный диабет  
ТГ – триглицериды  
Т-система – место дифференцировки костномозговых предшественников Т-клеток в тимусе до потенциально зрелых форм  
ТХА<sub>2</sub> – тромбоксан А<sub>2</sub>  
УФ – ультрафиолетовая область спектра  
ФАТ – фактор активации тромбоцитов  
ФГ – фибриноген  
ЧСС – частота сердечных сокращений  
ЭД – экспериментальный диабет  
ЭДТА – этилендиаминтетраоцетат  
AUC – площадь под фармакокинетической кривой  
Cl – тотальный клиренс  
Cl<sub>nr</sub> – неренальный клиренс  
Cl<sub>r</sub> – ренальный клиренс  
eNOS – эндотелиальная NO-синтаза  
Hb – гемоглобин  
HbA<sub>1c</sub> – гликозилированный гемоглобин  
Ht – гематокрит  
Ind<sub>R</sub> – индекс гипогликемической активности (y. e.)

Ke1 – константа элиминации  
LgKa – кислотность  
LgP – липофильность  
MDM2 – первичное антитело к протеинам при изучении пролиферативной активности  
MRT – среднее время удерживания одной молекула вещества  
N<sup>9</sup>-ИмБИ – N<sup>9</sup>-имидазо[1,2-а]бензимидазол  
N<sup>1</sup>-ИмБИ – N<sup>1</sup>-имидазо[1,2-а]бензимидазол  
N<sup>9</sup>-ДгИмБИ – N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазол  
N<sup>1</sup>-ДгИмБИ – N<sup>1</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазол  
Nf-kB – транскрипционный ядерный фактор, существует как комплекс с белком IκB  
NO – оксид азота  
PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток  
pH – водородный показатель раствора  
T1/2 – тотальный период полувыведения  
T1/2α – период полувыведения стадии распределения  
TRAIL – апоптоз-индуцирующий лиганд фактора некроза опухоли  
TUNEL – метод – терминальное дезоксиуридиновое нуклеотидное мечение «концов» с последующим проявлением меченых биотином диаминобензидином  
Vd – тотальный объем распределения  
Vss – стационарный объем распределения  
β-эндокриноциты – бета-клетки островков Лангерганса поджелудочной железы  
ED-50 – эффективная доза, вызывающая 50 % эффекта  
EC-25 – эффективная концентрация, вызывающая 25 % эффекта  
EC-50 – эффективная концентрация, вызывающая 50 % эффекта  
Cmax – максимальная концентрация



## ПРЕДИСЛОВИЕ

---

Сахарный диабет 2-го типа – синдром, включающий в первую очередь взаимосвязанные метаболические нарушения углеводного и липидного обменов, приводящие к нарушению молекулярных механизмов действия инсулина и, как следствие, к изменению функционирования различных органов и систем организма, к разнонаправленным механизмам дисрегуляции функционирования эндокринных клеток поджелудочной железы, к развитию инсулинорезистентности печени и поперечнополосатых мышц и, как следствие, к глюкозотоксичности – неферментативному гликированию белков, липопротеидов и нуклеопротеидов и развитию повреждения различных органов и систем человеческого организма (нейро-, кардио-, ангиопатии и т.д.).

Данные ВОЗ свидетельствуют о развитии пандемии сахарного диабета, особенно 2-го типа. Эта патология является одной из наиболее распространенных заболеваний в промышленно развитых странах (до 4–5 % всего населения) и представляет острейшую медикосоциальную проблему. Главной причиной ранней инвалидизации и летальности являются сердечно-сосудистые осложнения сахарного диабета. По статистическим данным, смертность от ишемической болезни сердца и инсульта у этой категории больных наблюдается чаще в 2–3 раза, слепота – в 10 раз, нефропатия – в 12–15 раз, гангрена конечностей в 20 раз чаще, чем среди населения в целом. Одним из важных направлений борьбы с данной патологией является изучение молекулярных механизмов ее развития, разработка методов профилактики, диагностики и лечения. Следует отметить значительные достижения фундаментальной медицины в разработке методов лечения сахарного диабета. Начиная с определения роли поджелудочной железы в развитии сахарного диабета и первых попыток использова-

ния перфузата поджелудочной железы животных (панкреотоксина), полученного по технологии академика Н.П. Кравкова для лечения больных сахарным диабетом в России [Узбекова Д.Г., 2014] и выделения из поджелудочной железы животных инсулина канадскими исследователями Ф.Бантингом и Ч.Бестом [Уильямз Г., 2003] в 20-х годах прошлого века, до появления в начале XXI века биотехнологического инсулина, который полностью по своей структуре соответствует человеческому, и создания аналогов инсулина человеческого с оптимизированными фармакокинетическими свойствами. Внедрены новые лекарственные формы инсулина – для введения внутрь и ингаляционно [Кроненберг Г.М., 2010].

Первые синтетические препараты для лечения сахарного диабета были созданы на основании изучения химической структуры компонентов экстрактов лекарственных растений (корень французской сирени, козлятник аптечный и др.) используемых с начала средних веков для лечения данной патологии. Было установлено, что они содержат большое количество аминокислоты гуанидина. В середине прошлого века появились в клинической практике синтетические бигуаниды, один из которых – метформин – в настоящее время является золотым стандартом в лечении сахарного диабета 2-го типа.

За последние несколько десятилетий в результате достижений фундаментальных наук выяснены многие молекулярные механизмы развития сахарного диабета. Появились новые группы лекарственных средств – секретогены инсулина, инкретиномиметики, стимуляторы PPAR $\gamma$  рецепторов, ингибиторы  $\alpha$ -глюкозидазы, натрий-глюкозных обменников [Дедов И.И., 2009; Аметов А.С., 2015] В настоящее время многие научные центры изучают возможность лечения сахарного диабета через воздействие на несколько десятков новых «мишеней», доказанных исследователями в области молекулярной фармакологии и биологии как важные элементы развития сахарного диабета или его осложнений [Спасов А.А., 2013; Levin T., 2009; Croasdell G., 2010].

Вашему вниманию предлагается книга, содержащая итоги исследований проводимых научными сотрудниками Волгоградского го-

сударственного медицинского университета и Научно-исследовательского института физической и органической химии Южного федерального университета. Своеобразным «толчком» к инициированию исследований стали литературные сведения о том, что производное аминобензимидазола, применяемое в клинической практике в качестве противоглистного средства, – мебендазол – у больных сахарным диабетом 2-го типа стимулирует секрецию инсулина и вызывает снижение глюкозы крови [Caprio S., 1984].

С учетом того что аминопроизводные бензимидазола содержат гуанидиновую группу как у лекарственных средств группы бигуанидов, был проведен синтез новых конденсированных и неконденсированных производных бензимидазолов, содержащих встроенную и частично встроенную гуанидиновую группу, изучено их влияние на углеводный обмен в норме и при экспериментальных патологических состояниях: преддиабет, диабет. Для выявления нового активного соединения были использованы методы рутинного скрининга и исследований *in silico* с применением современных биоинформационных технологий. Описаны результаты всех доклинических и клинических испытаний наиболее активного соединения диабенола, изучения его механизма действия и некоторые плейотропные эффекты.

Исследования выполнялись в рамках государственной научно-технической программы «Борьба с наиболее распространенными болезнями» по теме «Сахарный диабет» и гранта Российского научного фонда по теме «Создание системы мишень-ориентированного поиска биологически активных соединений, влияющих на патогенетические важные звенья нарушения углеводного обмена при сахарном диабете типа 2, с использованием технологии компьютерного моделирования и медицинской химии» (Соглашение №14-25-00139).

Авторы благодарят академика РАН И.И. Дедова за постоянную поддержку и консультирование настоящего исследования.

Достижения современных наук, связанные с созданием новых лекарственных средств, в настоящее время огромные. В первую очередь, это связано с успехами в области химии и биоинформатики, способствующими интенсивному развитию медицинской химии, молекулярной биологии, фармакологии и различных новых дисциплин – протеомики, геномики и т.д. Как результат этого прогресса, по оценочным данным Н.Н. Зефирова (1999) и J. Polanski (2012), количество новых молекул может достигать от  $10^{180}$  до  $10^{200}$ , фактически в настоящее время синтезировано более 110 млн веществ. При этом важно не количество новых соединений, а их свойства.

В прошлом веке чаще всего использовали технологии подобию новых лекарственных средств различным биологически активным компонентам живого организма [Закусов В.В., 1973; Баренбойм Г.М., 1986; Ковалев Г.В., 1990]. В конце прошлого века исследователи перешли от принципа подобию и случайных находок к конструированию новых биологически активных веществ на основе достижения физиологии, биохимии и молекулярной фармакологии [Баренбойм Г.М., 1986].

В эти годы исследователи разработали представление о лекарственном подобию химических молекул. Были определены валидные характеристики малых молекул, которые выделяет их из всего химического многообразия в качестве потенциальных биологически активных веществ. Так, известно, например, «правило пяти» Липинского [Lipinski A., 1997] – вещества с хорошей проницаемостью и абсорбционными свойствами в организме должны иметь следующие физико-химические характеристики: коэффициент распределения октанол/вода –  $\text{ClogP} \leq 5$ , молекулярную массу  $< 500$ , количество групп-

доноров водородных связей  $\leq 5$ , групп-акцепторов водородных связей  $\leq 10$ . Подобных подходов в медицинской химии существует большое количество (например, в обзорной работе Polanski J., 2012), в том числе компьютеризированных программ (например, DruLito), позволяющих уже на ранних этапах спланировать синтез и изучение перспективных молекул. Все эти технологии позволяют виртуально спрогнозировать и выбрать соединения с оптимальными фармакокинетическими характеристиками: растворимостью, всасыванием при введении внутрь, кишечным и печеночным метаболизмом, скоростью выведения из желудочно-кишечного тракта, переносом транспортными системами кишечника или гепатоцитами (такими как Р-гликопротеины) в системный кровоток и наличием эффекта первого прохождения через печень, возможностью конъюгирования или метаболизма.

Вторым направлением, позволяющим оптимизировать поиск перспективных молекул для изучения их в качестве возможной основы для создания лекарственных средств, является введенное Эвансом с соавторами в 1986 г. понятие «привилегированных структур». На основании анализа литературных данных об общности некоторых фрагментов структуры синтетических лекарственных средств и своих наблюдений он установил, что у большей части лекарственных молекул в основе их химической структуры лежит небольшое число молекулярных каркасов [Evans В.Е., 1988]. В последующем было введено уточнение, что «единый молекулярный каркас, способный взаимодействовать с различными рецепторами» лучше называть «привилегированной подструктурой», т.к. она представляет базовое ядро молекулы [DeSimone R.W., 2004]. Так, среди бициклических химических структур, входящих в состав лекарственных средств, выделяют 27 привилегированных подструктур, в том числе и бензимидазолы [Horton D.A., 2003]. В фармакологическом понимании лекарственные средства, содержащие «привилегированную подструктуру», проявляют более двух видов активности [Evans В.Е., 1988; Horton D.A., 2003].

«Привилегированные подструктуры» можно выявлять простым эмпирическим наблюдением или с помощью компьютеризированных систем – например, программы RECAP [Lewell X.Q., 1998]. Существует следующее официальное определение IUPAC: «Привилегированная структура – подструктура, которая придает желаемые (лекарственно-подобные) свойства соединениям. Часто состоит из полужесткой молекулярной структуры, которая способна присоединять множественные гидрофобные радикалы, не изменяя гидрофобные свойства молекул». То есть это часть лиганда, содержащая привилегированную подструктуру, будет проявлять некоторое свойство связывания или активации по отношению к достаточно широкому числу фармакологических мишеней, и тогда исследователь может придать дополнительные свойства молекуле, более специфичные для нужной мишени. Таким образом, привилегированная подструктура используется как каркас, который может также с успехом использоваться для создания как селективно действующих на конкретный рецептор препаратов, так и мультитаргетных.

Выдвинуто предположение, что в случае взаимодействия молекул, содержащих «привилегированную подструктуру», с GPCR-рецепторами существует стабильный связывающий «карман», который распознает типичные элементы привилегированных подструктур, и «меньший подкарман», где радикалы более стабильны, имеют ароматическую или гидрофобную природу [Mason J.S., 1999]. Имеются исследования, описывающие аминокислотные составы (выстилку) карманов и подкарманов различных рецепторов – GPCR и их классификации в виде «филогенетических деревьев», позволяющие определять рецепторы с близкими по структуре подкарманами и объясняющие основы мультитаргетности некоторых лекарственных средств и появление их побочных эффектов [Van de Peer, 1997; Wywater R.P., 2006; Bondensgaard K., 2004].

Бензимидазолы представляют собой большой класс привилегированных подструктур, который входит в состав молекул, взаимодействующих как с GPCR-рецепторами, так и с лиганд-зависимыми ион-

ными каналами и ферментами. Базовая структура бензимидазола входит в состав следующих лекарственных средств: спазмолитического средства – дибазол (тромаседан), антигистаминового препарата – астемизол, ингибитора протонного насоса – омепразол, антитромбогенного средства – дибигатран, транквилизатора – афобазол, антигельминтных средств – мебендазол, альбендазол, актопротекторов беметил, этомерзол [Спасов А.А., 1999; Середенин С.Б., 2013]. В исследованиях De Simone R.W. (2004) показано, что корректно замещенные соединения, содержащие бензимидазол, модулируют действие на рецептор брадикинина-2, рецептор бензодиазепина и на лиганд-сопряженный ионный канал  $\text{GAMK}_A$ , глюкагон подобного пептида. В наших исследованиях показано, что при модификации циклических и нециклических производных бензимидазола удается модулировать активность ионных каналов кардиомио- и нейроцитов, блокировать  $\text{Na}/\text{H}$  обменник первого типа, активировать каппа-опиоидный рецептор, ингибировать ацетилхолинэстеразу и фосфодиэстеразу, блокировать  $\text{H}_2$ ,  $3\text{HT}_3$ ,  $2\text{HT}_{2A}$ ,  $2\text{HT}_4$ ,  $\text{P}_2\text{Y}_1$ ,  $\text{P}_2\text{Y}_{12}$  рецепторы, кальмодулин и свободнорадикальные процессы, а также подавлять активацию тромбоцитов, вызванную различными индукторами [Спасов А.А., 1999, 2000, 2006, 2007, 2010, 2012, 2013; Анисимова В.А. 1987, 2000; Гречко, О.Ю., 2012; Косолапов В.А., 2013; Островский О.В., 2003; Кучерявенко А.Ф., 2013]. При этом следует отметить, что у наиболее активных изучаемых веществ отмечалась избирательность действия на тот или другой объект изучения.

В последние годы описаны эффекты новых соединений, синтезированных на основе бензимидазола, модулирующие ключевые элементы (рецепторы, ферменты) патогенеза сахарного диабета (см. главу 2).

# ГЛАВА 1

## ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ ПОИСКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ТЕРАПИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-го ТИПА

*В. И. Петров, А. А. Спасов,  
Н. И. Чепляева, К. В. Ленская*

---

Принимая во внимание гетерогенность сахарного диабета 2 типа необходимо отметить, что развитие данной патологии имеет фазный характер. Многие исследователи полагают, что резистентность периферических тканей к инсулину является первичным дефектом в патогенезе СД типа 2, который вызывает компенсаторное усиление секреции инсулина островками Лангерганса [Балаболкин М.И., 2005]. В норме  $\beta$ -клетки быстро адаптируются к снижению чувствительности к инсулину на уровне печени или периферических тканей, повышая секрецию инсулина и предотвращая развитие гипергликемии натощак [Аметов А.С., 2008]. В случаях недостаточности синтеза и секреции  $\beta$ -клетками инсулина, необходимого для преодоления инсулинорезистентности, сначала развивается нарушение толерантности к глюкозе (преддиабет), а затем при нарастании дефекта манифестирует и диабет. Чаще всего СД диагностируется при сохранении инсулиносекреторной функции менее чем на 20 %. Одними из важных факторов в прогрессировании дисфункции  $\beta$ -клеток являются глюкозотоксичность и липотоксичность, которые приводят как к количественным, так и к качественным дефектам, что проявляется снижением или полным отсутствием первой фазы секреции инсулина, нарушением пульсирующей секреции инсулина и конверсии проин-



сулина в инсулин [Аметов А.С., 2008; Ткачук В.А., 2014; Stolar M.W., 2008].

Следует отметить, что за последние 20 лет цели лечения СД претерпели значительные изменения. Если до недавнего времени целью терапии было лишь устранение симптомов гипергликемии, то в настоящее время адекватная рациональная фармакологическая коррекция данной патологии направлена на протекцию  $\beta$ -клеток поджелудочной железы от истощения, поддержание оптимального баланса глюкозы, предотвращение развития макро- и микро-сосудистых осложнений [Дедов И.И., 2010; Lerario A.C., 2010]. Препараты для лечения СД 2 типа представлены следующими группами: секретогены инсулина – производные сульфонилмочевины (глибенкламид, глипизид, гликлазид, гликвидон, амарил); постпрандиальные регуляторы секреции инсулина (репаглинид и натеглинид), бигуаниды (метформин); сенситайзеры инсулина (розиглитазон, пиоглитазон); инкретиномиметики (вилдаглиптин, ситаглиптин, саксоглиптин) [Дедов И.И., 2011]. Монотерапия одним из антидиабетических препаратов эффективна непродолжительное время, а в дальнейшем возникает необходимость назначения двух или более препаратов. Комбинированной пероральной сахароснижающей терапия на ранних и последующих этапах заболевания позволяет достичь и сохранить адекватный уровень глюкозы и предупреждает развитие острых и поздних осложнений заболевания. Комбинированные схемы лечения увеличивают эффективность лечения, а также уменьшить дозу каждого из препаратов и тем самым снизить до минимума побочные эффекты [Спасов А.А., 2011].

Современный уровень научных исследований этиологии и патогенеза СД позволяет находить новые мишени для антидиабетических соединений и создавать новые классы препаратов для пероральной сахароснижающей терапии. Следует отметить разнонаправленность поиска лекарственных препаратов и условно выделить четыре основных направления: нормализация биологического действия инсулина и устранение инсулинорезистентности, восстановление фи-

зиологической секреции инсулина, снижение продукции глюкозы печенью и ранняя профилактика осложнений сахарного диабета.

## **1.1. Нормализация механизмов биологического действия инсулина и снижение инсулиновой резистентности**

Учитывая, что инсулинорезистентность является одним из ведущих, а, по мнению большинства исследователей, первичным дефектом при сахарном диабете, активно ведется поиск высокоэффективных препаратов для коррекции данного фактора в патогенезе СД 2 типа [Дедов И.И., 2011]. Снижение инсулинорезистентности периферических тканей возможно посредством модуляция активности рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом (PPAR), одного из регуляторов метаболизма углеводов, жиров и белков [O'Mooghe-Sullivan T.M., 2002]. Первым препаратом данной группы, допущенным к применению в качестве антидиабетического средства, был синтезированный в 1983 г. троглитазон, однако в 2000 г. его использование было запрещено из-за высокой гепатотоксичности его метаболита. После проведения дополнительных исследований специфической токсичности препаратов была подтверждена безопасность применения всей группы [Дедов И.И., 2011]. Кроме того, по данным ретроспективного исследования установлено, что применение розиглитазона увеличивает риск развития инфаркта миокарда, инсульта, сердечной недостаточности. На основании этого FDA ограничило, а ЕМА в Европе временно запретило применение данного препарата до выяснения, у каких групп пациентов польза от препарата перевешивает потенциальный вред [Graham D.J., 2010]. 3-ю фазу клинических испытаний проходят частичный агонист PPAR $\gamma$  – балаглитазон и полный агонист – ривоглитазон [Levien T.L., 2009]. Соединения, мишенями которых являются  $\alpha$  и  $\gamma$  PPAR, имеют комбинированную активность препаратов группы тиазолидиндионов и фибратов, поэтому представляют интерес для поиска новых антидиабетических пре-

паратов с гипополидемическими свойствами [Sharma R., 2008]. Среди данной новой группы веществ выделяют производные тиазолидиндионов (DRF-2189, KRP-297) и вещества, не являющиеся по химической структуре тиазолидиндионами: ITT-501, BSM-298585 (мураглитазар), AZ-242 (тесаглитазар), NNC 61-0029 или (-)DRF2725 (рагаглитазар), GI262570 (фарглитазар), LY519818 (навеглитазар) [Levien T.L., 2009].

Физиологическая регуляция действия инсулина контролируется посредством баланса между фосфорилированием и дефосфорилированием инсулинового рецептора. Протеин тирозинфосфатаза 1В (PTP1B) – первый фермент из группы протеин тирозинфосфатаз, у которого была выявлена способность дефосфорилировать инсулиновый рецептор и свойства негативного регулятора инсулинового сигнального пути [Ткачук В.А., 2014; Sharma R., 2008]. У нокаутных по PTP1B мышей фиксируется усиление фосфорилирования рецептора и повышение чувствительности скелетных мышц и печени к гормону [Тюренков И.Н., 2015; Ukkola O., 2002].

Блокирование данного фермента является оптимальной мишенью для поиска препаратов для лечения СД 2-го типа и ожирения. Учитывая результаты многочисленных исследований среди ингибиторов данного белка, выделяют четыре основных группы низкомолекулярных соединений: дифтормителенфосфонаты, производные 2-карбометоксибензойной кислоты, 2-оксалиламинобензойной кислоты [Johnson T.O., 2002; Kumar Vats R., 2005]. Однако на данном этапе ведутся исследования только по молекулярному конструированию и докингу высокоселективных ингибиторов PTP1B и не решена проблема по созданию соединений доступных для перорального введения [Black E., 2005; Wilson D.P., 2007].

Важным фактором в регуляции энергетического обмена клетки является цАМФ-зависимая протеинкиназа (АМРК) [Ткачук В.А., 2014; Carling D., 2004].

Установлено, что АМРК является своеобразным сенсором, реагирующим на соотношение АМФ/АТФ в клетке, и контролирует мно-

гие физиологические процессы в организме. Известно, что метформин активирует данную киназу и вызывает при сахарном диабете 2 типа так называемые плеiotропные эффекты, приводящие к антидиабетогенному эффекту не сопровождаемым риском гипогликемии [Залева А.Г., 2008; Zhou G., 2001]. Данная цАМФ протеинкиназа вызывает большой интерес у специалистов, занимающихся поиском новых антидиабетогенных средств [Giordanetto F., 2012].

В качестве мишени для действия препаратов рассматривается и  $\beta 3$ -адренорецептор, селективная стимуляция которого приводит к усилению липолиза, а следовательно, к усилению потребления энергии в скелетных мышцах и жировой ткани [Coman O.A., 2009]. В качестве модуляторов  $\beta 3$  рецептора исследуются соединения под шифрами SR-58611 и TAK-677 [Coman O.A., 2009; Schaeffer P., 2006]. Соединение TAK-677 проходит клинические испытания [Francke S., 2002].

В ходе многочисленных исследований установлено, что ряд неорганических соединений, а именно соли ванадия, селена, хрома, марганца, молибдена и вольфрама, имитируют эффекты инсулина [Sakurai H., 2002; Thompson K.H., 2009]. Однако большое внимание исследователей привлекает применение антидиабетических препаратов на основе неорганических и органических солей ванадия. Инсулиноподобный эффект соединений ванадия связан с ингибированием протеинтирозинфосфатаз, ферментов, дефосфорилирующих остатки фосфотирозина в белках и пептидах и играющих ключевую роль в передаче инсулинового сигнала [Sakurai H., 2002]. Следует отметить, что неорганические соли ванадия плохо всасываются в желудочно-кишечном тракте, с целью улучшения абсорбции, терапевтической безопасности и эффективности были синтезированы различные органические соединения ванадия. Так комплексы на основе мальтола и этилмальтола, бис (мальтолато) оксованадий и бис (этилмальтолато) оксованадий имеют требуемую промежуточную стабильность для пролекарства. Бис (этилмальтолато) оксованадий (АКР-020) прошел 1 и 2а фазы клинических испытаний [Thompson K.H., 2009].

## 1.2. Восстановление физиологических механизмов секреции инсулина

Следует отметить, что не менее важную роль в патогенезе СД играет снижение секреции инсулина, связанное с прогрессирующим снижением функциональной активности  $\beta$ -клеток поджелудочной железы сопутствующее развитию инсулинорезистентности. Длительность сохранения секреторной функции островков Лангерганса определяет начало инсулинотерапии при СД 2 типа. Снижение эффекта инкретинов является одним из важных дефектов, приводящих к снижению глюкозозависимой секреции инсулина [Дедов И.И., 2011]. В последнее десятилетие благодаря фундаментальным и клиническим исследованиям в данной области развилось новое и перспективное направление в лечении СД 2 типа, основанное на использовании инкретинового эффекта. Выделяют две основных группы соединений, регулирующих энтероинсулярную ось: агонисты GLP-1 рецепторов (GLP-1 миметики, инкретиномиметики) и ингибиторы дипептидилпептидазы 4 (DPP4) (инкретинэнхансеры) [Gallwitz В., 2010]. Препараты данных группы либо восполняют дефицит инкретинов, либо тормозят процессы деградации и, таким образом, стимулируют секрецию инсулина и ингибируют секрецию глюкагона, тормозят процессы апоптоза  $\beta$ -клеток поджелудочной железы и усиливают их регенерацию, что позволяет достичь пролонгированного эффекта и воздействовать на одно из звеньев патогенеза заболевания [Ranganath L.R., 2008].

Эксенатид (Баета) является первым представителем лекарственного класса агонистов GLP-1 рецепторов, синтетической формой экзендина-4, первоначально выделенного из слюны ядовитой южноамериканской ящерицы [Ross A.S., 2010]. Еще один препарат, аналог человеческого GLP-1, представляющий собой на 97 % гомологичную структуру нативному человеческому GLP-1 – лираглутид (Виктоза) [Dharmalingam M., 2011]. Наличие данных препаратов только

в инъекционных формах несколько ограничивает их применение. Учитывая данную проблему, ведется направленный поиск не пептидных молекул, которые связываются и стимулируют GLP-1 рецептор, из библиотеки в 48168 соединений были найдены соединения среди замещенных хиноксалина и производных циклобутана S4P и Vos 5, которые оказывают эффекты подобные аналогам GLP-1 [Chena D., 2007].

Еще один класс препаратов – это ингибиторы DPP4, представителями которого являются вилдаглиптин (Гальвус), ситаглиптин (Янувия), саксоглиптин, алоглиптин. Эти средства воздействуют на тот же биохимический процесс, что и агонисты GLP-1, но другим способом: они не пополняют естественный запас GLP-1, а ингибируют фермент, ответственный за его расщепление. Ингибирование DPP4 позволяет преодолеть некоторые проблемы, связанные с клиническим применением GLP-1 и его аналогов: отсутствие пероральных форм; быстрая деградация GLP-1 [Ross A.S., 2010, Gorrell M.D., 2005]. Однако помимо GLP и GIP субстратами для фермента являются нейропептид Y, пептид YY, 9 хемокинов, что обуславливает наличие иммуностропной и психотропной активностей у данной группы [Gupta R., 2009]. DPP-4 входит в состав семейства, которое включает четыре фермента: DPP-4, протеин-активатор фибробластов (FAP), дипептидилпептидазу-8, дипептидилпептидазу-9 и 2 белка без ферментативной активности DPP-4-подобный протеин-6 (DPP-6) и дипептидилпептидазу-10 [Gorrell M.D., 2005]. Аминокислотная последовательность в каталитическом домене данных ферментов сходна, однако ингибирование DPP-8/9 приводит к появлению таких побочных эффектов как алоpecia, тромбоцитопения, ретикулоцитопения, поэтому ведется поиск новых высокоселективных ингибиторов, только в отношении DPP4 [Gupta R., 2009].

Сконструированы гибридные полипептидные молекулы на основе GLP-1 и глюкагона, так называемые «dual-acting peptide for diabetes» (DAPD), которые проходят доклинические исследования. Для устранения у данных соединений побочных эффектов со стороны

желудочно-кишечного тракта (тошнота и рвота) получены пегилированные DAPD [Green B.D., 2007].

G-сопряженные рецепторы являются одним из важных модуляторов секреции GLP-1. GPR119 – это G-сопряженный рецептор, который селективно экспрессируется на  $\beta$ -клетках поджелудочной железы и эндокринных клетках кишечника. GPR119 выполняет функцию глюкозависимого инсулиотропного рецептора и подобно рецепторам к GLP-1 и другим пептидам регулирует усиление глюкозависимого высвобождения инсулина. Агонисты GPR119 стимулируют глюкозозависимую секрецию инсулина *in vitro* и снижают повышенный уровень глюкозы в крови *in vivo*. Дополнительно продемонстрировано, что данные соединения стимулируют высвобождение инкретинов GLP-1 и GIP. В качестве агонистов GPR119 испытывались различные соединения APD-668 и APD-597 (исследования прекращены), SAR-260093/MBX-2982 (II фаза испытаний), GSK-1292263 (II фаза испытаний), PSN-821 (II фаза испытаний) [Overton H.A., 2008]. Возможно, данный механизм действия является основным эффектом противодиабетического действия экстракта Гимнемы лесной и его препаратов [Спасов А.А., 2008]. Согласно проведенным исследованиям экстракт из листьев Гимнемы лесной повышает высвобождение GIP и GLP-1 под влиянием глюкозы [Спасов А.А., 2009, Fushiki T., 1992].

Однако возможно создание препаратов стимулирующих секрецию инсулина посредством усиления активности гексокиназы  $\beta$ -клеток. Активно ведется поиск препаратов в данном направлении, однако все исследования находятся на доклиническом этапе и лишь некоторые соединения проходят клинические испытания. Данный класс препаратов является весьма перспективным, так как гексокиназа не только контролирует переход глюкозы в гликоген, но и является глюкозным сенсором инсулинопродуцирующих клеток поджелудочной железы, что позволит препарату воздействовать на два основных звена патогенеза сахарного диабета: продукцию глюкозы печенью и дисфункцию  $\beta$ -клеток. Среди соединений, способных активировать

гексокиназу в зависимости от фармакофора, располагающегося в центре молекулы, выделяют четыре основных класса: с углеродом в центре (RO0281675, RO4389620, LY2121260, PsN-GK1), с ароматическим кольцом (GKA-50), с аминокислотой и другими структурами [Matschinsky F.M., 2009, Matschinsky F.M., 2010].

Кроме того, необходимо учитывать, что хроническая гипергликемия при сахарном диабете приводит к нарушениям функций инсулинопродуцирующих клеток, которые со временем становятся необратимыми. Токсическое действие высоких концентраций глюкозы связано с десенситизацией  $\beta$ -клеток, усилением свободнорадикальных процессов, снижением высвобождения, а затем синтеза и депонирования инсулина, и в конечном итоге активацией процессов апоптоза  $\beta$ -клеток [Fujimoto K., 2009; Robertson R.P., 2007]. Перспективным направлением, в данном случае, является создание группы лекарственных препаратов ограничивающих процессы апоптоза и стимулирующих регенерация  $\beta$ -клеток [Robertson R.P., 2007].

Первым из средств, испытанных для профилактики повреждения островков Лангерганса, является никотинамид. Никотинамид способствует угнетению активности поли-(АДФ-рибозо)-полимеразы (ПАРП) и (моно)АДФ-рибозилтрансфераз, что предотвращается снижение уровня NAD<sup>+</sup> в  $\beta$ -клетках, необходимого для синтеза инсулина и контроля аутоиммунных процессов, в частности, экспрессии генов HLA II класса [Полторак В.В., 2001]. *In vivo* никотинамид повышает репликацию  $\beta$ -клеток, в трансплантируемых островках, стимулирует регенерацию у животных с частичной панкреатэктомией, предотвращает повреждение поджелудочной железы при стрептозотоциновом диабете, улучшает инсулиносекреторную функцию у пациентов с высоким риском развития СД 1-го типа [Полторак В.В., 2001, Yonemura, Y., 1984, Sandler S., 1988, Manna R., 1992, Hu Y., 1996]. Предполагалось применять никотинамид как средство для профилактики СД у ближайших родственников пациентов с СД 1-го типа, однако в ходе клинических испытаний не было получено данных об эффективности вещества [Полторак В.В., 2001]. По данным ряда ав-



торов, терапия никотинамидом приводит к существенному увеличению частоты клинической ремиссии заболевания со снижением потребности в экзогенном инсулине [Pozzilli P., 1997; Crino A., 2004]. Однако передозировка никотинамида (более 2 мг/кг) может приводить к повышению концентрации его метаболита *N*1-метил никотинамида – потенциального триггера окислительного стресса и инсулинорезистентности при СД 2-го типа [Zhou S.S., 2009]. Клинические исследования о профилактическом действии данного препарата противоречивы и требуют дальнейшего уточнения.

Ведется поиск новых высокоселективных ингибиторов ПАРП-1 среди различных классов веществ. Ингибиторы ПАРП разделяют на две основных группы: производные нуклеиновых кислот и нуклеозидов и ингибиторы, созданные с учетом строения каталитического центра фермента (PJ-34 и INO-1001) [Jagtap P.G., 2005]. Некоторые из этих соединений проходят 1 и 2 фазу клинических испытаний [Szabo C., 2006].

INGAP (Islet neogenesis associated protein – островковый неогенез-ассоциированный белок) – один из первых кандидатов для создания препаратов, индуцирующих неогенез островков, выделенный из протоков поджелудочной железы хомячков [Pittenger G.L., 2009]. Результаты исследований *in vitro* на животных подтвердили активность пептида, INGAP повышает уровень С-пептида у пациентов с СД 1-го типа и улучшает контроль уровня глюкозы у пациентов с СД типа 2 [Dungan K.M., 2009].

Проводятся исследования по применению в качестве протектора от свободнорадикальных повреждений и апоптоза поджелудочной железы, миметика СОД, АЕОЛ10150 [Bottino R., 2004].

### **1.3. Соединения, снижающие продукцию глюкозы печенью**

Глюконеогенез является естественным метаболическим процессом, поддерживающим оптимальный уровень глюкозы в период меж-

ду приемами пищи, однако при СД, как вследствие снижения уровня инсулина, так и вследствие резистентности тканей к инсулиновому сигналу, активируется процесс синтеза глюкозы в печени из неуглеводных источников. Таким образом, повышение продукции глюкозы печенью является одним из основных и ведущих факторов в патогенезе СД и требует дополнительной фармакологической коррекции. Следует отметить, что повышение глюконеогенеза в печени в 3 раза и более наблюдающееся при умеренной недостаточности инсулина связано с тем, что для угнетения глюконеогенеза требуется сравнительно большее количество инсулина, чем для угнетения гликогенолиза [Felig P., 1971].

Регуляция ключевых ферментов углеводного обмена в печени, активация ферментов гликолиза и синтеза гликогена (гликогенсинтазы, гексокиназы, фосфофруктокиназы, пируваткиназы), ингибирование ферментов глюконеогенеза и гликогенолиза (гликогенфосфоорилаза, фруктозобифосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы, фосфоенолпируваткарбоксилаза) [Wu C., 2005] является точкой приложения действия соединений и одним из перспективных направлений поиска и создания нового класса препаратов для лечения СД 2 типа.

Метформин является единственным препаратом, ингибирующим глюконеогенез в печени, однако данный эффект связан со снижением печеночной инсулинорезистентности [Alice Y.Y., 2005]. Согласно Long Y.C. [2006], метформин стимулирует АМФ-активируемую протеинкиназу и внутриклеточный сигнал истощения запасов энергии, что приводит к повышению захвата глюкозы скелетными мышцами и торможению глюконеогенеза.

В качестве эффективных антидиабетических препаратов могут применяться селективные ингибиторы киназы-3 гликогенсинтазы. Так у солей лития были обнаружены инсулиноподобные свойства, которые, возможно, связаны с блокированием киназы гликогенсинтазы-3, однако следует помнить, что ионы лития селективны не только к данному ферменту, но также ингибируют инозитолмонофосфатазу [Meijer L., 2004]. Низкомолекулярные ингибиторы киназы-3 глико-

генсинтазы активно разрабатывались исследовательской группой компании GlaxoSmithKline, ими были получены производные малеимидов SB-216763 и SB-415286, которые стимулировали синтез гликогена изолированными гепатоцитами человека. Кроме того, ингибирующая активность была выявлена у производных аминопиримидина, СТ98014 и СТ98023, которые увеличивали синтез гликогена, а также повышали инсулиноопосредованный захват глюкозы периферическими тканями при экспериментальном СД [Woodgett J.R., 2003].

Широко исследуются соединения из группы ингибиторов фруктозо-1,6-бифосфатазы, так CS-917 (MB 06322) супрессировал глюконеогенез на различных генетических моделях СД (ZDF и GK крысы) и снижал уровень глюкозы в плазме у пациентов с сахарным диабетом. Ведется поиск ингибиторов гликогенфосфоорилазы. Выявлен ряд соединений с данным видом активности: производные дигидропиридина (BAYR3401 и др.) [Bergans N., 2000]; CP 91149 [Martin W.H., 1998], которые эффективны в условиях *in vitro* и на экспериментальных моделях сахарного диабета. S-3483 – производное хлорогеновой кислоты, ингибитор глюкозо-6-фосфатазы, на модели перфузии изолированной печени крыс дозозависимо подавлял глюконеогенез и гликогенолиз [Herling A.W., 1998].

Таким образом, поиск препаратов, снижающих продукцию глюкозы печенью, является одним из приоритетных направлений в диабетологии.

#### **1.4. Препараты на основе моноклональных антител в терапии сахарного диабета**

Перспективным направлением в терапии СД, является создание лекарственных препаратов на основе моноклональных антител (МА), если первоначально исследования в данной области были направлены на ограничение аутоиммунных процессов при СД 1 типа, то на сегодняшний момент рассматривается применение МА для коррекции СД

2 типа. Одним из первых препаратов на основе МА к CD3 был отеликсизумаб, который связывается с CD3/TCR комплексом и блокирует активацию Т-клеток, пролиферацию и высвобождение цитокинов. Эффективность и безопасность данного вещества оценивалась в исследованиях DEFEND-1 и DEFEND-2 (2010) у пациентов со вновь выявленным СД. Третью фазу клинических испытаний проходит препарат теплизумаб, человеческие Fc-сконструированные МА [Gallagher M.P., 2011].

Проводятся экспериментальные исследования высокоаффинных МА к рецептору инсулина (ХMetA) в качестве средств для терапии СД 2 типа. Данные антитела выполняют функцию специфических парциальных агонистов инсулинового рецептора, усиливая аутофосфорилирование, фосфорилирование тирозина субстрата инсулинового рецептора-1, что приводит к повышению утилизации глюкозы [Bhaskar V., 2012]. Создан препарат «Батион» на основе антител к С-концевому фрагменту  $\beta$ -субъединицы рецептора инсулина, оказывающий модулирующее действие на активность рецептора инсулина, а именно на активность С-концевого фрагмента  $\beta$ -субъединицы рецептора, являющегося сайтом прикрепления Shc [Петров В. И., 2009].

Активно исследуются высокоаффинные МА, антогонисты глюкагонового рецептора, например mAb В и mAb Ас. Данные антитела эффективно корректируют уровень глюкозы, не вызывая гипогликемии. Кроме того, следует отметить, что МА антагонисты глюкагонового рецептора компенсаторно увеличивают концентрация активного GLP-1, что вносит значительный вклад в сахароснижающее действие [Gu W., 2009].

## **1.5. Препараты с различными механизмами действия**

В последние несколько лет большое внимание уделяется новой группе, которая может применяться в терапии СД 2-го типа, ингиби-

торам Na<sup>+</sup>/глюкозный котранспортер типа 2 [Jabbour S.A., 2009]. Первым агентом, который применяется в качестве ингибитора Na/глюкозного котранспортера (SGLT) был флоризин. Однако он является неселективным по отношению к транспортерам супрессирует SGLT1 в желудочно-кишечном тракте, кроме того блокирует ГЛЮТ-1 и приводит к развитию такого побочного эффекта, как диарея, кроме того, данное вещество быстро разрушается кишечными  $\alpha$ -глюкозидазами. Для оптимизации биодоступности и селективности были синтезированы серглифлозин и ремоглифлозин селективные к SGLT-2, однако наличие в молекуле O-гликозида способствует быстрой деградации соединений в кишечнике и как следствие значительному снижению эффективности при пероральном приеме. Устойчивости к действию ферментов кишечника удалось достичь присоединением C-арилгликозидного фрагмента [Norton L., 2010; Chao E.C., 2010]. Дапаглифлозин, первый высокоселективный ингибитор Na/глюкозного котранспортера 2 – препарат нового класса, проходящий третью фазу клинических испытаний. Канаглифлозин и BI 10773 еще два соединения данной группы избирательно блокирующие SGLT2. Активно исследуются в качестве ингибиторов Na/глюкозного котранспортера вещества: TS-071, BI-44847, CSG-452, LX-4211, ASP-1941, DSP-3235 [Chao E.C., 2010].

Кроме того, ведется поиск соединений, оказывающих влияние на гормональную регуляцию среди агонистов D2 рецепторов (Bromocriptine); ингибиторов амилоида A (Eprodinate/NC-503); ингибиторов синтеза кортизола (DIO-902/2S,4R-ketoconazole); ингибиторов 11- $\beta$ -гидрокси-стероид-дегидрогеназы (INCB 13739); аналог гастрина (TT-223) [Levien T.L., 2009].

Перспективным направлением в создании лекарственных антидиабетогенных средств, восстанавливающих инсулинорезистентность, можно выделить поиск соединений, действие которых будет направлено на активность ферментов, прямо или косвенно обеспечивающих фосфорилирование каркасного белка IRS-субстрата инсулинового рецептора [Ткачук В.А., 2014].

Описанные в данной главе направления поиска пероральных сахароснижающих препаратов являются наиболее перспективными в области фармакотерапии сахарного диабета. Однако следует отметить, что поиск антидиабетических препаратов в будущем значительно расширится с получением новых данных о генетической основе и молекулярных механизмах патогенеза сахарного диабета.

Исследования, описанные в данной главе, выполнены в Волгоградском государственном медицинском университете при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-25-00139).

## ГЛАВА 2

# АНТИДИАБЕТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА

*А. А. Спасов, К. В. Ленская,  
П. М. Васильев, В. А. Анисимова*

---

Производные бензимидазола являются природными биологически активными соединениями, наиболее известный из которых – *N*-рибозил-диметилбензимидазол, аксиальный лиганд, координирующий кобальт в витамине В<sub>12</sub> [Barker H.A., 1960]. Кроме того, бензимидазол и его различные производные являются оптимальной базой для конструирования новых лекарственных веществ. Известно, что данные структуры входят в состав многих лекарственных средств, применяемых в клинической практике [Barker H.A., 1960]. Некоторые авторы относят его к так называемым «привилегированным» молекулам, соединениям, проявляющим несколько видов активности и используемых для поиска новых биологически активных веществ [DeSimone R.W., 2004].

В клинической практике нашли применение следующие лекарственные средства, созданные на основе бензимидазола: противоглистные препараты – мебендазол, немозол [Thakare P.V., 2011]; актопротекторы – этомерзол, бемитил; нейролептики – пимозид, домперидон; спазмолитики – дибазол; противоязвенные препараты, ингибиторы протонного насоса – омепразол, пантопразол, леминопразол; антигистаминные – астемизол, мизоластин, эмидастин [Спасов А.А., 1999], транквилизатор – афобазол [Середенин С.Б.].

Производные бензимидазола проявляют широкий спектр биологической и фармакологической активности, в том числе – антибактери-

альную, противопаразитарную, антигистаминную, противосудорожную, противовоспалительную, гипотензивную, противоопухолевую [Arulmurugan S., 2013], противогрибковую, противотуберкулезную, антигерпесвирусную и противовирусную в отношении гепатита С и В [Mishra A., 2010];  $\delta$ -опиоидную агонистическую [Salvadori S., 2009]. Для бензимидазолов также характерна антисеротониновая [Спасов А.А., 2006, Яковлев Д.С., 2016]; антиагрегантная, антитромботическая [Кучерявенко А.Ф., 2013] и антиоксидантная активности [Косолапов В.А., 2013].

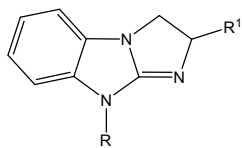
Противодиабетическая активность производных бензимидазола – один из видов фармакологической активности, который привлекает многих исследователей, так как дает возможность создания лекарственных средств для лечения сахарного диабета. Так, известно, что антигельминтный препарат вермокс [Carpió S., 1984] оказывает сахароснижающее действие, что послужило толчком в изучении гипогликемических свойств данной химической группы [Owen O.E., 1985]. В связи с этим были проведены многочисленные исследования по выявлению гипогликемических свойств среди производных конденсированных бензимидазолов [Спасов А.А., 1999].

В настоящее время все технологии, используемые для поиска новых препаратов для снижения уровня сахара в крови при сахарном диабете, представлены несколькими направлениями. Одно из них – это изучение гипогликемических или антидиабетогенных свойств в узких рядах конденсированных и неконденсированных бензимидазолов.

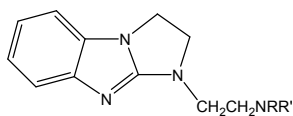
Так, показано [Анисимова В.А., 1987], что 2,3-дигидроимидазо[1,2-а]-бензи-мидазолы (I) проявляют гипогликемическую активность. Установлено, что при введении в базовую структуру (I) в качестве заместителей R метила, этила или бутила максимальный гипогликемический эффект соединений развивался к 4 часу. Если же заместителями R были пропил или пиперидиноэтил, то максимальный эффект развивался ко 2 часу. Все производные 2,3-дигидроимидазо[1,2-а]-бензимидазола (I) превосходили препарат сравнения хлорпропамид (4-хлор-N-[(пропиламино)карбонил]бензолсульфон-амид) по



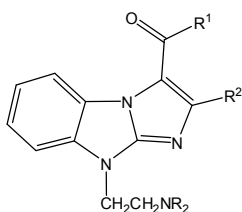
гипогликемическому действию, однако они были менее эффективны, чем другой препарат сравнения – буформин (1-бутилбигуанид).



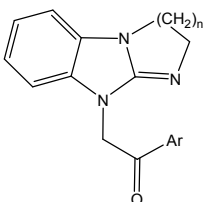
I



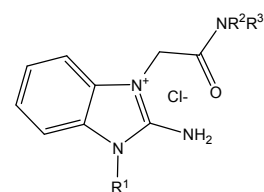
II



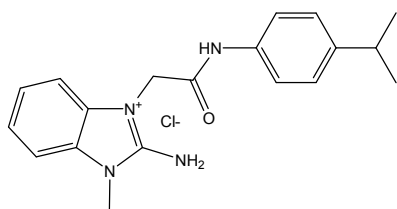
III



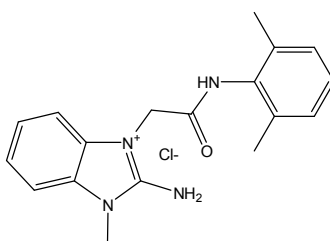
IV



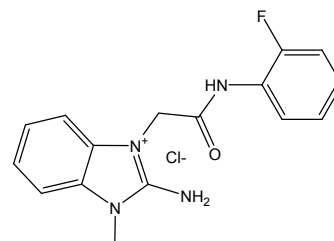
V



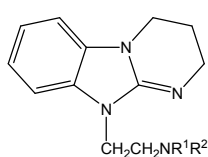
VI



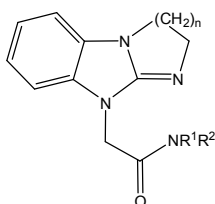
VII



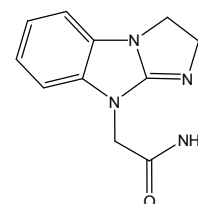
VIII



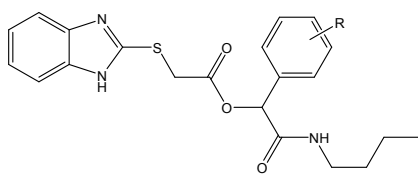
IX



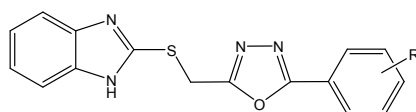
X



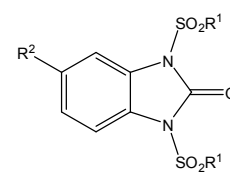
XI



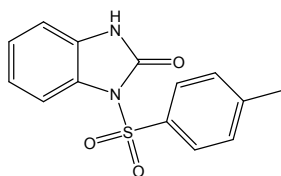
XII



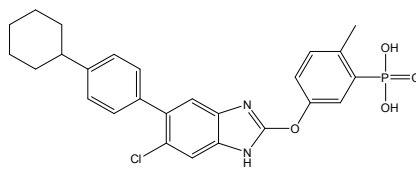
XIII



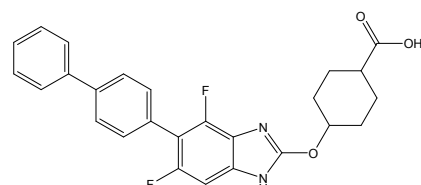
XIV



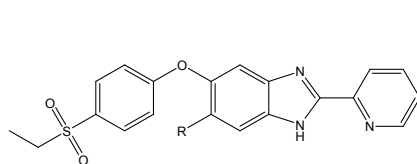
XV



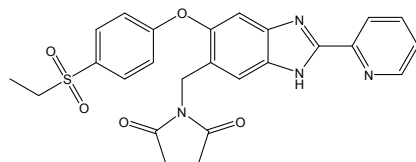
XVI



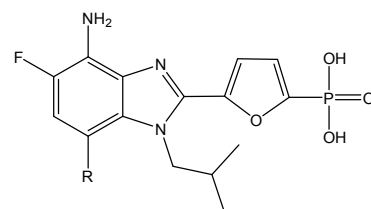
XVII



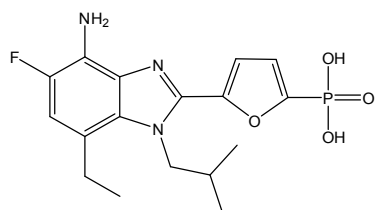
XVIII



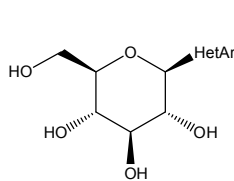
XIX



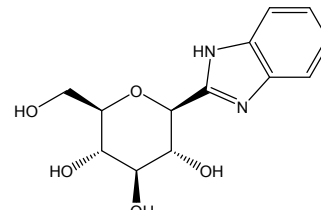
XX



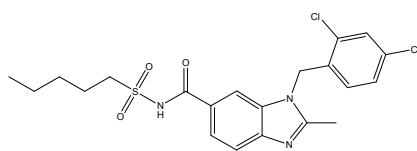
XXI



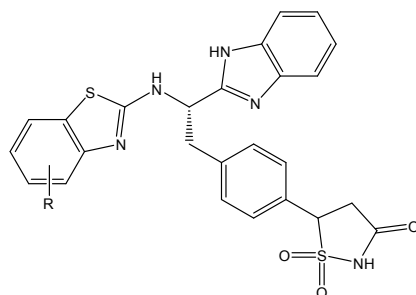
XXII



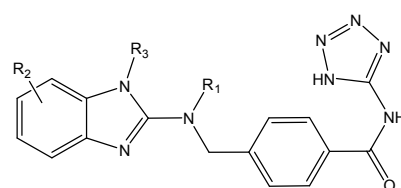
XXIII



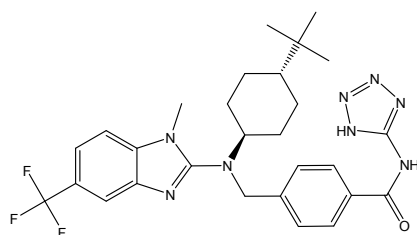
XXIV



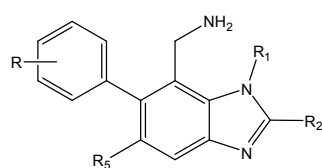
XXV



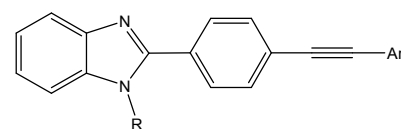
XXVI



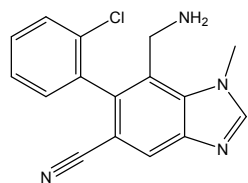
XXVII



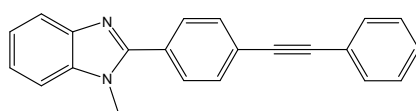
XXVIII



XXIX



XXX



XXXI

В продолжение работ по поиску и изучению гипогликемической активности среди производных 2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола были синтезированы и изучены производные 1-аминоэтил-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола (II). Эти соединения отличались от ранее исследованных производных перемещением заместителя из положения N<sup>9</sup> в положение N<sup>1</sup>. В работе [Анисимова В.А.,

1988] была подробно изучена гипогликемическая активность новых производных (II). Выяснено, что дигидрохлориды изучаемых соединений (II), имеющие в качестве заместителя NRR' пирролидин или пиперидин, вызывают статистически значимое снижение уровня сахара в крови, причем превосходят по активности препараты сравнения хлорпропамид и буформин. Проведенные исследования также показали, что введение в качестве NRR' морфолина, циклогексиламина или фениламина дает сахароснижающий эффект, сопоставимый с эффектом препарата сравнения хлорпропамида.

Более поздние работы [Анисимова В.А., 2002] также подтвердили гипогликемический потенциал бензимидазолов. Была экспериментально изучена гипо-гликемическая активность 3-(ароил)- и 3-(гетароил)имидазо[1,2-а]-бензимидазолов (IV). При изучении фармакологических свойств этих производных выяснили, что не все исследуемые вещества оказывают гипогликемическое действие. Из 14 веществ через 4 часа после введения статистически достоверный гипогликемический эффект проявляют шесть соединений. При этом соединения, содержащие в положении N<sup>9</sup> диэтиламиноэтил, были более активны, чем пиперидиноэтильные производные.

В дальнейшем был осуществлен синтез и изучена фармакологическая активность ароилметилзамещенных конденсированных трициклических бензимидазолов (V) [Анисимова В.А., 2007]. Показано, что большинство из изученных соединений в той или иной степени снижают содержание глюкозы в крови. Самыми активными оказались вещества, в структуру которых в качестве арильного заместителя входил 4-гидрокси-фенильный радикал. Эти соединения оказывали стойкий сахароснижающий эффект, существенно превосходящий активность препарата сравнения хлорпропамида.

При введении ацетамидной группировки в различные гетероциклы были получены соединения с широким спектром фармакологического действия, включая гипогликемические свойства [Анисимова В.А., 2012]. Показано, что среди хлоридов 3-(N,N-дизамещенных) ацетамидо-N<sup>1</sup>-замещенного 2-амидобензимидазолия (VI) есть веще-

ства с высоким и длительным гипогликемическим эффектом. Наиболее высокую гипогликемическую активность в течение 6 часов показали два соединения, включающие липофильный фрагмент  $NR^2R^3$ , в качестве которого выступал фенил с присоединенными к нему электроположительными заместителями (4-изопропил, 2,6-диметил), при одновременном наличии алкила в положении  $R^1$ .

Эти вещества (VII) и (VIII) по силе действия превосходили препараты сравнения – глибенкламид (5-хлор-N-(4-[N-(циклогексилкарбамоил)сульфамоил]фенетил)-2-метоксибензамид) и метформин (N,N-диметилимиддикарбоимиддиамид). При замене в бензольном кольце электроположительных алкильных заместителей на электроотрицательный фтор гипогликемическая активность соединений снижалась. Так, вещество (IX) по длительности и уровню гипогликемического эффекта уже не превосходило, а только лишь было сопоставимо с препаратом сравнения глибенкламидом.

При изучении 10-диалкиламиноэтил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а] бензимидазолов (X) было установлено, что для исследованных соединений характерно наличие гипогликемического действия [Анисимова В.А., 2012].

N-ацетамидные производные конденсированных трициклических бензимидазольных систем, имеющие в своем составе внешнее гидрированное имидазольное или пиримидиновое кольцо (XI), также проявляют гипогликемическую активность. Из 20 испытанных соединений девять по степени снижения уровня глюкозы превосходят препарат сравнения метформин [Shaikh I., 2012]. В проведенных экспериментах [Shaikh I., 2012] было установлено, что замещенные амиды 2,3-дигидро-имидазо- и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]-бензимидазолил-N-уксусной кислоты (XI) проявляют гипогликемическую активность с разной степенью выраженности эффекта. Соединения, имеющие в качестве заместителя  $NR^1R^2$  аминогруппу или пиперидин, стабильно в течение 6 часов снижали уровень сахара в крови. Наиболее активное соединение (XII) существенно превосходило по активности препарат сравнения метформин

и было сравнимо по силе гипогликемического действия с глибенкламидом.

Ряд производных бензимидазола, проявляющих гипогликемическую и антидиабетическую активность, относятся к производным меркаптобензимидазола. Так, в работе [Shingalapur R.V., 2010] исследованы производные 1*H*-бензимидазол-2-ил-сульфанил-уксусной кислоты в форме эфиров амида миндальной кислоты (XIII). На модели аллоксанового диабета установлено, что на девятый день введения этих соединений отмечается выраженный гипогликемический эффект. Наибольшая активность соединений проявляется при введении в структуру (XIII) следующих групп: 2-OCH<sub>3</sub>; 4-OCH<sub>3</sub>; 4-NO<sub>2</sub>; 4-Cl; 2,4-Cl. Для этих же веществ характерно снижение толерантности к глюкозе.

В работе [Goswami B., 2012] показано, что производные 2-(5-фенил-[1,3,4]-оксадиазол-2-илметилсульфанил)-1*H*-бензимидазола (XIV) проявляют гипогликемическую активность. Данная фармакологическая активность была подтверждена в экспериментальных исследованиях на интактных крысах, результаты были положительными [Ahmad I., 2002]. Среди изученных соединений (XIV) авторы [Shingalapur R.V., 2010] выделили четыре меркаптопроизводных бензимидазола (R = 2-OH; 4-OH; 4-NO<sub>2</sub>; 2-Cl, 4-NO<sub>2</sub>), которые по антидиабетической активности соотносились с препаратом сравнения – глибенкламидом. Данные были получены на модели аллоксанового сахарного диабета, уровень глюкозы измерялся на девятый день. Кроме того, шесть соединений (R = 2-OH; 4-OH; 4-OCH<sub>3</sub>; 4-Cl; 4-NO<sub>2</sub>; 2-Cl, 4-NO<sub>2</sub>) были также активны при проведении глюкозотолерантного теста, отмечено снижение толерантности к глюкозе, сопоставимое с эффектом референсного препарата глибенкламида.

В исследованиях [Achmad I., 2002] была изучена и подтверждена антидиабетическая активность N,N-ди(арил-сульфонил)-бензимидазолов (XV) в тесте на секрецию инсулина в культуре клеток INS-1. Наиболее активным оказалось соединение (XVI), в структуре которого отсутствовали одна группа SO<sub>2</sub>R<sup>1</sup> и заместитель R<sup>2</sup>, а вторая группа SO<sub>2</sub>R<sup>1</sup> = 4-толуилсульфонил.

Современный уровень научных исследований этиологии и патогенеза сахарного диабета позволяет находить новые мишени для поиска антидиабетических соединений и создавать новые классы лекарственных средств для пероральной сахароснижающей терапии. Следует отметить многоаспектность поиска лекарственных средств и условно выделить следующие основные направления: регуляция ключевых ферментов углеводного обмена, активация ферментов гликолиза и синтеза гликогена (гликогенсинтетазы, гексокиназы) и ингибирование ферментов глюконеогенеза и гликогенолиза (гликогенфосфорилаза, фруктозобифосфатаза) [Fei F., 2013]. Таким образом, в настоящее время одним из наиболее перспективных подходов разработки антидиабетических средств является мишень ориентированный поиск.

цАМФ-активируемая протеинкиназа (АМРК) участвует в регуляции метаболизма углеводов и жирных кислот. В настоящее время синтезирован ряд дифенильных производных бензимидазола – активаторов АМРК [Ishikawa M., 2009], которые в дальнейшем могут быть испытаны при диабете второго типа, ожирения, при метаболическом синдроме, гипертензии. Наиболее активные соединения (XVII, XVIII) имеют  $IC_{50} = 4,9 \text{ nM}$  и  $IC_{50} = 10,0 \text{ nM}$ , соответственно.

Известно, что глюкокиназа является ферментом, который лимитирует скорость метаболизма глюкозы в клетках и играет ключевую роль в гомеостазе глюкозы во всем организме. Исследования [Takahashi K., 2009] показали, что производные 2-(пиридин-2)-ил-1H-бензимидазола (XIX) являются эффективными активаторами глюкокиназы, тем самым снижая уровень сахара в крови. Тест *in vitro* на культуре *E. coli* с экспрессированной рекомбинантной глюкокиназой человека был проведен с использованием двух концентраций глюкозы: 2,5 и 10,0 мкМ, вызывающих низкий и высокий пострандиальный уровень глюкозы в крови [Dang Q., 2010]. Одно из наиболее активных соединений (XX) в дозе 1 мг/кг при глюкозотолерантном тесте у крыс показало высокую гипогликемическую активность.

Превращение фруктозо-1,6-бисфосфата во фруктозо-6-фосфат катализируется ферментом фруктозо-1,6-бисфосфатазой. Это ключевой

фермент, стимулирующий глюконеогенез и участвующий в образовании гликогена из пирувата и триозофосфатов. При ингибировании данного фермента происходит угнетение глюконеогенеза и стимуляция гликолиза. Dang описал ингибиторы фруктозо-1,6-бисфосфатазы в ряду соединений (XXI), синтезированных по результатам мишень-ориентированного дизайна [Minoura H., 2004]. Чтобы определить, снижают ли ингибиторы фруктозо-1,6-бисфосфатазы уровень глюкозы в крови, был проведен тест *in vivo* на модели сахарного диабета второго типа у крыс с ожирением. Наиболее активное вещество (XXII) вводили в хвостовую вену в дозе 10 мг/кг/ч. Это приводило к снижению концентрации глюкозы в крови на протяжении 6 часов, которое было обусловлено подавлением процессов гликогенолиза. Было предположено, что в дальнейшем изучение ингибиторов данного фермента можно рассматривать, в качестве потенциальных антидиабетических средств.

В проведенных исследованиях [Goswami B., 2012] показано, что гетероциклические производные D-глюкопиранозы (XXIII), в частности, бензимидазола (XXIV), являются ингибиторами гликогенфосфоорилазы и снижают уровень сахара в крови.

Нормализация механизмов биологического действия инсулина и снижение инсулиновой резистентности периферических тканей возможно посредством модуляции активности рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом (PPAR- $\gamma$ ), одного из регуляторов метаболизма углеводов, жиров и белков [Fei F., 2013].

Так, в работе [Sparks R., 2007] было изучено соединение FK614 (XXV), которое снижало инсулиновую резистентность за счет того, что являлось агонистом PPAR- $\gamma$ . В экспериментах на мышцах линии C57BL/6J-ob/ob значения ЭД<sub>50</sub> для соединения FK614 и пиоглитазона для гипоинсулинемического эффекта были 1,3 и 11,8 мг/кг, соответственно. В экспериментах на мышцах линии C57BL/KsJ-db/db по степени снижения концентрации глюкозы в плазме крови изучаемое соединение было сопоставимо с росиглитазоном: величины ЭД<sub>50</sub> составили 2,3 и 1,3 мг/кг, соответствен-

но. Однако у интактных крыс соединение FK614 не снижало уровень сахара в крови, но снижало количество триглицеридов и жирных кислот.

Известно, что дефосфорилирование инсулинового рецептора, наступающее под воздействием протеинтирозинфосфатазы 1B, сопровождается деактивированием сигнальных путей действия инсулина. В работе [Kim R.M., 2008] показана высокая ингибирующая активность в отношении данного фермента у производных бензимидазола (XXVI).

Снижение эффекта инкретинов – один из важных дефектов, приводящий к снижению глюкозозависимой секреции инсулина [Kim R. M., 2008]. В последнее десятилетие благодаря фундаментальным и клиническим исследованиям в данной области развилось новое и перспективное направление в лечении СД 2-го типа, базирующееся на использовании инкретинового эффекта.

В работе [Wallace M. B., 2008] установлено, что изученные бензимидазолы (XXVII) являются антагонистами глюкагоноподобного пептида (GLP-1). Известно, что он стимулирует секрецию инсулина и ингибируют секрецию глюкагона, тормозит процессы апоптоза  $\beta$ -клеток поджелудочной железы и усиливают их регенерацию, что позволяет достичь пролонгированного эффекта и воздействовать на одно из звеньев патогенеза заболевания. Наиболее активное вещество (XXVIII) при пероральном применении, на модели стрептозотоцинового сахарного диабета, значительно снижало уровень сахара в крови.

Известно, что ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4) являются инкретиномиметиками и стимулируют секрецию инсулина. Были сконструированы *in silico*, синтезированы и изучены на активность в отношении ДПП-4 производные 6-фенилзамещенного бензимидазола (XXIX) [R. Vinodkumar, 2008] и 2-фенилэтинил замещенного бензимидазола (XXX). Среди испытанных соединений (XXIX) самое активное вещество (XXXI) имеет  $IC_{50} = 0,008 \mu M$  [37]. Среди соединений (XXX) наибольшей ингибирующей ДПП-4 активностью



обладает 1-метил-2-(4-фенилэтинил-фенил)-1H-бензимидазол (XXX-II), в дальнейшем он может быть изучен как потенциальное антидиабетическое средство [Somsák L., 2003].

В заключение необходимо отметить, что описанные в данной главе направления поиска пероральных сахароснижающих препаратов являются наиболее перспективными для поиска и создания лекарственных средств с целью фармакотерапии сахарного диабета второго типа. Однако следует подчеркнуть, что поиск гипогликемических и антидиабетических средств в будущем значительно расширится с получением новых данных о генетической основе и молекулярных механизмах патогенеза сахарного диабета второго типа.

Исследования, описанные в данной главе, выполнены в Волгоградском государственном медицинском университете при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-25-00139).

# ГЛАВА 3

## СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА И КОНДЕНСИРОВАННЫХ СИСТЕМ НА ЕГО ОСНОВЕ

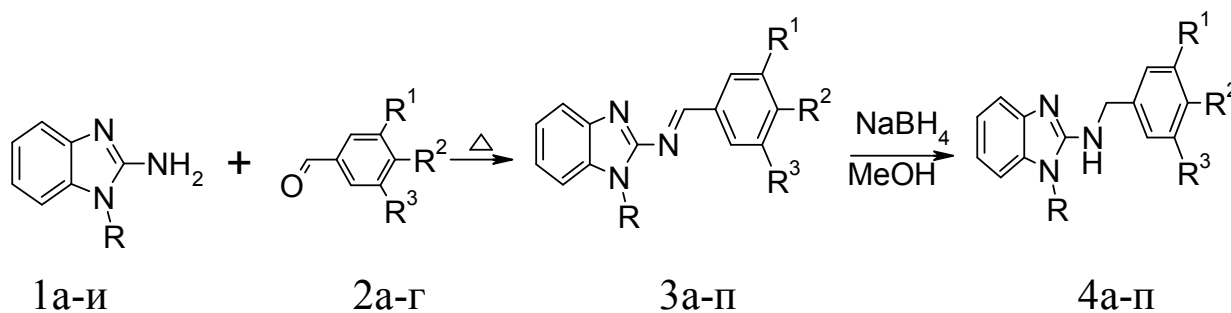
*В. А. Анисимова, О. Н. Жуковская, Т. А. Кузьменко*

---

Скаффолд бензимидазола относится к привелигированным подструктурам, модификация которых позволяет создать новые биологические активные соединения. Приведенные в главе 3 данные о способности производных бензимидазола позитивно влиять на различные механизмы развития экспериментального сахарного диабета, свидетельствуют о перспективности синтеза новых производных данных структур.

### 3.1. Синтез 1-замещенных-2-бензиламинобензимидазолов с метоксигруппами в фенильном кольце

Конденсация 2-аминобензимидазолов 1а-и с альдегидами 2а-г гладко протекает в кипящем толуоле и приводит к образованию азометинов 3а-п. Восстановление этих соединений борогидридом натрия в метаноле при 25 °С, приводит к образованию 1-замещенных-2-бензиламинобензимидазолов 4а-п.



1, R=H(а); CH<sub>3</sub>(б); All(в); CH<sub>2</sub>Ph(г); 2-пиперидиноэтил (д); 2-морфолиноэтил (е), 2-диэтиламиноэтил (ж), 2-диметиламиноэтил (з); 3-диметиламинопропил (и).

2, R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H. R<sub>2</sub>=OMe (а); R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OMe (б); R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OMe (в); R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OCH<sub>2</sub>O(г). 3, 4, R=CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>=R<sub>3</sub>=H, R<sub>2</sub>=OMe (а); R=CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OMe (б); R=CH<sub>2</sub>Ph, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OMe (в); R=2-пиперидиноэтил, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OMe(г); R=2-морфолиноэтил, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OMe (д); R=2-диэтиламиноэтил, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OMe (е); R=2-диметиламиноэтил, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OMe (ж); R=3-диметил аминопропил, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OMe (з); R=H, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OMe (и); R=All, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OMe (к); R= 2-пиперидиноэтил, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OMe (л); R=2-морфолиноэтил, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OMe (м); R=2-диэтиламиноэтил, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OMe (н); R=2-пиперидиноэтил, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OCH<sub>2</sub>O (о); R=2-морфолиноэтил, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=OCH<sub>2</sub>O (п).

Спектры ЯМР <sup>1</sup>H соединений 3,4а-п характеризуются рядом общих сигналов. Так, протон азометиновой группы в соединениях 3а-о проявляется в виде синглета (9,41–9,48 м.д.). Аминометильная группа в соединениях 4а-п наблюдается сигналами аминогруппы (триплет при 4.10–7.5, 9.0, 10.05 м.д.) и связанной с ней метильной группы (дублет при 4.60 – 4.65 м.).

**Общая методика синтеза** соединений 3а-п и 4а-п проиллюстрирована получением соединений 3д и 4д.

**N-[(3,4-диметоксифенил)метилен]-1-(2-морфолин-4-илэтил)-1H-бензимидазол-2-амин (3д).** В горячий раствор 1,23 г (5 ммоль) 1-(2-морфолиноэтил)-1H-бензимидазол-2-амин (1е) в 12 мл толуола вносят 0,83 г (5 ммол) вератрового альдегида и каталитическое количество п-толуолсульфокислоты, смесь кипятят несколько часов, следя за ходом реакции с помощью ТСХ по исчезновению пятна исходного амина. Затем реакционную массу охлаждают, пропускают через небольшой слой силикохрома (элюент – хлороформ) и испаряют толуол на воздухе при комнатной температуре. Получают 1,57 г (79,4 %) соединения 3д, которое перекристаллизовывают из ацетонитрила.

**N-(3,4-диметоксибензил)-1-(2-морфолин-4-илэтил)-1H-бензимидазол-2-амин (4д).** Борогидрид натрия (0,37 г, 10 Ммол) добавляют при перемешивании при комнатной температуре к раствору 1,5 г (0,004 мол) соединения 3д в 20 мл метанола. Смесь выдерживают при комнатной температуре восемь часов. Реакционную массу обрабатывают разбавленной соляной кислотой (1:1) для удаления избытка борогидрида натрия до рН 2-3 и упаривают досуха. Затем осадок обрабатывают 22 % аммиаком, отфильтровывают, промывают водой, сушат на воздухе. Вещество очищают с помощью колоночной ТСХ. Выход соединения 4д 1,45 г (79,9 %). Данные ЯМР <sup>1</sup>H спектров полученных соединений 3а-п и 4а-п приведены в табл. 3.1.

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  синтезированных соединений

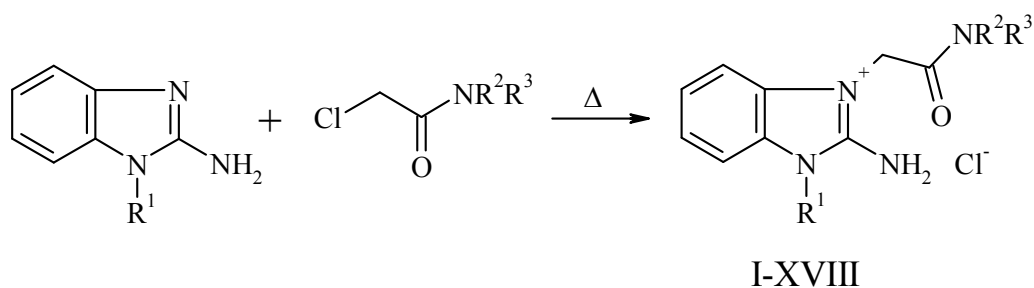
Соединение	Химические сдвиги, м.д.
3а	3,9 (с, 3Н, N- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 3,92 (с, 3Н, OCH), 7,0 - 8,02(м, 8Н, аром. Н ), 9,45 (с, 1Н, =CH).
3б	3,93 (с, 3Н, N- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 3,98, 4,0 (с, 6Н, 2 х OCH <sub>3</sub> ), 6,96 -7,73 (м, 7Н, аром. Н), 9,42 (с, 1Н, =CH).
3в	3,97 (с, 6Н 2 х OCH <sub>3</sub> ), 5,61 (с, 2Н, N-CH <sub>2</sub> ), 6,95 – 7,7 (м, 12Н, аром. Н), 9,48 (с, 1Н, =CH).
3г	прот. пипер. 1,4-1,58 ( м, 6Н, 3хCH <sub>2</sub> ), 2,52-2,55 (м, 4Н, CH <sub>2</sub> -N-CH <sub>2</sub> ), 2,73 -2,77 (т, 2Н, CH <sub>2</sub> ), 3,95, 3,98 (с, 6Н, 2 х OCH <sub>3</sub> ), 4,5 (т, 2Н, CH <sub>2</sub> ), 6,9 -7,7 ( м, 7Н, аром. Н ), 9,41 (с, 1Н, =CH )
3д	прот. морфол. 2,54 (т, 4Н, CH <sub>2</sub> -N-CH <sub>2</sub> ), 3,5 (ш. с, 4Н, CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> ), 2,78 (т, 4Н, CH <sub>2</sub> ), 3,97, 3,98 (с, 6Н, 2 х OCH <sub>3</sub> ), 4,52 (д, 2Н, NH- $\underline{\text{CH}_2}$ ), 6,97- 7,73 (м, 7Н, аром. Н ), 9,42 (с, 1Н, =CH ).
3е	1,03-1,08 (т, 6Н, 2х CH <sub>2<math>\underline{\text{CH}_3}</math>), 2,64-2,66 (к, 4Н, 2 х CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2,83-2,88 (т, 2Н, CH<sub>2</sub>), 3,98 (с, 6Н, 2 х OCH<sub>3</sub>), 4,44-4,49 (т, 2Н, CH<sub>2</sub>), 6,96 - 7,7 (м, 7Н, аром Н), 9,43 (с, 1Н, =CH).</sub>
3ж	2,34 (д, 6Н, NCH <sub>3</sub> ), 2,75(т, CH <sub>2</sub> ), 3,95, 3,98 (с, 6Н, 2 х OCH <sub>3</sub> ), 4,51 (т, 2Н, CH <sub>2</sub> ), 6,97 - 7,7(м, 7Н, аром. Н), 9,42 (с, 1Н, =CH).
3з	2,09-2,13 (т, 2Н, CH <sub>2</sub> ), 2,71(т, 6Н, NCH <sub>3</sub> ), 3,17(ш. с, CH <sub>2</sub> ), 3,69, 3,75(с, 6Н, OCH <sub>3</sub> ), 4,3(т, 2Н, CH <sub>2</sub> ), 4,6 (д, 2Н, NH $\underline{\text{CH}_2}$ ), 6,9 - 7,7 (м, 7Н, аром. Н), 9,9(ш. с, 1Н, NH $\underline{\text{CH}_2}$ ), 9,42 (с, 1Н, =CH)
3и	3,83, 3,87, 3,93 (с, 9Н, 3 х OCH <sub>3</sub> ), 7,18-7,6 (м, 6Н, аром. Н ), 9,47 (с, 1Н, =CH ) 10,0 (ш. с, 1Н, NH).
3к	3,93, 3,95, 3,96 (с, 9Н, 3 х OCH <sub>3</sub> ), прот. аллил. рад. 5,03-5,06 (м, 2Н), 5,15-5,25 (м, 2Н), 5,97-6,06 (м, 1Н), 7,23-7,75 ( м, 6Н аром. Н), 9,42 (с, 1Н, =CH).
3л	прот. пипер. 1,42-1,50 ( м, 6Н, 3хCH <sub>2</sub> ), 2,55-2,57 (м, 4Н, CH <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> ), 2,73-2,77 (т, 2Н, CH <sub>2</sub> ), 3,95, 3,98, 4,0 (с, 9Н, OCH <sub>3</sub> ), 4,5 (т, 2Н, CH <sub>2</sub> ), 6,9-7,7 ( м, 6Н, аром. Н), 9,41 (с, 1Н, =CH).
3м	прот. морфол. 2,54-2,57 (т, 4Н, CH <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> ), 3,5-3,6 (т, 4Н, CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> ), 2,77-2,8, 4,5-4,55 (т, 4Н, 2 х CH <sub>2</sub> ), 3,92, 3,94, 3,95 (с, 9Н, 3 х OCH <sub>3</sub> ), 7,24-7,7 (м, 6Н, аром. Н), 9,41 (с, 1Н, =CH).
3н	1,04-1,08 (т, 6Н, CH <sub>2</sub> $\underline{\text{CH}_3}$ ), 2,61-2,68 ( к, 4Н, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2,83-2,88 (т, 2Н, CH <sub>2</sub> ), 3,92, 3,94, 3,95 (с, 9Н, 3 х OCH <sub>3</sub> ), 4,45-4,49 (т, 2Н, CH <sub>2</sub> ), 7,3-7,7 (м, 6Н, аром .Н). 9,43 ( с, 1Н, =CH )
3о	прот. пипер. 1,4-1,5 (м, 6Н, 3хCH <sub>2</sub> ), 2,49-2,52 (т, 4Н, CH <sub>2</sub> -N-CH <sub>2</sub> ), 2,8, 4,5 ( т, 4Н, 2 х CH <sub>2</sub> ), 6,08 (с, 2Н, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -O ), 6,9-7,7 (м, 7Н, аром. Н), 9,45, (с, 1Н, =CH).
3п	прот. морфол. 2,4-2,6, 3,1-3,4 (ш.с, 8Н), 2,7, 3,8 (т, 4Н, CH <sub>2</sub> ), 6,05 (с, 2Н, O- $\underline{\text{CH}_2}$ -O), 6,9-7,7 (м, 7Н, аром. Н), 9,42 (с, 1Н, =CH).
4а*	3,5 (с, 3Н, N- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 3,72 (с, 3Н, OCH <sub>3</sub> ), 4,83 ( ш.с., 2Н, NH- $\underline{\text{CH}_2}$ ), 6,6 -7,62 (м, 8Н, аром. Н), 9,87 (ш. с., 1Н, NH $\underline{\text{CH}_2}$ ), 13,45 (ш.с., 1Н, HCL).
4б	2,95 (с, 3Н, N- $\underline{\text{CH}_3}$ ), 3,85, 3,87 (с, 6Н, 2 х OCH <sub>3</sub> ), 4,3 (т, 1Н, NH- $\underline{\text{CH}_2}$ ), 4,65 (д, 2Н, NH- $\underline{\text{CH}_2}$ ), 6,85-7,5(м, 7Н, аром. Н)

Окончание таблицы 3.1

Соединение	Химические сдвиги, м.д.
4в	3,75, 3,85(с, 6H, 2 x OCH <sub>3</sub> ), 4,1 (т, 1H, <u>NH-CH</u> ), 4,6(д, 2H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 5,1с, 2H, <u>CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub></u> ), 6,78-7,55 (м, 12H, аром. H)
4г	прот. пипер. 1,2 (ш. с., 6H, 3 x CH <sub>2</sub> ), 2,38 (ш. с, 4H, CH <sub>2</sub> -N-CH <sub>2</sub> ), 2,6, 3,95 (т, 4H, 2 x CH <sub>2</sub> ) 3,95 (с, 6H, 2 x OCH <sub>3</sub> ), 4,6 (т, 2H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 6,8-7,5 (м, 7H, аром. H), 7,9 (т, 1H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ).
4д	прот. морфол. 2,4 (т, 4H, CH <sub>2</sub> -N-CH <sub>2</sub> ), 3,3 (ш. с, 4H, CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> ), 2,7, 3,95 (т, 4H, 2 x CH <sub>2</sub> ), 3,85, 3,88 (с, 6H, 2 x OCH <sub>3</sub> ), 4,6 (д, 2H, <u>NH-CH<sub>2</sub></u> ), 6,8-7,5 (м, 7H, аром. H), 7,4 (т, 1H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> )
4е*	1,22-1,26 (т, 6H, <u>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></u> ), 3,2 - 3,4 ( м, 4H, <u>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></u> ), 3,41-3,43 (м, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3,9, 3,8, (с, 6H, 2 x OCH <sub>3</sub> ), 4,63 -4,65 (д, 2H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 4,77-4,82 ( д, 2H, CH <sub>2</sub> ), 7,0 -7,8 (м, 7H, аром. H), 10,05 ( ш. с, 1H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 11,1, 13,6 (с, 2H, HCl)
4ж*	2,88 (д, 6H, <u>NCH<sub>3</sub></u> ), 3,35(с, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3,72, 3,77(с, 6H, 2 x OCH <sub>3</sub> ), 4,63-4,78(м, 4H, 2x CH <sub>2</sub> ), 6,9 - 7,8(м, 7H, аром. H), 10,1 (ш.с, 1H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 11,17, 13,7 (ш.с, 2H, 2HCl).
4з*	2,09-2,13 (т, 2H, CH <sub>2</sub> ), 2,71 (т, 6H, 2 xCH <sub>3</sub> ), 3,17 ( ш. с, CH <sub>2</sub> ), 3,69, 3,75(с, 6H, 2 x OCH <sub>3</sub> ), 4,3 (т, 2H, CH <sub>2</sub> ), 4,6(д, 2H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 6,9-7,7 (м, 7H, аром. H), 9,9(ш. с, 1H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 10,7, 13,6 ( ш с, 2H, 2HCl)
4и *	3,61, 3,62, 3,76 (с, 9H, 3 x OCH <sub>3</sub> ), 4,55 ( д, 2H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 6,8-7,4 ( м, 6H, аром. H), 9,5 ( т, 1H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 12,9 (ш. с, 2H, NH, HCl)
4к*	3,65 (с, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3,8 (с, 6H, 2 x OCH <sub>3</sub> ), 4,65 (д, 2H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 4,9 ( д, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5,2 ( т, 2H, CH <sub>2</sub> ), 5,9-6,0 (м, 1H, =CH), 6,9-7,5 (м, 7H, аром. H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 9,5 (ш. с 1H, HCl)
4л	прот. пипер. 1,2 (ш. с., 6H, 3 x CH <sub>2</sub> ), 2,38 (ш. с, 4H, CH <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> ), 2,6, 3,9 (т, 4H, CH <sub>2</sub> ), 3,75(с, 3H, OCH <sub>3</sub> ), 3,95 (с, 6H, OCH <sub>3</sub> ), 4,6(т, 2H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 6,8-7,5 (м, 6H, аром. H), 7,9 (т, 1H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ).
4м*	3,5, 3,6, 3,7 (с, 9H, 3 x OCH <sub>3</sub> ), прот. морфол., CH <sub>2</sub> (3,8-4,0, ш. с, 10H), 4,65 (д, 2H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 4,9 (ш.с. 2H, CH <sub>2</sub> ), 7,1 -7,9(м, 6H, аром. H), 10,5 (ш. с, 1H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 12,2, 13,8 ( ш. с, 2H, HCl).
4н*	1,22-1,26 (т, 6H, <u>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></u> ), 3,2 - 3,4 ( м, 4H, <u>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></u> ), 3,41-3,43(м, 2H, CH <sub>2</sub> ), 3,9, 3,8, 3,78(с, 9H, 3 x OCH <sub>3</sub> ), 4,63 -4,65(д, 2H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 4,77-4,82 ( д, 2H, CH <sub>2</sub> ), 7,0 -7,8 (м, 6H, аром. H), 10,05( ш. с, 1H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 11,1, 13,6(с, 2H, 2HCl)
4о	прот. пипер. 1,2-1,3(ш. с, 6H, 3 x CH), 2,3 -2,4(т, 4H, CH <sub>2</sub> -N-CH <sub>2</sub> ), 2,6, 3,9(т, 2H, 2 x CH <sub>2</sub> ), 4,6 (д, 4H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 5,9 (с, 2H, O- <u>CH<sub>2</sub></u> -O), 6,7-7,5 м, 7H, аром. H), 8,0( т, 1H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ).
4п	прот. морфол. 2,4-2,5( ш с, 4H, CH <sub>2</sub> -N-CH <sub>2</sub> ) 3,3 -3,34(ш. с, 4H, CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> ), 2,7, 3,95 (т, 4H, 2 x CH <sub>2</sub> ), 4,6(с, 2H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ), 5,95(с, 2H, O- <u>CH<sub>2</sub></u> -O), 6,8-7,5 (м, 8H, аром. H, <u>NHCH<sub>2</sub></u> ).

### 3.2. Синтез хлоридов 1-R<sub>1</sub>-3-(NR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>-ацетамидо)-2-аминобензимидазолия

Ацетамиды I-XVIII синтезированы кипячением 1-алкил(аралкил)-2-аминобензимидазолов с N,N-дизамещенными хлорацетамидами в ацетонитриле или бутан-2-оне. Образующиеся четвертичные соли выделяются из реакционной массы с хорошими выходами. Реакцию можно проводить и в ацетоне, но при этом значительно увеличивается время ее протекания.



I-IX: R<sup>1</sup>=Me, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>=NH<sub>2</sub> (I), N(Me)Ph (II), NEt<sub>2</sub> (III), N(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> (IV), NHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>F-2 (V), NHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CF<sub>3</sub>-2 (VI), NHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CHMe<sub>2</sub>-4 (VII), NHC<sub>6</sub>H<sub>3</sub>Me<sub>2</sub>-2,6 (VIII), NHC<sub>6</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>-3,5 (IX); X-XII: R<sup>1</sup>=Bu, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>=NHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CF<sub>3</sub>-2 (X), NHC<sub>6</sub>H<sub>3</sub>Me<sub>2</sub>-2,6 (XI), NHC<sub>6</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>-3,5 (XII); XIII-XV: R<sup>1</sup>=All, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>=NH<sub>2</sub> (XIII), NEt<sub>2</sub> (XIV), NHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OEt-4 (XV); XVI-XVIII: R<sup>1</sup>=Bzl, NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>=NEt<sub>2</sub> (XVI), N(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> (XVII), NHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>F-4 (XVIII).

Структура полученных солей подтверждается ЯМР <sup>1</sup>N и ИК спектрами. По последним данным ацетамиды I-XVIII в кристаллическом состоянии существуют в виде солей 2-аминобензимидазолия, на что указывает присутствие двух полос валентных колебаний первичной аминогруппы в области 3350-3150 см<sup>-1</sup>. Полосы поглощения карбонильной группы наблюдаются в области 1665-1660 см<sup>-1</sup>. Сигнал протонов CH<sub>2</sub>CO-группы проявляется в спектрах ЯМР <sup>1</sup>H в области 4.90-5.60 м.д.

Исходные N,N-замещенные хлорацетамиды синтезированы взаимодействием хлорацетилхлорида с замещенными аминами в среде сухого бензола по стандартной методике. Их физико-химические характеристики соответствовали литературным.

**Общая методика синтеза ацетамидов I-XVIII.** Смесь эквимольных количеств (5 ммоль) 1-алкил(бензил)-2-аминобензимидазола и амидов хлоруксусной кислоты в 25-30 мл сухого ацетонитрила кипятят при перемешивании до полного протекания реакции. Затем выпавший осадок хлоридов 3-(N,N-дизамещенных)ацетамидов-1-R-2-аминобензимидазолия отфильтровывают, промывают ацетоном и перекристаллизовывают из подходящего растворителя.

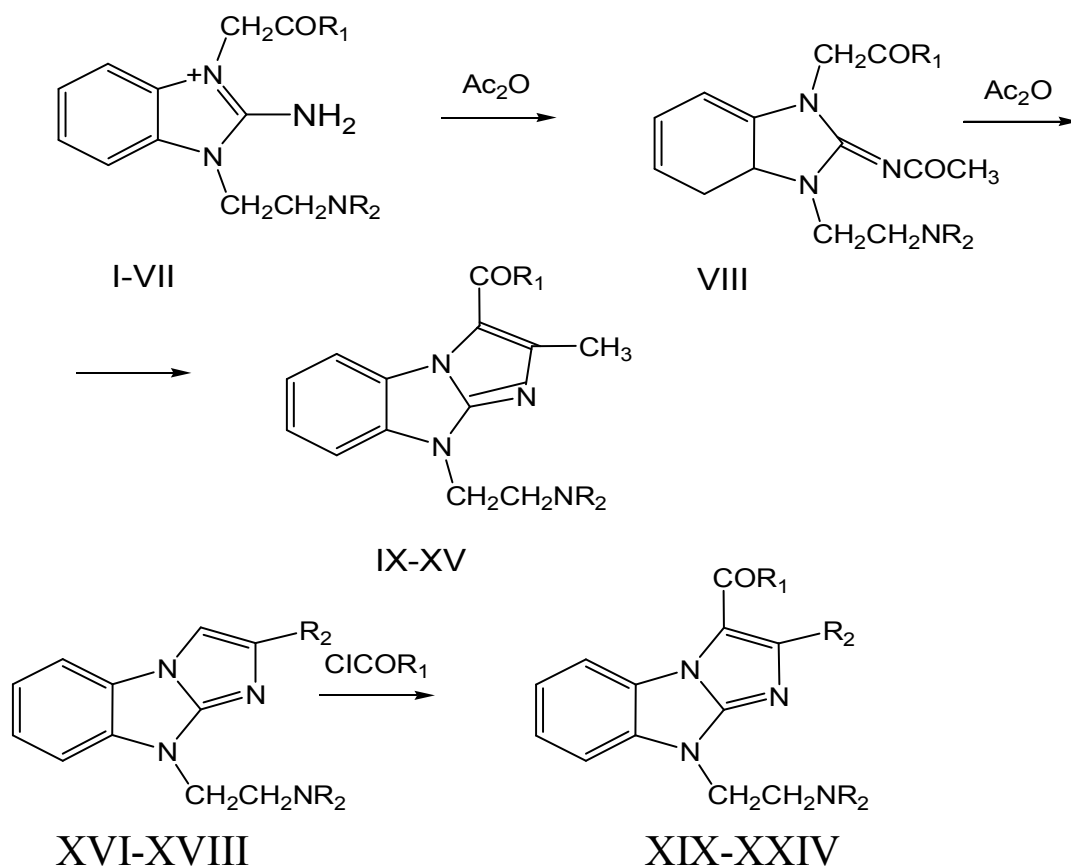
### **3.3. Синтез 3-(ароил)- и 3-(гетароил)имидазо-[1,2-а]бензимидазолов**

Для синтеза 3-функциональнозамещенных 2-метил-имидазо[1,2-а]бензимидазола часто используется уксусный ангидрид, который в этих случаях служит одновременно ацилирующим и конденсирующим агентом [А.М. Симонов, 1973; В.А. Анисимова, 1976]. 3-Теноилзамещенные 2-метилимидазо[1,2-а]бензимидазолы IX, X получены по аналогичной схеме при кипячении в уксусном ангидриде соответствующих бромидов 3-теноилметил-2-аминобензимидазолия I, II. Соли I и II трудно циклизируются в производные 2-тиенилимидазо[1,2-а]бензимидазола в кислых средах [В.А. Анисимова, 2002], в то же время ацилирование аминогруппы и последующая циклизация промежуточно образующихся соединений VIII за счет кислорода ацетильной группы и метиленовых протонов кетоалкильного радикала протекает очень легко.

В случае бромидов 3-фуроилметил- (III) и 3-ароилметил замещенных (IV-VII) 2-аминобензимидазолия реакция в кипящем уксусном ангидриде протекает по двум направлениям, как и для бромида 3-фенацил-2-аминобензимидазолия [В.А. Анисимова, 1976]. Чтобы исключить неприемлемое для синтеза соединений XI-XV направление – циклизацию вышеуказанных солей до 2-фурил- и 2-арили-мидазо[1,2-а]бензимидазолов и их последующее ацилирование до 3-ацетилзамещенных, необходимо вначале при комнатной температуре ацили-



ровать соединения III-VII до ацетиламинопроизводных VIII, а затем уже при кипячении вуксусном ангидриде провести циклизацию.



I-XXIV: а, NR<sub>2</sub> = N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>; б, NR<sub>2</sub> = N(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>; с, NR<sub>2</sub> = N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O. I, IX, XIX, XX: R<sup>1</sup> = тиенил-2; II, X: R<sup>1</sup> = 5-бромтиенил-2; III, XI, XXI: R<sup>1</sup> = фурил-2; IV, XII: R<sup>1</sup> = C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Br-4; V, XIII, XXII-XXIV: R<sup>1</sup> = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; VI, XIV: R<sup>1</sup> = C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OCH<sub>3</sub>-4; VII, XV: R<sup>1</sup> = C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl-4. XVI, XIX, XXI, XXII: R<sup>2</sup> = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; XVII, XX, XXIV: R<sup>2</sup> = C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-3, 4; XVIII, XXIII: R<sup>2</sup> = C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl.

Кетоны XIX-XXIV, имеющие во втором положении различные арильные заместители, синтезированы прямым ацилированием 2-арилимидазо[1,2-а]бензимидазолов, XVI-XVIII – хлорангидридами ароматических и гетероароматических кислот в среде абсолютных ксилола или бензола, а также при сплавлении исходных реагентов. При этом в реакцию нет необходимости вводить какие-либо щелоч-

ные агенты для связывания выделяющегося хлористого водорода, так как акцептором его служит находящийся в положении 9 трицикла диалкиламиноэтильный радикал. Этот метод может быть использован и для синтеза 2-метилзамещенных IX-XV.

В ИК-спектрах полученных кетонов наблюдаются характеристические полосы поглощения карбонильной группы в области 1620–1645  $\text{см}^{-1}$ . При переходе к солям в спектрах появляется "иммониевая полоса" ( $\text{C}=\text{N}+\text{H}-$ ) при 1670–1680  $\text{см}^{-1}$  и широкие полосы, связанные с валентными колебаниями NH групп в областях 3125–3205 и 2250–2750  $\text{см}^{-1}$ .

В спектрах ПМР кетонов IX-XV исчезают полосы поглощения метиленовых протонов (2H, c) исходных четвертичных солей I-VII в области 5,5-6,2 м.д. В спектрах XIX-XXIV исчезает синглетный сигнал в одну протонную единицу в области 7,3-7,5 м.д., характерный для протона в положении 3 исходных соединений XVI-XVIII. Строение соединений IX-XV подтверждается также присутствием в их спектрах ПМР трехпротонного синглета при 2,4 м.д., характеризующего поглощение группы  $\text{CH}_3$  в положении 2 трицикла.

Исходные бромиды 3-ароил(гетароил)метил-1-диалкиламиноэтил-2-аминобенз имидазолия (I-VII) и 2,9-дизамещенными имидазо[1,2-*a*]бензимидазолами (XVI-XVIII) синтезированы по методикам, описанным В.А. Анисимовой, (2002).

**9-Диалкиламиноэтил-2-метил-3-(2-теноил)имидазо[1,2-*a*]-бензимидазолы (IX а-с).** Кипятят 5 ммоль бромида 1-диалкиламиноэтил-3-(2-теноилметил)-2-аминобензимидазолия (I) в свежеперегнанном уксусном ангидриде (в случае Ia – 22 мл, Ib – 25 мл, Ic – 40 мл) до полного растворения исходной соли (5-20 мин) и образования слегка желтоватого раствора. По охлаждении реакционную смесь разбавляют в 2-3 раза эфиром. Выпавший осадок гидробромида IX б отфильтровывают, промывают эфиром, а затем перекристаллизовывают и сушат, оберегая от солнечного света. Обработывая гидробромиды 22 % раствором аммиака, получают основания IX, которые переводят в соответствующие соли подкислением их

ацетоновых растворов раствором HCl в 2-пропаноле или раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в ацетоне.

**3-(5-Бромтеноил-2)-9-диалкиламиноэтил-2-метилимидазо[1,2-а]бензимидазолы (Ха, с).** Бромид 3-(5-бромтеноил-2)метил-2-аминобензимидазолия II (5 ммоль) в 25-30 мл свежеперегнанного Ac<sub>2</sub>O кипятят до полного протекания реакции (20-30 мин), за которой следят с помощью ТСХ ( $R_f$ основания исходной соли ~0,4;  $R_f$ конечного основания ~ 0,9). Раствор охлаждают, выливают в 70-80 мл воды и после разложения избытка ангидрида подщелачивают 22 % раствором аммиака до pH 8-9. Продукт циклизации экстрагируют хлороформом (3 x 15 мл), экстракт упаривают до объема 5-7 мл и пропускают через слой Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (d = 4,5 см, h= 2,5 см), элюируя CHCl<sub>3</sub>. Основание, полученное после испарения хлороформа из элюата, растворяют в 50 мл ацетона и раствор подкисляют раствором HCl в 2-пропаноле или раствором HNO<sub>3</sub> в ацетоне. Соль отфильтровывают, промывают ацетоном, сушат на воздухе, оберегая от прямых солнечных лучей. Обработывая гидробромиды 22 % раствором аммиака, получают основания IX, которые переводят в соответствующие соли подкислением их ацетоновых растворов раствором HCl в 2-пропаноле или раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в ацетоне.

**3-(5-Бромтеноил-2)-9-диалкиламиноэтил-2-метилимидазо[1,2-а]бензимидазолы (Ха, с).** Бромид 1-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>-3-(5-бромтеноил-2)метил-2-аминобензимидазолия (II) (5 ммоль) в 25-30 мл свежеперегнанного Ac<sub>2</sub>O кипятят до полного протекания реакции (20-30 мин), за которой следят с помощью ТСХ ( $R_f$ основания исходной соли ~0,4;  $R_f$ конечного основания ~ 0,9). Раствор охлаждают, выливают в 70-80 мл воды и после разложения избытка ангидрида подщелачивают 22 % раствором аммиака до pH 8-9. Продукт циклизации экстрагируют хлороформом (3 x 15 мл), экстракт упаривают до объема 5-7 мл и пропускают через слой Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (d = 4,5 см, h= 2,5 см), элюируя CHCl<sub>3</sub>. Основание, полученное после испарения хлороформа из элюата, растворяют в 50 мл ацетона и раствор подкисляют раствором HCl в 2-пропаноле или раствором HNO<sub>3</sub> в ацетоне. Соль отфильтро-

вывают, промывают ацетоном, сушат на воздухе, оберегая от прямых солнечных лучей.

**9-Диалкиламиноэтил-2-метил-3-(2-фурил)имидазо[1,2-а]-бензимидазолы (XIa-c).** Суспензию 5 ммоль бромида 1-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>-3-(2-фурил)метил-2-аминобензимидазолия (III) в 20-30 мл Ac<sub>2</sub>O оставляют на ночь при комнатной температуре, а затем кипятят до полного протекания циклизации (30-40 мин), после чего реакционную смесь охлаждают и выливают в 100 мл воды. Раствор, образовавшийся после разложения избытка ангидрида, нейтрализуют Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, экстрагируют бензолом (3 x 10 мл) и далее поступают так, как описано в синтезе соединений X.

**3-Ароил-9-диалкиламиноэтил-2-метилимидазо-[1,2-а]бензимидазолы (XII-XV).** Суспендируют 5 ммоль бромидов IV и VII в 30 мл Ac<sub>2</sub>O и оставляют на сутки при 25-30 °С. Затем смесь нагревают на водяной бане до растворения осадка и раствор кипятят 10-15 мин, контролируя окончание реакции с помощью ТСХ. Далее поступают аналогично вышеописанному в синтезе соединений X, но для экстракции полученных 3-ароилзамещенных и в качестве элюента для их хроматографической очистки используют бензол. Полученные основания переводят в дигидрохлориды в ацетоне с помощью концентрированной HCl.

**2-Арил-3-ароил(гетароил)-9-диалкиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазолы (XIX-XXIV).**

А. Смесь 5 ммоль 2-арил-9-диалкиламиноэтилимидазо[1,2-а]-бензимидазола (XVI-XVIII) и 10 ммоль свежеперегнанного хлорангидрида арил(гетарил)карбоновой кислоты кипятят в 10 мл абсолютного ксилола или бензола до полного протекания реакции (0,5-2 ч). Охлаждают, выпавший осадок гидрохлорида соединений XIX-XXIV отфильтровывают, промывают бензолом и петролейным эфиром. При необходимости из гидрохлоридов выделяют основания, очищают их или переводят в гидробромиды.

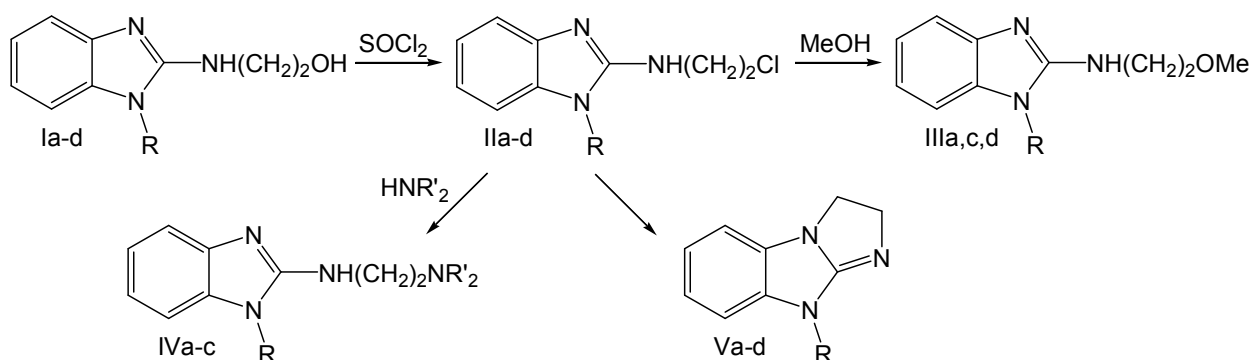
Б. Смесь 1,95 г (5 ммоль) основания XVIIa, 1 мл хлорангидрида 2-тиофенкарбоновой кислоты и 5 мл абсолютного бензола кипятят

15 мин, после чего реакционную смесь охлаждают и обрабатывают 10 мл 22 %  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Бензольный слой отделяют, пропускают через слой  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ( $d = 3$  см,  $h = 1,5$  см), элюируя кетон бензолом. Пропуская сухой  $\text{HCl}$  в бензольный элюат, получают гидрохлорид XXaX.

В. Тщательно растертую смесь (6 ммоль трициклического основания XVIa и 1,5 мл (~9 ммоль) хлорангидрида 2-фуранкарбоновой кислоты) нагревают при  $110^\circ\text{C}$  до полного протекания реакции ацилирования (7-10 мин). Охлаждают, обрабатывают раствором аммиака и кетон XVIa экстрагируют бензолом. Далее его очищают и переводят в соль как описано выше. Реакция идет и без нагревания, но в этом случае время протекания – 2-3 суток.

### 3.4. 9-замещенные 2,3-дигидроимидазо-[1,2-а]бензимидазолы

Синтез 9-алкил-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолов (Va-d) осуществлен, исходя из 1-алкил-2-хлорэтиламинобензимидазолов (IIa-d), полученных действием  $\text{SOCl}_2$  на легкодоступные 1-алкил-2-(2-гидроксиэтиламино) бензимидазолы (Ia-d) [В.А. Анисимова, 1982].

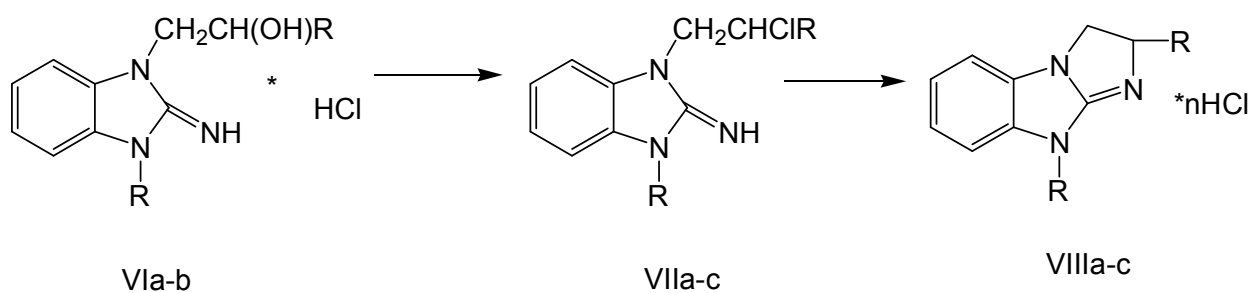


$\text{R} = \text{Me}$  (Ia – Va, IVb,c),  $\text{Pr}$  (Ib, IIb, Vb),  $\text{Bu}$  (Ic – IIIc, Vc),  $\text{CH}_2\text{Ph}$  (Id – IIIId, Vd);  $\text{R}' = \text{Et}$  (IVa),  $\text{NR}'_2 =$  пиперидино (IVb), морфолино (IVc).

Показано, что при действии спиртового раствора щелочи или  $\text{MeONa}$  на соединение (II) преимущественно протекает не внутримо-

лекулярная циклизация по пиридиновому атому азота кольца, а нуклеофильное замещение атома хлора на метоксигруппу с образованием 1-алкил-2-(2-метоксиэтиламино)бензимидазолов (IIIa,c,d). Аналогично, при действии вторичных аминов на хлорамин IIa получены в основном 1-метил-2-(2-диалкил-аминоэтил амино)-бензимидазолы (IVa-c). Однако при термоллизе оснований IIa-d происходит внутримолекулярное алкилирование хлорэтильной группой атома азота в положении 3 и образование гидрохлоридов Va-d [В.А. Анисимова 1982, 1987]. Реакция идет при кратковременном нагревании хлоридов IIa-d при температуре, на несколько градусов превышающей их температуру плавления, или при кипячении в инертных растворителях, температура кипения которых не ниже температуры плавления соответствующих соединений (II). Эти условия исключают протекание каких-либо побочных процессов, приводя практически к количественным выходам соединений V.

2,3-Дигидроамидазо[1,2-а]бензимидазолы (VIIIa-c), имеющие в положении 9 пиперидиноэтильную группировку или в положении 2 фенильный радикал, получены из 3-гидроксиэтил-2-иминобензимидазолинов (VIa-c) через промежуточные хлориды (VIIa-c) по обычной схеме в условиях, предложенных В.А. Анисимовой (1983).



R = пиперидиноэтил (VIa, c — VIIIa, c), Et (VIb — VIIIb); R<sup>1</sup> = H (VIa — VIIIa), Ph (VIb, c — VIIIb, c); n = 1(VIIIa, c), 2 (VIIIb)

В ИК-спектрах соединений V и VIII имеются полосы поглощения при 1660—1665 см<sup>-1</sup>, которые относятся к поглощению внутри-

циклической связи  $C=N$  2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазольного ядра. В ПМР-спектрах этих соединений, снятых в  $CDCl_3$ , четыре протона внешнего имидазолинового кольца проявляются в виде двух симметричных триплетов в областях 3,55—3,95 и 4,04—4,35 м. д. (система AA'BB').

Учитывая, что являющаяся активным фармакофором гуанидиновая группировка присутствует как в 2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолах, так и в промежуточных продуктах их синтеза, мы изучили фармакологические свойства водорастворимых гидрохлоридов большинства синтезированных соединений.

Соединения Id, Ша, d получены по схеме В.А. Анисимовой (1982).

**I-Пропил- и 1-бутил-2-(2-гидроксиэтиламино)бензимидазолы (1b, c)** синтезированы сплавлением соответствующих бензимидазол-2-сульфокислот [А.В. Ельцов, 1967] с моноэтаноламином (1 ч, 155°C). ИК-спектры 1b, c ( $CHCl_3$ ),  $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ : 3430—3450 (NH), 3200—3350 (OH).

**Гидрохлориды (Ia-d)** получены подкислением горячих спиртовых или ацетоновых растворов оснований I концентрированной HCl и очищены перекристаллизацией из спирта или спирта с эфиром.

**1-Алкил(аралкил)-2-(2-хлорэтиламино)бензимидазолы (IIa-d).** К суспензии 25 ммоль аминспирта I в 15-20 мл сухого  $CHCl_3$  или  $C_6H_6$  при охлаждении и перемешивании прибавляют по каплям 3,3 мл  $SOCl_2$ . Образовавшийся раствор оставляют при комнатной температуре. На следующий день растворитель упаривают, оставшееся масло растирают с петролейным эфиром до полной кристаллизации гидрохлоридов II, которые затем очищают переосаждением из спиртового или ацетонового растворов эфиром.

Полученные соли IIa-d обрабатывают избытком 10%  $NH_4OH$  на холоде, осадок основания отфильтровывают, промывают водой, сушат на воздухе и кристаллизуют: IIa, b, d – из бензола, IIc – из этилацетата. ИК-спектры ( $CHCl_3$ ),  $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ : 3440–3450 (NH).

**1-Бутил-2-(2-метоксиэтиламино)бензимидазол (IIIc).** Кипятят 5 ммоль соли IIв в 15 мл 10% NaOH в метаноле в течение 1,5 ч. Вы-

павший осадок NaCl отделяют, метанол испаряют, остаток очищают сначала на хроматографической колонке ( $Al_2O_3$ , элюент -  $CHCl_3$ ), а затем кристаллизуют из гексана. ИК-спектр ( $CHCl_3$ ),  $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ : 3445 (NH). Аналогично получали соединения IIIa, d.

#### **2-(2-Диалкиламиноэтиламино)-1-метилбензимидазолы (IVa-c).**

Смесь из 1,7 г (8 ммоль) соединения IIa и 16 ммоль диэтиламина, пиперидина или морфолина в 10-15 мл абсолютного бензола кипятят 4-6 ч, охлаждают, осадок гидрохлорида исходного амина отделяют. Бензольный раствор упаривают до небольшого объема, пропускают через слой  $Al_2O_3$  (элюент -  $CHCl_3$ ). Остаток, полученный после испарений  $CHCl_3$  в случае соединений IV b,c кристаллизуют из гексана и низкокипящего петролейного эфира, соответственно и высушивают в вакуум-эксикаторе над KOH. Соединение IVa представляет собой масло. ИК-спектры ( $CHCl_3$ ),  $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ : 3370—3385 (NH).

**Гидрохлориды IIIa, c, d и IVa-c** получали подкислением ацетонных растворов оснований эфирным или спиртовым раствором HCl и очищали перекристаллизацией из спирта (III d, IV b, c) или из спирта с эфиром (IIIa, c, IVa).

#### **Гидрохлориды 9-алкил(аралкил)-2,3-дигидроимидазо[1,2-a]бензимидазолов (Va-d).**

А. Кипятят 5 ммоль хлорида II a-d в 10 мл сухого ксилола в течение 15—40 мин. Осадок исходного соединения при этом быстро растворяется, и из раствора сразу же начинают выпадать крупные кристаллы конечной соли V. Смесь охлаждают, осадок отфильтровывают, промывают петролейным эфиром и кристаллизуют из спирта или из спирта с эфиром.

Б. Хлорид IIa-d нагревают при 120-130°C в открытой пробирке в течение 15-20 мин, при этом образуется быстро кристаллизующийся температура плав. Его охлаждают и перекристаллизовывают.

Соединения Va, d идентичны полученным из соответствующих 3-хлор-этил-2-иминобензимидазолинов.

**Гидрохлорид 3-(2-гидроксиэтил)-2-имино-1-пиперидиноэтил бензимидазолина (VIa).** Смесь из 2,44 г 2-амино-1-пиперидиноэтил-



бензимидазола, 0,8 мл этиленхлоргидрина и 4 мл ДМФА кипятят в течение 30 мин, затем ее охлаждают, разбавляют эфиром, осадок отфильтровывают и кристаллизуют из спирта. Выход 3,13 г.

**Гидрохлорид 3-(2-гидрокси-2-фенилэтил)-2-имино-1-этил бензимидазолина (VIb).** К суспензии 3,6 г (10 ммоль) гидробромида 2-имино-3-фенацил-1-этилбензимидазолина в 60 мл метанола при комнатной температуре и энергичном перемешивании прибавляют небольшими порциями в течение 20-30 мин 1 г (25 ммоль)  $\text{NaBH}_4$ , после чего образовавшийся раствор перемешивают в течение еще 2-3 ч. Избыток  $\text{NaBH}_4$  разлагают подкислением раствора 10 %  $\text{HCl}$ , метанол испаряют, к остатку добавляют 20 мл воды, осадок гидрохлорида VIb отфильтровывают, промывают водой и кристаллизуют из спирта. Выход 2,8 г. В ИК-спектре полученной соли исчезает полоса поглощения группы  $\text{C}=\text{O}$ , наблюдающаяся в исходном соединении при  $1695 \text{ см}^{-1}$ .

**3-(2-Гидрокси-2-фенилэтил)-2-имино-1-пиперидиноэтилбензимидазолин (VIC).** Получают аналогично VIb при восстановлении 3,32 г гидробромида 2-имино-1-пиперидиноэтил-3-фенацилбензимидазолина в 20 мл метанола 0,5 г  $\text{NaBH}_4$ , но выделяют в виде основания ввиду хорошей растворимости соли VIC в воде. Для этого остаток после испарения метанола обрабатывают 22 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  и экстрагируют  $\text{CHCl}_3$ . После упаривания экстракта и перекристаллизации остатка из этилацетата получают 2,5 г имина VIC.

**2-Имино-1-пиперидиноэтил-3-(2-хлорэтил)бензимидазолин (VIIa).** Раствор, содержащий 3,25 г (10 ммоль) соединения VIIa и 1,5 мл (20 ммоль)  $\text{SOCl}_2$  в 15 мл  $\text{CHCl}_3$  кипятят в течение 1 ч, затем охлаждают, осадок дигидрохлорида VIIa отфильтровывают и промывают  $\text{CHCl}_3$ . Выход 3,44 г.

Основание VIIa, выделенное при обработке соли 22 %  $\text{NH}_4\text{OH}$ , представляет собой масло, так же как и хлорид VIIc, аналогично полученный из соответствующего иминоспирта VIC.

**2-Имино-3-(2-фенил-2-хлорэтил)-1-этилбензимидазолин (VIIb).** К суспензии 1,59 г (5 ммоль) соли VIb в 10 мл сухого  $\text{CHCl}_3$  ос-

торожно при перемешивании прибавляют 0,75 мл (10 ммоль)  $\text{SOCl}_2$  и продолжают перемешивание до полного протекания реакции (30-40 мин). Растворитель из образовавшегося раствора испаряют, остаток растирают с петролейным эфиром до полной кристаллизации. Выход гидрохлорида VIIb 1,68 г. Основание имида выделяют, обрабатывая соль раствором  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

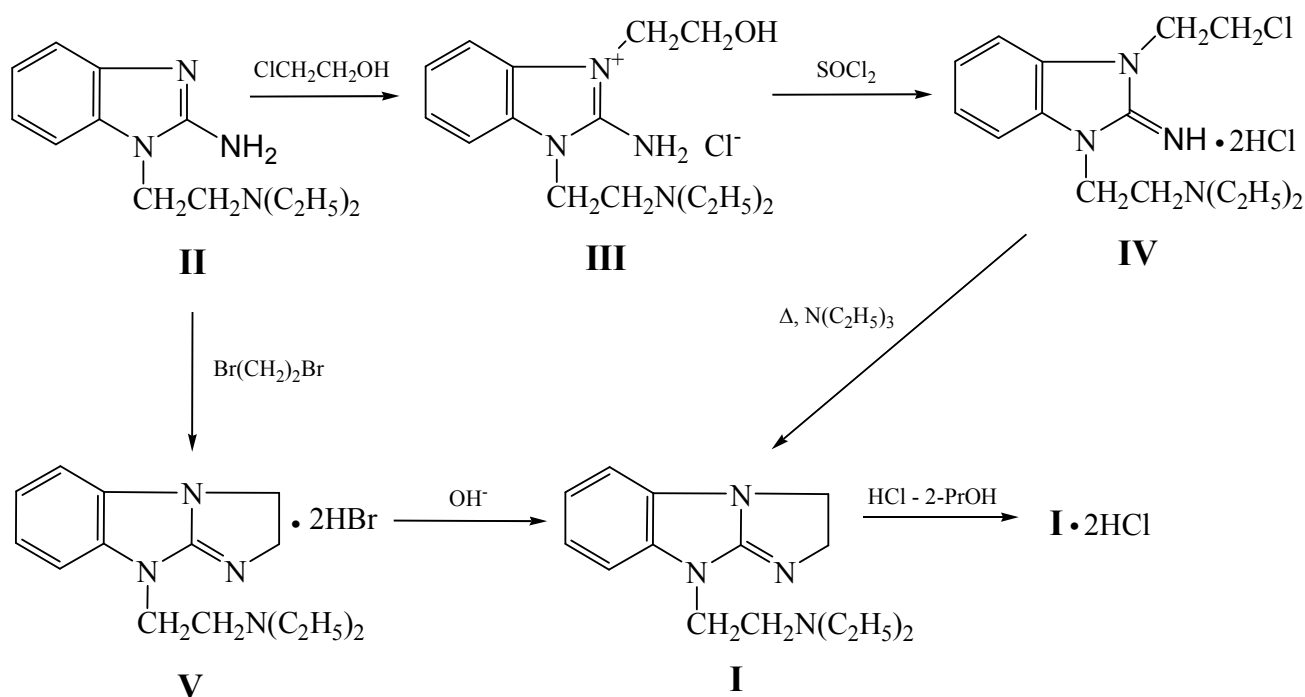
**Дигидрохлорид 9-пиперидиноэтил-2,3-дигидроимидазо [1,2-*a*]бензимидазола (VIIIa).** Хлорамин VIIa (0,92 г) кипятят в 10 мл абсолютного толуола в течение 1,5-2 ч. По окончании реакции (контроль – ТСХ) в охлажденную реакционную смесь пропускают ток сухого  $\text{HCl}$  до pH 2,0-3,0. Осадок дигидрохлорида VIIIa отфильтровывают и промывают ацетоном.

Аналогично получают и дигидрохлорид 9-пиперидиноэтил-2-фенил-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазола (VIIIc).

**Гидрохлорид 2-фенил-9-этил-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*] бензимидазола (VIIIb).** Раствор 1,5 г хлорамина VIIb в 10 мл абсолютного ксилола кипятят в течение 1 ч, затем охлаждают, осадок отфильтровывают, промывают петролейным эфиром и очищают пересаживанием из спирта эфиром.

**Дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазола (РУ-254, диабенол)** может быть синтезирован несколькими способами. Однако, наиболее удобны и экономичны из них два. Первый состоит во взаимодействии 2-амино-1-диэтиламиноэтил бензимидазола (II) с этиленхлоргидрином, хлорировании образующегося при этом хлорида 2-амино-1-диэтиламиноэтил-3-(2-гидроксиэтил)бензимидазолия (III), последующей термической циклизации 1-диэтиламиноэтил-2-имино-3-(2-хлорэтил) бензимидазолина (IV) до 9-диэтиламиноэтил-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазола (I) и переводе полученного основания I в дигидрохлорид ( $\text{I} \cdot 2\text{HCl}$ ).

Второй путь заключается в конденсации 2-амино-1-диэтиламиноэтилбензимидазола с избытком дибромэтана и переводе выделенного в результате реакции дигидробромида трициклического производного V через основание I в искомый дигидрохлорид.



Ниже приведены методики синтеза соединения.

**Пример 1. Дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]-бензимидазола (I·2HCl) (первый вариант синтеза)**

**Стадия 1. Хлорид 2-амино-1-диэтиламиноэтил-3-(2-гидроксиэтил)-бензимидазолия (III).** Смесь 116 г (0,5 моль) 2-амино-1-диэтиламиноэтил-бензимидазола (II) (В.А. Анисимова, Ю.В. Кощиченко, Б.М. Пятин и др. Авт. свид. № 1149592 (1984); А.М. Симонов, А.А. Белоус, А.Н. Ломакин, В.А. Анисимова, Журнал ВХО им. Д.И. Менделеева, 1963, т. VIII, № 6, с. 712 и др.) и 67,1 мл (1 моль) этиленхлоргидрина в 300 мл сухого диоксана кипятят 10 часов при энергичном перемешивании, после чего раствор охлаждают, продолжая перемешивание. После выдерживания реакционной массы при 15-20 °С в течение 1 часа четвертичную соль отфильтровывают, тщательно отжимают, промывают диоксаном (2 x 50 мл) и ацетоном (2 x 50 мл). Высушивают в сушильном шкафу при 95-105 °С до постоянного веса. Получают 133-139 г соли, что составляет 85-89 %, считая на исходный амин. Т.пл. 158-159,5 °С. При необходимости получен-

ный хлорид очищают перекристаллизацией из 2-пропанола (500 мл). Т.пл. перекристаллизованного продукта 159-160 °С. ИК-спектр (вазелиновое масло), см<sup>-1</sup>: 1685 (C=N<sup>+</sup>-H), 3090, 3235 (NH, OH).

Соединение III может быть также получено с высокими выходами нагреванием 10 ммоль амина II с 3 мл этиленхлоргидрина при 130–135 °С в течение 35-40 мин [В.А. Анисимова, Г.В. Ковалев, А.А. Спасов и др. Авт.свид. № 1269474 (1986), ДСП] или кипячением (1 час) смеси амина II (10 ммоль) и этиленхлоргидрина (12 ммоль) в 4 мл сухого, свободного от аминов ДМФА [А.П. Ордынцева, В.А. Анисимова, А.П. Шепелев и др. Авт. свид. № 1626623 (1990), ДСП]. Однако при больших загрузках исходных веществ реакцию лучше вести в диоксане (см. выше), но можно в ацетонитриле, этиленгликоле, нитрометане.

**Стадия 2. Дигидрохлорид 1-диэтиламиноэтил-2-имино-3-(2-хлорэтил)-бензимидазолина (IV).** К суспензии 125 г (0,4 ммоль) хлорида 2-амино-1-диэтиламиноэтил-3-(2-гидроксиэтил) бензимидазолия в 1,2 л сухого хлороформа при интенсивном перемешивании и охлаждении прибавляют по каплям 36 мл (0,5 ммоль) свежеперегнанного хлористого тионила с такой скоростью, чтобы температура реакционной массы не превышала 10-12 °С (~15-20 мин). Затем образовавшийся раствор осторожно нагревают и кипятят 1 час, при этом из него постепенно выпадает осадок искомого дигидрохлорида 3-(2-хлорэтил)-2-иминобензимидазолина (IV). Последний после охлаждения реакционной массы отфильтровывают, промывают хлороформом (2 x 50 мл) и петролейным эфиром (2 x 50 мл). Выход 145 г (99 %). Соединение представляет собой бесцветные кристаллы с т.пл. 222-224 °С (из ДМФА).

**Стадия 3. Дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола (I 2HCl).** Суспензию 184 г (0,5 ммоль) хлорэтилзамещенного IV и 152 г (1,5 ммоль, 207,5 мл) свежеперегнанного триэтиламина в 2,0 л сухого толуола кипятят при интенсивном перемешивании до полного протекания реакции циклизации (контроль – ТСХ, ~ 8 часов). Постепенно мелкокристаллический оса-

док исходной соли переходит в прозрачные кристаллы гидрохлорида триэтиламина, которые по окончании реакции отфильтровывают (310 г) из охлажденной реакционной смеси и промывают толуолом (3 x 100 мл). Из маточного раствора и промывной жидкости отгоняют 1, 7 л толуола, а остаток пропускают через слой оксида алюминия (400 г), помещенный в стеклянную воронку Шотта диаметром 10 см, элюируя трициклическое основание хлороформом. Хлороформ отгоняют, а к остатку (при необходимости его можно разбавить сухим ацетоном) медленно при перемешивании прибавляют насыщенный раствор хлористого водорода в 2-пропаноле до pH 2-3. Через 2-3 часа образующиеся мелкие бесцветные кристаллы конечного дигидрохлорида I отфильтровывают, промывают 2-пропанолом (100 мл) и ацетоном (2 x 50 мл). Выход продукта 129 г (78 %). Очищают полученный дигидрохлорид перекристаллизацией из 2,0 л сухого 2-пропанола, получая 105 г соединения I·2HCl, которое промывают на фильтре сухим ацетоном. Сушат при 110-115<sup>0</sup>С до постоянного веса. Т.пл. 258-259<sup>0</sup>С. УФ-спектр (0,0025% раствор дигидрохлорида I в 95% EtOH),  $\lambda_{\max}$ , нм: 217±2, 279±2 и плечо при (282-286)±2. ИК-спектр (вазелиновое масло) соединения I, см<sup>-1</sup>: 1665 (C=N). Спектр ЯМР <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O), внутренний стандарт - ГМДС, м.д.: 1,29 (6H, т, 2CH<sub>3</sub>), 3,35 (4H, к, 2CH<sub>2</sub>), 3,69 (2H, т, CH<sub>2</sub>N), 4,41 (4H, с, внутрицикл. (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), 4,62 (2H, т, NCH<sub>2</sub>), 7,41 (4H, м, аромат. H).

**Пример 2. Дигидрохлорид 9-диэтиламиноэтил-2,3-дигидроимидазо[1,2-а] бензимидазола (I·2HCl) (второй вариант синтеза)**

Перемешиваемую суспензию 69,6 г (0,3 моль) 2-амино-1-диэтиламиноэтилбензимидазола (II) в 104 мл (1,2 моль) дибромэтана осторожно нагревают на глицериновой бане. При 60-70 °С исходный амин полностью растворяется, а при 100-105 °С начинается экзотермическая реакция циклизации (баню при ее начале отставляют), сопровождающаяся сильным вскипанием реакционной массы, повышением температуры до 140 °С и выпадением тяжелого бесцветного осадка. Через 5-7 мин реакция, в основном, заканчивается и, чтобы

довести ее до конца, смесь нагревают дополнительно 20 мин при 140-145 °С. После этого в густую массу добавляют при энергичном перемешивании 80 мл ДМФА и нагревают смесь еще 10-15 мин. Охлаждают до 20-25<sup>0</sup>С, осадок отфильтровывают, промывают ДМФА (3 x 20 мл) и ацетоном (3 x 25 мл), получая 106 г дигидробромида V (84 %). Последний растворяют в 230 мл воды, кипятят 10 мин с 3-5 г активированного угля, отфильтровывают уголь, и фильтрат после охлаждения подщелачивают 40 % раствором едкого натра до рН 10. Выделяющееся на поверхности светло-желтое масло экстрагируют толуолом. Толуольную вытяжку промывают водой и сушат безводным углекислым калием. Осушитель отделяют, промывают толуолом. Затем толуольный раствор при перемешивании подкисляют постепенным добавлением насыщенного раствора хлористого водорода в 2-пропаноле до рН 1. Выделившийся тяжелый бесцветный осадок дигидрохлорида I 2HCl после 4-5-часовой выдержки при 20-25<sup>0</sup>С отфильтровывают, промывают ацетоном и высушивают при 100-110 °С до постоянного веса (2-3 часа). Выход 75 г (90,9%, считая на дигидробромид V и 75%, считая на исходный амин II). Очищают технический «диабенол» до фармакопейной чистоты перекристаллизацией из 2-пропанола. Полученный по этому методу препарат идентичен по всем параметрам образцу, синтезированному по методике, описанной в примере 1.

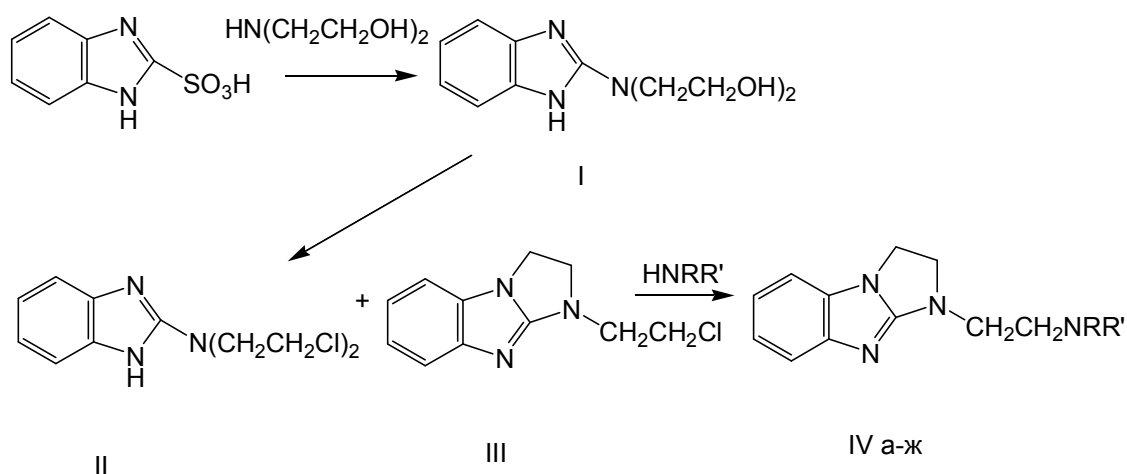
Реакцию с дибромэтаном можно проводить в таких растворителях, как толуол, ксилол, диоксан, но при этом увеличивается время реакции и уменьшается выход конечного продукта за счет образования соли исходного амина, которая не вступает в этих условиях в реакцию. При проведении процесса в более высококипящих и более полярных растворителях (диэтиленгликоле, диметоксиэтаноле, бензонитриле, пропиленкарбонате, диметилсульфоксиде, диметилформамиде) наилучшие результаты получены в диметилформамиде (выход дигидробромида 9-диэтиламиноэтил-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*] бензимидазола составляет 73-76 %). Однако при этом образуется побочное соединение, имеющее близкую с основным продуктом реакции

хроматографическую подвижность, и от которого очень сложно избавиться перекристаллизацией. Исключить его образование и повысить выход соединения I до 84-86 % удастся при использовании вышеприведенной в примере 2 методики проведения реакции в избытке дибромэтана (соотношение реагентов 1:4).

### 3.5. Синтез 1-аминоэтил-2,3-дигидроимидазо-[1,2-а]бензимидазолов

При взаимодействии бензимидазол-2-сульфо кислоты с диэтаноламином получен аминспирт I. Наилучшие результаты достигнуты при проведении реакции при 155-160 °С и соотношении вышеуказанных реагентов 1:3.

Хлорирование аминспирта I успешно протекает при его кипячении в течение 1,5-3 ч с  $\text{SOCl}_2$  или  $\text{POCl}_3$  как в избытке этих реагентов, так и в среде сухих органических растворителей (бензол, толуол, хлороформ, октан). В ДМФА реакция с  $\text{SOCl}_2$  идет при комнатной температуре, вероятно, благодаря хорошей растворимости исходного соединения в этом растворителе и повышенной хлорирующей способности комплекса ДМФА —  $\text{SOCl}_2$ .



IVa:  $R = R' = \text{Et}$ , IVб:  $R+R' = (\text{CH}_2)_4$ , IVB:  $R + R' = (\text{CH}_2)_5$ , IVГ:  $R + R' = (\text{C}_2\text{H}_4)_2\text{O}$ , IVд-ж:  $R = \text{H}$ , IVд:  $R' = \text{BU-t}$ , IVе:  $R' = \text{C}_6\text{H}_{11}$ , IVж:  $R' = \text{Ph}$ .

Однако в результате реакции во всех случаях получена смесь двух веществ. Одному из них, имеющему более высокую хроматографическую подвижность, на основании данных элементного анализа, ИК- и ПМР-спектроскопии приписано строение 1-(2-хлорэтил)-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бен-зимидазола (III). В ИК-спектре соединения III исчезают полосы поглощения групп NH и OH в области 2800—3200 см<sup>-1</sup>, присутствующие в исходном I. Валентные колебания внутрициклических связей C=C и C=N гетерокольца проявляются при 1500, 1580, 1600 и 1630 см<sup>-1</sup>. В спектре ПМР наблюдаются два четырехпротонных синглета при 3,67 и 3,95 м. д., которые можно отнести к сигналам протонов внутрициклического и внекольцевого этиленовых мостиков; четыре ароматических протона дают мультиплетный сигнал в области 6,85–7,25 м. д.

Второе вещество, получаемое при хлорировании, выделить в индивидуальном виде не удастся, так как при хроматографическом разделении или при попытке раскристаллизовать смесь оно полностью переходит в гидрохлорид III. Этот факт позволяет предположить образование в реакционной смеси 2-бис(2-хлорэтил)аминобен-зимидазола (II), легко подвергающегося внутримолекулярной циклизации. Ужесточение условий хлорирования (повышение температуры и увеличение продолжительности реакции), так же, как и проведение его в относительно мягких условиях (ДМФА, 20°C), не приводит к преимущественному образованию соединения II или III. В связи с этим можно сделать вывод, что SOCl<sub>2</sub> в этой реакции выполняет роль как хлорирующего, так и дегидратирующего агента. При нагревании соединения III в избытке вторичного или первичного амина атом хлора легко замещается на аминогруппу и образуются 1-аминоэтил-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы (IV). Гораздо медленнее замещение идет в среде органических растворителей, при этом время реакции сокращается с повышением температуры кипения растворителя. Например, реакция с пиперидином в бензоле или толуоле заканчивается через 11–13 ч, в ксилоле – через 4 ч, в ДМФА – через 2,5–3 ч. Учитывая большую легкость внутримолеку-



лярной циклизации дихлорида II при нагревании в инертных растворителях по сравнению с замещением атома хлора в соединении III на аминогруппу, можно для получения аминов IV в этих условиях вводить в реакцию смесь соединений II и III.

**2-Бис(2-гидроксиэтил)аминобензимидазол (I).** Смесь 4 г (0,02 моля) бензимидазол-2-сульфоксилоты и 12,6 г (0,06 моля) свежеперегнанного диэтанолamina нагревают при 155-160 °С (температура бани) в течение 3 ч. Плав охлаждают до 80-90°С, при энергичном перемешивании приливают к нему 30 мл ледяной воды и перемешивают до полной кристаллизации. Массу выдерживают на ледяной бане в течение 30 мин, осадок отфильтровывают и тщательно промывают водой до нейтральной реакции промывных вод. Выход I 3,4 г (79 %). Белоснежные кристаллы с т. пл. 196 °С (из воды). ИК-спектр,  $\nu_{\max}$ , см<sup>-1</sup>: 1630 (C=N), 2800-3200 (NH, OH).

**1-(2-Хлорэтил)-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазол (III).**

А. К раствору 1,16 г (15 ммоль) соединения I в 5 мл ДМФА осторожно при перемешивании приливают 1,3 мл SOCl<sub>2</sub>. Смесь выдерживают при комнатной температуре до завершения реакции (4-5 ч), выливают в 10 мл воды, подщелачивают 22% NH<sub>4</sub>OH до pH 8,0-9,0 и экстрагируют CHCl<sub>3</sub> (3x 10 мл). Экстракт дважды промывают водой, сушат безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривают. Остаток (1,15 г), представляющий собой смесь хлорида III и 2-бис(2-хлорэтил)-аминобензимидазола (II), кипятят в 15 мл октана в течение 2-3 ч. Реакционную массу охлаждают, осадок отфильтровывают, обрабатывают 10 мл 10% NH<sub>4</sub>OH и экстрагируют CHCl<sub>3</sub> (3x5 мл). Маточный раствор и экстракт объединяют, упаривают досуха, остаток кристаллизуют из октана, получая 0,93 г (80 %) 1-хлорэтилзамещенного III. Белоснежные волокнистые кристаллы с т. пл. 105-106 °С.

Б. Смесь 1,16 г (5 ммоль) аминспирта I, 5 мл ДМФА и 1,3 мл SOCl<sub>2</sub> кипятят в течение 1 ч. Охлаждают, выливают на 10 г мелкоизмельченного льда, подщелачивают раствором аммиака до pH 8,0-9,0 и экстрагируют CHCl<sub>3</sub> (3x5 мл). Экстракт упаривают, оставшиеся кристаллы очищают вначале хроматографически на колонке с Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

(элюент -  $C_6H_6$ ), а затем перекристаллизацией из октана. Выход соединения III, идентичного полученному по методике А, 0,85 г (63 %).

**1-(2-Диэтиламиноэтил)-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазол (IVa).** Раствор 0,7 г (3,2 ммоль) соединения III и 0,3 мл диэтиламина в 3 мл ДМФА кипятят в течение 3-4 ч. Охлаждают, разбавляют 10 мл воды и экстрагируют  $CHCl_3$  (3x5 мл). Экстракт промывают водой, сушат  $Na_2SO_4$  и упаривают, получая 0,62 г соединения IVa в виде желтоватого масла, темнеющего при хранении. ИК-спектр,  $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ : 1630 (C=N).

**1-(2-Пирролидиноэтил)-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазол (IVb).** Раствор 1,1 г (5 ммоль) соединения III в 3 мл пирролидина кипятят в течение 30 мин, охлаждают, выливают в 15 мл воды. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают водой. Очищают вначале на колонке с  $Al_2O_3$  (элюент -  $CHCl_3$ ), а затем кристаллизацией из октана. Выход 1 г.

Аналогично получены амины IVв, г, е, ж, при этом время кипячения реакционной смеси в случае соединений IV в, г – 1,5-2 ч, а соединения IVе – 5 мин. В ИК-спектрах аминов IVб-г, е валентные колебания связи C=N проявляются в области 1640-1650  $cm^{-1}$ , полоса валентных колебаний группы NH в соединении IVе наблюдается при 3285  $cm^{-1}$ .

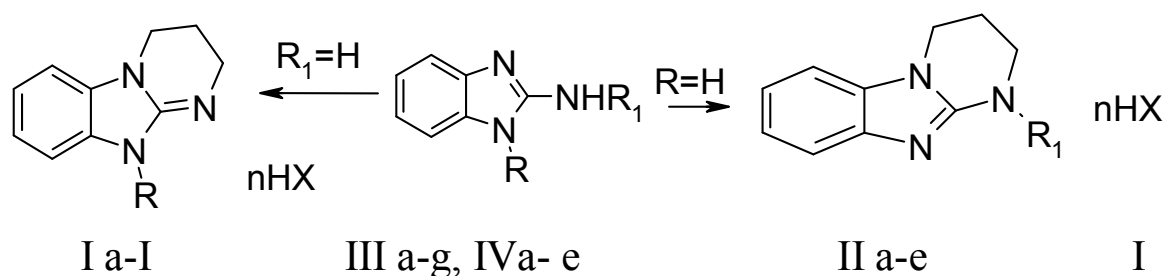
**1-(2-*трет*-Бутиламиноэтил)-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазол (IVе).** Смесь 1,1 г (5 ммоль) хлорида III и 4 мл *трет*-бутиламина нагревают в запаянной ампуле в течение 6 ч при 140-145 °С, охлаждают, выливают в 15 мл воды и через 30 мин выпавший осадок отфильтровывают. Кристаллизуют из октана. Выход 1 г. ИК-спектр,  $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ : 1640 (C=N), 3265 (NH).

**1-(2-Циклогексиламиноэтил)-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазол (IVе).** Раствор 1,1 г (5 ммоль) хлорида III и 1 мл (10 ммоль) циклогексиламина в 10 мл сухого ксилола кипятят в течение 7 ч, растворитель отгоняют под уменьшенным давлением, остаток обрабатывают 10 мл воды и экстрагируют  $CHCl_3$  (3x5 мл). Экстракт упаривают до небольшого объема и пропускают через слой  $Al_2O_3$  (2,5x3

см), элюируя амин IVe хлороформом. Выход 1,2 г. ИК-спектр,  $\nu_{\max}$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 1640 (C=N), 3234 (NH).

**Дигидрохлориды аминов IVa-ж.** Раствор 1 г основания амина IV в 20 мл ацетона подкисляют эфирным раствором HCl до pH 1,0-2,0. Выпавший осадок соли отфильтровывают, промывают ацетоном. Очищают переосаждением из спиртового раствора эфиром и сушат при 110-120 °C до постоянной массы.

### 3.6. Синтез 1- и 10-N-замещенных 1(10),2,3,4-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолов

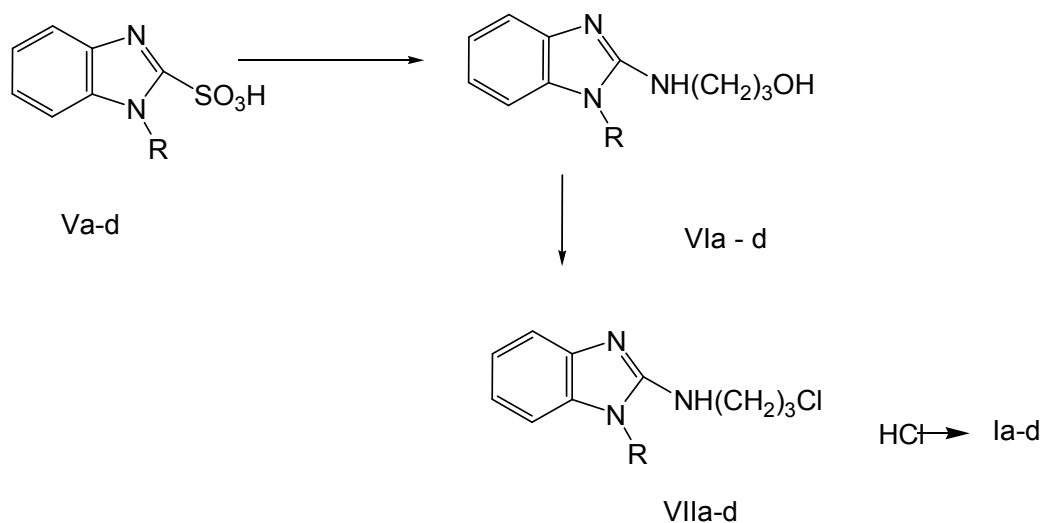


R<sub>1</sub> = H (IIIa-g), R = H (IVa-e); R, R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub> (Ia-IVa); R = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> (Ib, IIIb); R = C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> (Ic, IIIc), R, R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (Id, IIId, IIb, IVb); R, R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> (Ie, f, IIc, IIIe, IVc); R, R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> (Ig, IId, IIIf, IVd); R, R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O (Ih, i, IIe, IIIg, IVe); n = 1 (Ia-d, IIa-b), n = 2 (Ie - i, IIc - e); X = Cl (Ia, b, d, e, h; IIa, b, d, e), X = 1/2SO<sub>4</sub> (If, IIc), X = Br (Ic, g, i)

В работе П. М. Кочергина (1967) предложен способ получения 10-этил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола взаимодействием 1-этил-2-аминобензимидазола с 1,3-бромхлорпропаном в толуоле. Однако этот метод неэффективен для синтеза соединений I a-d, так как половина исходного амина III a-d расходуется на связывание выделяющегося из реакции галогенводорода и не превышают в связи с этим 45-50%. Лучшие результаты дает предложенный нами ранее для 10-бензил- и 10-фенилзамещенных этого трицикла

[В.А. Анисимова и др., 1982] и метод внутримолекулярной циклизации 2-хлорпропиламинобензимидазолов VIIa-г, полученных из легкодоступных бензимидазол-2-сульфокислот Va-d [А.В. Ельцов, 1966].

В ИК-спектрах гидроксипропиламинов Va-d присутствуют широкая полоса поглощения в области  $3025-3110\text{ см}^{-1}$  (ОН), уширенный сигнал в области  $3200-3290\text{ см}^{-1}$  (NH) и поглощение группы C=N при  $1660\text{ см}^{-1}$ . В спектрах оснований хлорпропиламинов VII исчезает полоса поглощения гидроксигруппы, а поглощение группы NH проявляется в области  $3290-3320\text{ см}^{-1}$ .



V-VII: aR=CH<sub>3</sub> bR=C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> cR=C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> dR=CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

Термическая циклизация оснований соединений VII (a-d) легко протекает без растворителя или в среде инертных растворителей, таких как бензол, хлороформ, ацетонитрил, толуол, с высокими выходами. В случае взаимодействия аминов III (e-g) с хлорбромпропаном диалкиламиноалкильная группа облегчает протекание реакции, благодаря своей способности акцептировать выделяющийся галогенводород и в результате трициклические производные I (e-g) получены с высокими выходами и выделены в виде дигидрогалогенидов. Замена толуола более высококипящим растворителем (ксилол) так же, как и использование 1,3-дибромпропана вместо бромхлорпропана сокращает время реакции до 1-1,5 ч.

Для синтеза изомерных пиримидобензимидазолов II (а-е) также использован метод циклоконденсации исходя из 2-(R<sup>1</sup>-амино)-бензимидазолов (IV). Исходные 2-метиламино-(IVa) и 2-бензил-аминобензимидазолы (IVb) получены из бензимидазол-2-сульфо-кислоты [А.Ф. Пожарский, 1988] по методике А.М. Симонова (1986). В реакции с 2-диалкил-аминоэтиламинами замещение сульфогруппы протекает при более высокой температуре и сопровождается побочными реакциями и осмолением, в связи с чем возникают трудности в получении чистых образцов аминов IV (с-е).

Учитывая невозможность синтеза этих соединений из 2-хлорбензимидазола и небольшие выходы при использовании 2-метилсульфонилбензимидазола, мы решили использовать легкость нуклеофильного замещения атома хлора в 2-(2-хлорэтиламино) бензимидазоле по методу В.А. Анисимовой (1987). Реакция идет очень чисто при проведении ее при 25-35 °С в течение 3-4 сут. Повышение температуры приводит к уменьшению выхода искомым аминов из-за параллельного протекания внутримолекулярной циклизации 2-(2-хлорэтиламино)бензимидазола до 1H-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола [А.Ф. Пожарский, 1988].

Реакция циклоконденсации с аминами IV идет гораздо труднее, чем с соединениями III, так как заместитель в аминогруппе создает стерические затруднения для аннелирования пиримидинового кольца. Попытки использовать в качестве реакционной среды более высококипящие растворители различной природы, в том числе хлорбензол, ДМФА, ДМСО, избыток дигалогенпропанов, не только не увеличивают выходы конечных продуктов, но и приводят к частичному осмолению реакционной смеси. Поэтому выходы пиримидобензимидазолов II даже при длительном кипячении реакционной массы (12-20 ч) умеренные.

**1-R-2-(3-Гидроксипропиламино)бензимидазолы (VIIa-d).** Смесь 10 ммоль 1-R-бензимидазол-2-сульфо-кислоты (V) и 1,6 мл (20 ммоль) 3-амино-1-пропанола осторожно нагревают при перемешивании 1,5-2,5 ч при 140-145 °С (для Va, b), при 125-130 °С (для Vc)

и при 145-150 °С (для Vd), не допуская осмоления массы. Затем охлажденный до 60-70 °С плав обрабатывают 15-20 мл воды. Выпавший осадок аминоспирта VI после 2 ч выдерживания при 5-8 °С отфильтровывают, промывают водой, сушат на воздухе и перекристаллизовывают.

При перегревании реакционной массы или при увеличении времени нагрева на ТСХ реакционной среды могут появиться дополнительные пятна, относящиеся к соответствующим трициклическим основаниям Ia-d.

**Гидрохлориды 1-R-2-(3-хлорпропиламино)бензимидазолов (VIIa-d).** К суспензии 10 ммоль аминоспирта VI в 15-20 мл сухого  $\text{CHCl}_3$  медленно при перемешивании прибавляют 1 мл (14 ммоль) хлористого тионила. Наблюдается разогревание смеси и растворение исходного осадка. Раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 5 - 7 ч до полного протекания реакции (контроль ТСХ:  $R_f\text{VI} \sim 0,15$ ;  $R_f\text{VII} \sim 0,9$ ). Затем хлороформ испаряют, остаток обрабатывают петролейным эфиром, гидрохлорид VII отфильтровывают и промывают петролейным эфиром. Реакцию можно проводить и при нагревании смеси до кипения. В этом случае она заканчивается за 1,5-2 ч, но реакционная масса при этом иногда темнеет.

**Соли 10-алкил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а] бензимидазолов (Ia-г).** Кипятят смесь 10 ммоль соли VII и 20 ммоль триэтиламина в абсолютном бензоле или толуоле (15-20 мл) до полного протекания циклизации (0,5-2,5 ч). Гидрохлорид триэтиламина отфильтровывают, фильтрат упаривают досуха, получая трициклические основания, которые переводят в соли I (a-г) обычными способами.

**Соли 10-диалкиламиноэтил-2,3,4,10-тетрагидроимидазо[1,2-а]бензимидазолов (Ie-i).** Смесь 10 ммоль амина IIIe-g и 10 ммоль дигалогенпропана в 10 мл абсолютного ксилола кипятят 1,5-5 ч. Вначале наблюдается растворение амина, а затем из реакционной смеси постепенно выделяется густое масло, осаждающееся на дне колбы и частично кристаллизующееся при кипении. По окончании реакции (контроль ТСХ:  $R_f$ исходного амина  $\sim 0,2$ ;  $R_f$ конечного трицикла  $\sim$

0,45) к охлажденной смеси добавляют 50 мл воды, встряхивают до полного растворения выделившейся соли пиримидо[1,2-*a*]бензимидазола, водный слой отделяют, подщелачивают 22%-м раствором аммиака до рН 9 и экстрагируют трициклическое основание хлороформом (4 x 15 мл). Хлороформный экстракт упаривают до объема 8-10 мл и пропускают через слой  $Al_2O_3$ , элюент -  $CHCl_3$ , очищая таким образом основание продукта от смол. Хлороформ из элюата испаряют; оставшееся прозрачное, чуть желтоватое масло, хорошо растворимое в воде и многих органических растворителях, сушат в вакуум-эксикаторе над КОН. Растворяют в 20 мл сухого эфира или ацетона и подкисляют раствор или концентрированной  $HBr$ , или эфирным раствором газообразного  $HCl$ , или концентрированной  $H_2SO_4$ . Выпавшие кристаллические осадки отделяют, промывают сухим эфиром и в случае соли I (e) сушат в вакуум-эксикатор над  $P_2O_5$ , а соли I (g-i) – в сушильном шкафу при 105-110°C. Солянокислые и бромистоводородные соли можно получать также, пропуская сухие газообразные  $HCl$  и  $HBr$  через растворы трициклических оснований в сухом бензоле, толуоле или эфире. Все соли весьма гигроскопичны, образуют с водой устойчивые кристаллогидраты, которые в вышеуказанных условиях сушки не теряют кристаллизационную воду.

**2-(2-Диалкиламиноэтил)бензимидазолы (IVc-e).** Смесь 10 ммоль гидрохлорида VII и 30 ммоль соответствующего вторичного амина (диэтиламин, пиперидин, морфолин) в среде абсолютного бензола перемешивают при 25-35°C до полного протекания реакции, после чего гидрохлорид вторичного амина отфильтровывают, промывают бензолом. Бензол из фильтрата упаривают и остаток (IVc-e) перекристаллизовывают.

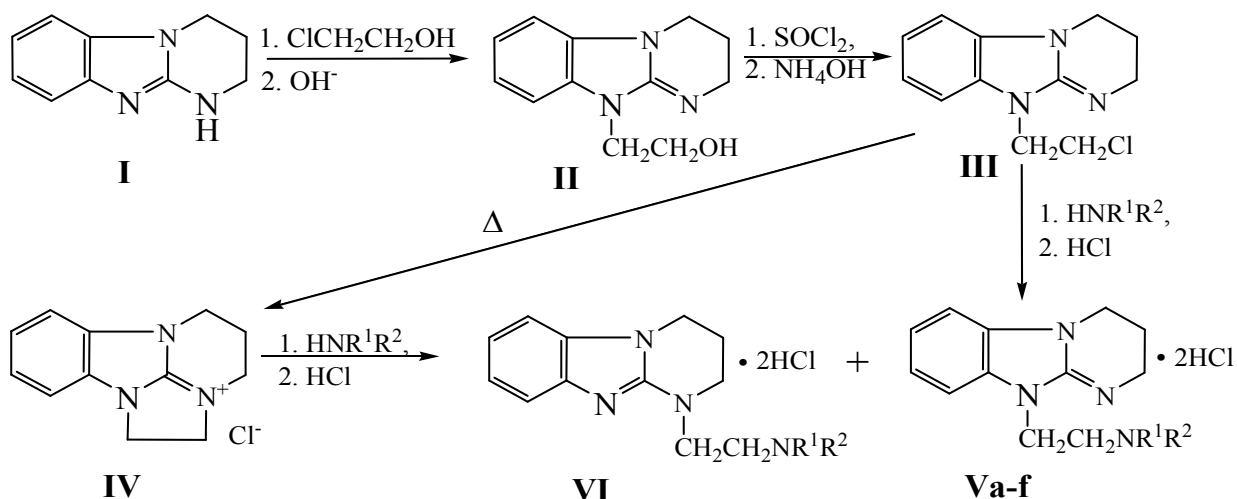
**Соли 1-R<sup>1</sup>-1,2,3,4-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазолов (IIa-e)** получают аналогично изомерам I при кипячении аминов IV с 1,3-дигалогенпропаном в абсолютном ксилоле в течение 12-16 ч. Соли II с-e гигроскопичны, а их основания представляют собой густые, довольно быстро темнеющие при хранении масла.

### 3.7. Синтез 10-алкиламиноэтил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолов

Алкилирование тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола (I), который существует преимущественно в виде 1*H*-таутомера, в нейтральной среде протекает по пиридиновому атому азота. С помощью этого метода действием этиленхлоргидрина в ядро трицикла введен гидроксиэтильный радикал. Действие хлористого тионила в сухом  $\text{CHCl}_3$  на спирт II, полученный при обработке первоначально образующегося гидрохлорида II щелочными агентами, приводит к замещению гидроксигруппы на атом хлора. Было изучено замещение галогена в 10-(2-хлорэтил)-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]-бензимидазоле (III). В отличие от нуклеофильного замещения атома хлора в N-хлорэтилзамещенных 2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола на различные амины, которое протекает гладко и с хорошими выходами (В.А. Анисимова 1988, 2010), при 5-минутном кипячении соединения III с первичными или вторичными аминами в толуоле выпадает осадок, который по данным ЯМР  $^1\text{H}$ -спектроскопии является продуктом внутримолекулярной кватернизации хлорэтилзамещенного – тетрациклом IV. В его спектре наблюдаются сигналы протонов трех групп  $\text{CH}_2$  пиримидинового кольца при 3,45 (т), 2,35 (кв) и 4,03 (т) м.д., а также двух  $\text{CH}_2$ -групп имидазолинового кольца – при 4,24 (м) и 4,44 (м) м.д. Образование этого продукта связано с высокой основностью пиридинового атома азота в трицикле I и его производных (рKa 10,6-10,8; ср. рKa для 2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолов 6,5-6,7).

Строение соли IV подтверждено также холостыми опытами: кипячением соединения III в толуоле или ксилоле, а также при нагревании его при температуре, близкой к температуре плавления, в результате чего тетрацикл IV получен с количественным выходом.





$\text{HNR}^1\text{R}^2 = \text{NHCHMe}_2$  (a),  $\text{NHCM}_3$  (b),  $\text{NHCH}(\text{CH}_2)_5$  (c),  
 $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{NMe}$  (d),  $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  (e),  $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$  (f)

Дальнейшее нагревание реакционной смеси под действием аминов приводит к раскрытию имидазолинового кольца по связям N-CH<sub>2</sub> и образованию трудно разделяемой смеси изомерных 10- и 1-алкиламиноэтильных производных V и VI. Протекание этой реакции доказано получением известных 1- (VI<sub>f</sub>) и 10-(2-морфолиноэтил)-1(10),2,3,4-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазолов (V<sub>e</sub>) [В.А. Ани-симова, 2002] в соотношении 1:6 при нагревании тетрацикла IV в морфолине и последующем разделении изомеров с помощью тонкослойной хроматографии на  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  (элюент –  $\text{CHCl}_3$ ).

В результате исследования температурных режимов проведения реакции замещения были подобраны условия, позволяющие исключить протекание кватернизации и синтезировать амины Va-e с высокими выходами. Атом хлора в соединении III весьма подвижен и замещение на аминогруппу начинается уже при комнатной температуре, однако реакция в этом случае протекает довольно длительно. В случае 1-метилпиперазина (т.кип. 137-139 °С) и циклогексиламина (т.кип. 133-134 °С) замещение происходит при 50-55 °С без протекания побочных процессов. С низкокипящими аминами (трет-бутиламин, изопропиламин) реакцию проводят либо в запаянной ампуле, либо в растворе толуола.

**Гидрохлорид 10-(2-гидроксиэтил)-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]-бензимидазола (II·HCl).** В перемешиваемый раствор 1,73 г (10 ммоль) трицикла I в 4 мл сухого ДМФА, полученный при нагревании, вносят 1 мл (15 ммоль) этиленхлоргидрина и смесь кипятят до исчезновения пятна исходного соединения на ТСХ (3-4 ч). Оставляют на ночь при 5–7 °С и выпавший осадок соли II отфильтровывают, тщательно промывают ацетоном. Выход 2,16–2,30 г.

**10-(2-Гидроксиэтил)-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазол (II).** Вышеописанный гидрохлорид обрабатывают 22%-м раствором NH<sub>4</sub>OH в течение 20-30 мин и экстрагируют хлороформом. Для очистки экстракт пропускают через слой оксида алюминия, элюируя основание II хлороформом. Остаток после испарения растворителя перекристаллизовывают.

**10-(2-Хлорэтил)-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазол (III).** К раствору 2,17 г (10 ммоль) спирта II в 10-15 мл сухого хлороформа прибавляют при охлаждении 0,7 мл (15 ммоль) хлористого тионила, а затем смесь кипятят 4-5 часов, контролируя протекание реакции с помощью ТСХ (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, элюент – CHCl<sub>3</sub>-EtOAc, 1:1; R<sub>f</sub> исходного – 0,1, R<sub>f</sub> конечного – 0,65). Элюат испаряют, остаток обрабатывают петролейным эфиром или гексаном, отгоняя последние вместе с избытком хлористого тионила. Выход гидрохлорида III 2,70 г.

Соль вводят в дальнейшие превращения без дополнительной очистки или переводят с помощью раствора аммиака в основание III, которое также используется в реакциях с различными аминами или фенолятами натрия.

**Тетрацикл (IV).** Растворяют при нагревании 0,24 г (~1 ммоль) хлорэтилпроизводного III в 3 мл толуола. Из полученного раствора сразу же начинает выпадать белоснежный осадок. Реакционную смесь кипятят 2 ч, охлаждают, выпавший осадок отфильтровывают, тщательно промывают ацетоном и перекристаллизовывают. Выход 0,23 г.

Аналогичный результат получен при выдерживании основания III в течение 1 ч при температуре 110-115 °С. Выход тетрацикла IV – 96 %.

**Дигидрохлорид 10-[2-(2-пропил)аминоэтил]-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазола (Va).** Смесь 1,89 г (8 ммоль) 10-хлорэтилзамещенного III и 6,7 мл (64 ммоль) изопропиламина нагревают в запаянной ампуле в автоклаве в течение 5 ч на масляной бане при 130°C. Ампулу охлаждают, вскрывают и избыток амина испаряют досуха в вакууме, остаток разбавляют 20 мл воды, подщелачивают 22% раствором NH<sub>4</sub>OH до pH 9-10 и экстрагируют CHCl<sub>3</sub>. После испарения хлороформа остается основание Va в виде желтоватого масла. Его растворяют в 20 мл ацетона и осторожно подкисляют раствором HCl в 2-PrOH до pH 2-3. Тщательно перемешивают и через 30 мин выпавший осадок дигидрохлорида Va отфильтровывают, промывают ацетоном, перекристаллизовывают и высушивают до постоянного веса. Выход 1,64 г.

**Дигидрохлорид 10-[2-(*трет*-бутил)аминоэтил]-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазола (Vb).** Смесь 2,36 г (10 ммоль) 10-хлорэтилзамещенного III и 2,6 мл (25 ммоль) *трет*-бутиламина в 10 мл абсолютного толуола нагревают при 50-55°C до исчезновения пятна исходного соединения на ТСХ. Затем растворитель и избыток амина упаривают в вакууме, остаток растворяют в воде и далее поступают так, как описано в синтезе соединения Va. Выход 2,95 г.

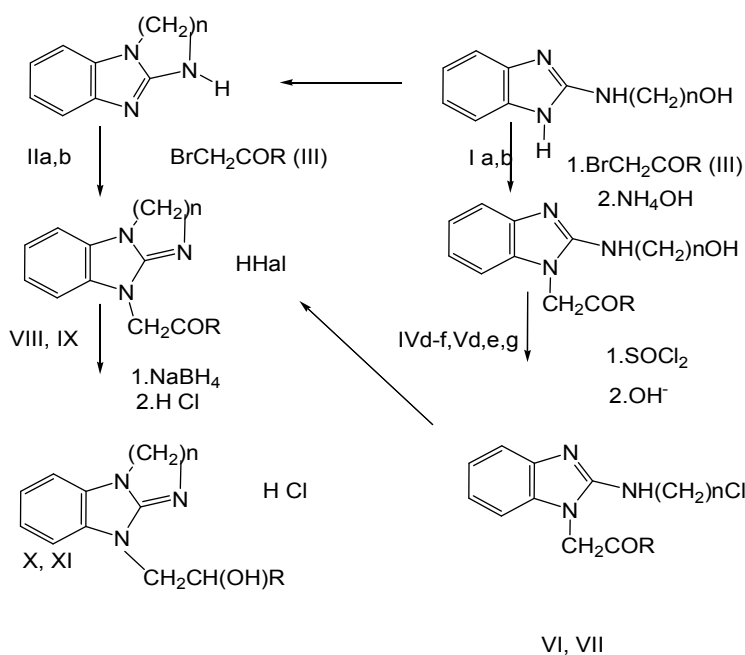
**Дигидрохлорид 10-(2-циклогексиламиноэтил)-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазола (Vc).** Тщательно растертую смесь 2,36 г (10 ммоль) 10-хлорэтилзамещенного III и 2,3 мл (20 ммоль) циклогексиламина выдерживают при 55 °C до полного протекания реакции (~48 ч). При нагревании смесь превращается в раствор, а затем закристаллизовывается. Массу охлаждают, растирают с 10 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывают, промывают эфиром и ацетоном несколько раз, пока осадок не перестанет расплываться на воздухе. Полученный моногидрохлорид основания Vc суспендируют в ацетоне, нагревают смесь до кипения и добавляют раствор HCl в 2-PrOH до pH 1. Выдерживают смесь 30 мин при комнатной температуре, охлаждают на ледяной бане и выпавший осадок дигидрохлорида Vc отфильтровывают, промывают ацетоном и эфиром. Выход 3,08 г.

**Дигидрохлорид 10-[2-(4-метил-1-пиперазино)этил]-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазола (Vd).** Смесь 2,35 г (10 ммоль) основания III и 2,8 мл (25 ммоль) 4-метилпиперазина растворяют в 25 мл абсолютного толуола и нагревают до полного протекания реакции при 55°C. Затем реакционную массу кипятят с активированным углем 15-20 мин и пропускают через слой  $Al_2O_3$ , а затем в толуольный раствор пропускают ток газообразного HCl до кислой реакции. Через 30-40 мин осадок дигидрохлорида Vd отфильтровывают, промывают толуолом и эфиром, высушивают и перекристаллизовывают. Выход 2,56 г.

**Дигидрохлорид 10-[2-(4-гидроксиэтил-1-пиперазино)этил]-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазола (Ve).** Смесь 2,36 г (10 ммоль) хлорэтилпроизводного III и 3,2 г (25 ммоль) 4-гидроксиэтилпиперазина в 15 мл абсолютного ксилола кипятят ~20 час. В реакционную массу добавляют 15 мл воды и подкисляют раствором HCl до pH 3-4, органический слой отделяют, а водный кипятят с активированным углем 15-20 мин. Отфильтрованный от угля раствор подщелачивают 22 % раствором  $NH_4OH$  до pH 8-9 и экстрагируют  $CHCl_3$  (3×10 мл). Хлороформный экстракт хорошо промывают водой и пропускают через слой  $Al_2O_3$ . Полученное после упаривания элюата основание Ve представляет собой желтое масло, которое высушивают в вакуум-эксикаторе над КОН. Затем его растворяют в 20 мл сухого ацетона и подкисляют насыщенным раствором HCl в эфире или 2-PrOH, осадок дигидрохлорида отфильтровывают, промывают ацетоном. Выход 2,33 г.

### 3.8. Синтез N-ацилметилзамещенных 9H-2,3-дигидроимидазо- и 10H-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолов и продуктов их восстановления

N-Ацилметилзамещенные VIII и IX получены двумя путями: во-первых, внутримолекулярной термической циклизацией 1-ацилметил-2-(ω-хлоралкиламино)бензимидазолов (VI, VII), синтезированных действием хлористого тионила на 1-ацилметил-2-ωгидроксиалкиламино)бензимидазолы (IV, V). Синтез соединений, подобных последним, был предложен нами ранее [В.А. Анисимова, 1995; В.А. Анисимова, 2002]. При этом из-за легкости циклизации хлорпропиламинов VII до производных пиримидобенз-имидазола IX выделить соединения VII в индивидуальном виде не удастся. Второй путь заключался в прямом алкилировании NH-незамещенных трициклических систем IIa, б ацилметилгалогенидами III в нейтральных условиях, которое протекало по внутриколецевому "пиридиновому" атому азота [R.J. North, 1996; В.А. Анисимова, 1995]. Спирты X, XI были получены восстановлением кетонов VIII, IX борогидридом натрия в MeOH или EtOH.



Ia, IIa, IV, VI, X  $n=2$ ; I b, II b, V, VII, IX, XI  $n=3$ ; III-Xa R=CH<sub>3</sub>; b: R=C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>; c: R=C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl-4; e: R=C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OCH<sub>3</sub>-4; f: R=C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>- $\alpha$ ; g: R=C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>-3,4; VIII, IX, Hal=Cl, Br

Строение полученных соединений VIII-XI и промежуточных продуктов их синтеза подтверждено данными ИК- и ПМР-спектроскопии. В ИК-спектрах аминоспиртов IV, V наблюдается характеристическое поглощение карбонильной группы при 1700-1720 см<sup>-1</sup> и две полосы в областях 3060-3150 и 3210-3310 см<sup>-1</sup>, отвечающие поглощению NH- и OH-групп. В спектрах гидрохлоридов 2-хлоралкиламинов VI, VII имеются полосы поглощения при 1660-1680 (C=N<sup>+</sup>-H), 1695-1720 (C=O) и 3200-3325 (NH), при переходе к основаниям VI, VII группа C=N поглощает при 1600-1610 см<sup>-1</sup>, карбонильная группа — при 1680-1700 см<sup>-1</sup>, а поглощение группы NH остается в той же области, что и у гидрохлоридов. Последняя исчезает после циклизации соединений VI, VII в трициклические производные VIII, IX в их ИК-спектрах группы C=O поглощают при 1695-1720 см<sup>-1</sup>, эти полосы при переходе к спиртам X, XI исчезают; в основаниях спиртов наблюдается поглощение группы C=N при 1650-1665 см<sup>-1</sup> и широкая полоса ассоциированных групп OH в области 2690-3060 см<sup>-1</sup>. в спектрах солей X, XI имеются полосы при 1670-1680 (C=N<sup>+</sup>-H), 3274-3290 (N+H) и 3458 см<sup>-1</sup> (OH).

Исходные бромкетоны III синтезированы бромированием соответствующих ацетофенонов в эфирно-диоксановом растворе [М.И. Шевчук, 1995] или спиртах (этанол, 2-пропанол) [В.А. Анисимова, 2005], а ацетона и пинаколина в разбавленной уксусной кислоте [Вейганд-Хильгетаг, 1969].

**Гидрохлорид 9-ацетонил-2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазола (VIIIa·HCl).**

А. Смесь 1,59 г (10 ммоль) основания IIa и 2 мл (25 ммоль) хлорацетона нагревают 30-40 мин на масляной бане при 130 °С. Выпавший после охлаждения осадок отфильтровывают, тщательно промывают сухим ацетоном, получают 2,0 -2,34 г слегка розоватых кри-

сталлов гидрохлорида VIII а. После перекристаллизации соль сушат при 105-110 °С.

Б. Реакция 5 ммоль основания IIа и 7,5 ммоль хлорацетона в 5 мл ДМФА (кипячение 1-1,5 ч), разбавление реакционной массы 20 мл ацетона приводит к выделению технического продукта, основание которого выделяют раствором аммиака и очищают с помощью колоночной хроматографии ( $Al_2O_3$ , элюент -  $CHCl_3$ ). Затем чистое основание, высушенное в вакуум эксикаторе над КОН, в виде раствора в сухом толуоле или ацетоне переводят в гидрохлорид с помощью насыщенного раствора HCl в эфире. Гигроскопичные кристаллы сушат в вакууме вначале при 80°C, а затем при 110 °С. Выход 78 %.

**Гидробромид 9-ацетонил-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола (VIIIa).** Получен при трехчасовом кипячении 1,59 г (10 ммоль) соединения IIа с 15 % избытком бромацетона в смеси 40 мл ацетона и 15 мл MeCN с выходом 2,0 г (67,4 %). К аналогичному выходу (65 %) приводит реакция с бромацетоном в ДМФА. Также гидробромид VIIIa можно получить при действии концентрированного HBr на ацетоновый раствор основания VIII. Сушат его при 105-110°C.

**Гидрохлорид 10-ацетонил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола (IXa·HCl)**

А. Раствор 0,35 г (2 ммоль) трицикла II б и 0,24 мл (3 ммоль) хлорацетона в 2-3мл ДМФА кипятят 1 ч, охлаждают и оставляют на ночь в холодильнике. Затем реакционную массу разбавляют 5-8 мл сухого эфира, осадок отфильтровывают, промывают ацетоном. Выход хроматографически чистого вещества 0,48 г.

Б. При кипячении 10 ммоль соединения II б и 15 ммоль хлорацетона в 25 мл MeCN в течение 5-6ч гидрохлорид выделен с выходом 2,52 г.

**Гидробромид 10-ацетонил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола (IXa·HBr).** К теплomu раствору 1,73 г (10 ммоль) трицикла II б в 4 мл сухого и свободного от аминов ДМФА приливают 1 мл свежеперегнанного бромацетона (~15 % избыток). Смесь кипятят 5-10 мин, охлаждают (при этом выпадает крупнокристалличе-

ский осадок), разбавляют 10 мл ацетона и 5 мл эфира. Осадок гидробромида отфильтровывают, промывают ацетоном, получая 2,6 г белоснежных кристаллов. Кипячение (4-5 ч) исходных соединений в MeCN (30 мл) дает 2,9 г (93 %) искомой соли.

**Гидробромид 9-пивалоилметил-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола (VIIIb·HBr).** Смесь трицикла IIa (1,59 г, 10 ммоль) и бромпинаколина (2 мл, 14 ммоль) в 20 мл MeCN кипятят 4-5ч. На следующий день осадок гидробромида (3,1 г) отфильтровывают, промывают ацетоном и перекристаллизовывают.

**Гидрохлорид 9-пивалоилметил-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола (VIIIb·HCl).** Гидробромид VIII b (1,69 г, 5 ммоль) обрабатывают 22 % NH<sub>4</sub>OH (10 мл) при энергичном перемешивании и 20-25 °С в течение 2-3 ч. Затем осадок отфильтровывают, промывают водой и сушат на воздухе при комнатной температуре. Выделенное основание переводят в гидрохлорид действием концентрированной HCl в среде ацетона.

**Гидробромид 10-пивалоилметил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола (IXb·HBr).** Бромпинаколин (1,8 мл, 12,5 ммоль) добавляют к теплomu раствору трициклического основания IIb (1,73 г, 10 ммоль) в 15 мл сухого ДМФА. Смесь кипятят при перемешивании до выпадения осадка, затем нагревают на кипящей водяной бане 30-40 мин. После охлаждения разбавляют 20 мл сухого эфира, осадок отфильтровывают, промывают ацетоном, получая 3,25 г гидробромида.

**Гидробромид 9-фенацил-2,3-дигидроимидазо-[1,2-а]бензимидазола (VIIIc)** синтезируют аналогично соли VIII b исходя из трицикла II a (1,59 г, 10 ммоль) и фенацилбромида (2,34 г, 10 ммоль) с выходом 3,3 г. Соответствующий гидрохлорид (VIIIb·HCl) получен так же, как соль VIII b.

**Гидрохлорид 10-фенацил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола (IXc·HCl).** Растворяют 1,38 г (8 ммоль) пиримидо[1,2-а] бензимидазола IIb в 50 мл сухого ксилола при нагревании, раствор охлаждают до ~50-80 °С, прибавляют 1,59 г (8 ммоль) фена-



цилбромиды и кипятят 1 ч. Выпавший осадок после охлаждения отделяют, промывают петролейным эфиром, подсушивают на воздухе и обрабатывают 22 % раствором  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Осадок основания IXс отделяют и очищают перекристаллизацией из  $\text{MeCN}$ . Выход 2,79 г. Гидрохлорид получают при подкислении раствора полученного основания в ацетоне концентрированной  $\text{HCl}$ .

Эту реакцию можно проводить также в среде ДМФА (10 мл на 10 ммоль трицикла) или 2-PrOH. Выходы во всех случаях высокие (92-98 %).

**Гидробромид 9-(4-метоксифенацил)-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола (VIIIe·HBr).** Растворяют при нагревании 1,59 г (10 ммоль) трицикла IIa в 5 мл ДМФА, прибавляют 2,29 г (10 ммоль) 4-метоксифенацилбромиды, тщательно перемешивают, нагревают до кипения и образования раствора, из которого очень быстро выпадает осадок. Реакционную смесь нагревают 30-40 мин на кипящей водяной бане. Охлаждают, разбавляют 20 мл ацетона и 10 мл эфира. Через 30 мин осадок отфильтровывают, промывают ацетоном. Выход соли 3,55 г.

**Гидробромид 10-(4-метоксифенацил)-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазола (IXe·HBr).** Получен аналогично соли VIIIe из эквимольных количеств (10 ммоль) соединения IIb и 4-метоксифенацилбромиды в 5 мл ДМФА с выходом 3,98 г.

**1-Ацилметил-2-(ω-гидроксиалкиламино)бензимидазолы (IV, V).** Кипятят 20 ммоль аминспирта I a, b и 20-25 ммоль соответствующего фенацилбромиды III в 20 мл 2-PrOH 3-4ч. Охлаждают, осадок гидробромиды 1-ацилметил-2-(ω-гидроксиалкиламино) бензимидазола отделяют, промывают спиртом и ацетоном. Выделенный гидробромиды обрабатывают избытком 22 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  в течение 7-8 ч при комнатной температуре и получают основания IV, V ( $R_F$  0,1-0,12).

**2-(ω-Хлоралкиламино)-1-ацилметилбензимидазолы (VI, VII).** К суспензии 4,5 ммоль основания или соли IV, V в 30 мл сухого  $\text{CHCl}_3$  при комнатной температуре и перемешивании прибавляют по каплям 0,6 мл (~ 8 ммоль)  $\text{SOCl}_2$ . Смесь кипятят до полного протекания реакции ( $R_F$  конечного продукта 0,75-0,85), при этом из образую-

щегося раствора в некоторых случаях наблюдается выпадение осадка гидрохлорида хлоралкиламина VI, VII, который отфильтровывают, промывают хлороформом и петролейным эфиром. В случае невыпадения осадка хлороформ упаривают и остаток обрабатывают петролейным эфиром. Основания VI, VII получают обработкой полученных гидрохлоридов 22 % NH<sub>4</sub>OH и перекристаллизацией из подходящего растворителя.

**Гидрохлориды 9-ацилметил-2,3-дигидроимидазо [1,2-*a*]бензимидазолов (VIII·HCl).** Выдерживают 3 ммоль основания хлорэтилзамещенного VI при температуре на 10-15 °C выше температуры плавления до полной кристаллизации расплава (20-30 мин), охлаждают, обрабатывают 22% NH<sub>4</sub>OH и экстрагируют хлороформом. Экстракт пропускают через слой Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, элюируя основание VIII CHCl<sub>3</sub> ( $R_F \sim 0,5$ ). Остаток после испарения CHCl<sub>3</sub> из элюата перекристаллизовывают, а затем растворяют в ацетоне или суспендируют в EtOH при нагревании и подкисляют концентрированной HCl до pH 2-3. Циклизация оснований VI протекает также при кипячении в абсолютном ксилоле (1,5-3ч) или при нагревании в сушильном шкафу при 125-130°C (3-6ч).

**Гидрохлориды 10-ацилметил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо [1,2-*a*]бензимидазолов (IX·HCl).** После обработки гидрохлоридов хлорпропиламинов VII щелочными агентами и экстракции реакционной массы хлороформом выделяют смесь, в которой присутствует как основание VII, так и продукт его циклизации IX. Хлороформный экстракт сушат безводным K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и либо кипятят до полного перехода хлорпропиламина VII в трицикл IX, либо хлороформ испаряют и остаток выдерживают при 100-110 °C до полного завершения реакции циклизации. Выделение трициклического основания и получение солей ведут обычными способами.

**N-(2-алкил(арил)-2-гидроксиэтил)замещенные трициклы X, XI.** К перемешиваемой суспензии 10 ммоль ацилметилзамещенных VIII, IX в 50 мл MeOH небольшими порциями добавляют 0,4 г

(10 ммоль)  $\text{NaBH}_4$  в течение 15-20 мин, после чего массу перемешивают еще 3 ч. На следующий день подкисляют 10%  $\text{HCl}$  до pH 2-3, спирт упаривают досуха, остаток обрабатывают 22 %  $\text{NH}_4\text{OH}$  и экстрагируют хлороформом. После испарения  $\text{CHCl}_3$  остается белое кристаллическое вещество, которое перекристаллизовывают из подходящего растворителя, а затем подкислением его горячего спиртового раствора насыщенным раствором  $\text{HCl}$  в 2-PrOH переводят в гидрохлорид.

В случае мало растворимых в холодной воде гидрохлоридов, остаток после испарения спирта обрабатывают водой, отфильтровывают, промывают водой и перекристаллизовывают.

### **3.9. Синтез ароилметилзамещенных трициклических бензимидазольных систем, содержащих гидроксигруппы в ароильном радикале**

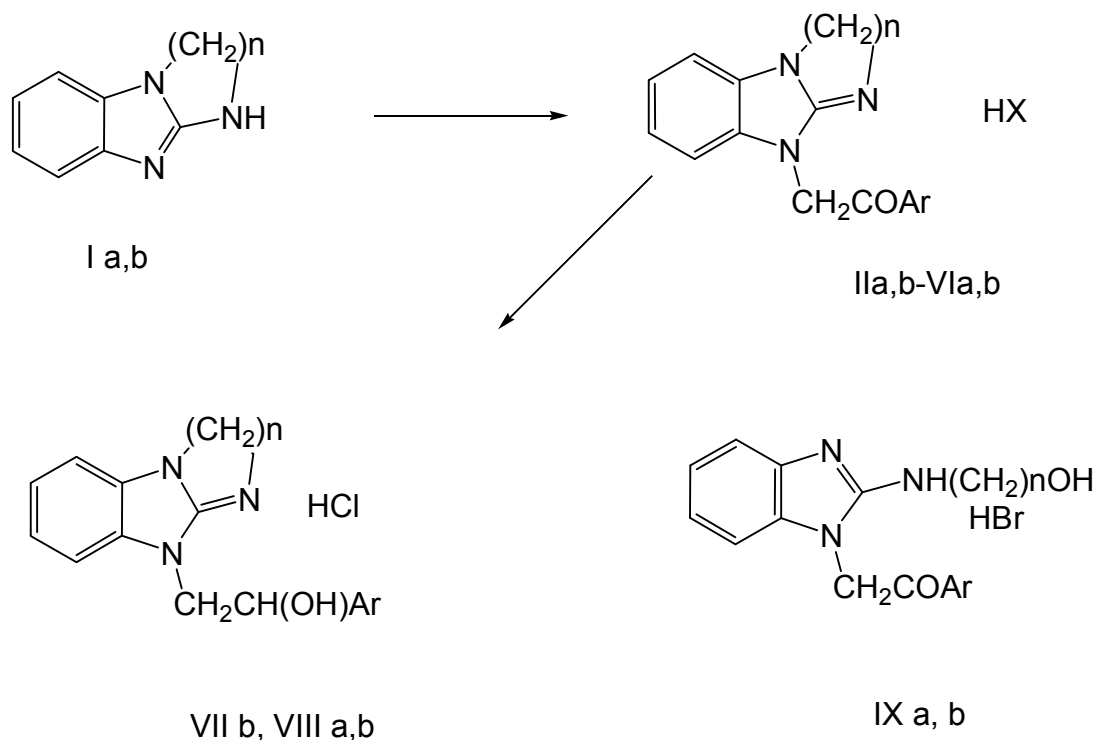
Соединения II-V могут быть получены прямым введением в трициклы Ia, b ацилметильных групп с помощью соответственно замещенных фенацилбромидов.

В отличие от гладко протекающих реакций трициклов Ia, b с 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенацилбромидом до производных IV, взаимодействие V с 4-гидрокси- и 3,4-дигидроксифенацилбромидами идет неоднозначно с образованием кетонов II, III, загрязненных продуктами осмоления, от которых не удастся очистить конечные продукты ни перекристаллизацией, ни с помощью колоночной хроматографии из-за их низкой хроматографической подвижности. Однако при омылении в концентрированной  $\text{HBr}$  метоксигрупп в N-п-метоксифенацилзамещенных производных этих гетероциклов, которые описаны в работе В.А. Анисимовой (2006), и 3,4-диметоксифенацилзамещенных производных VI 4-гидрокси- и 3,4-дигидроксифенацилзамещенные производные II и III получены в довольно чистом виде и с хорошими выходами. При восстановлении кетонов IV, VI

борогидридом натрия в MeOH или EtOH получены спирты соответственно VII, VIII.

Строение полученных соединений II-IX подтверждено данными спектроскопии. В ИК-спектрах ароилметилзамещенных II-VI наблюдается характеристическое поглощение карбонильных групп в области 1695-1720 см<sup>-1</sup>. Эти полосы поглощения исчезают из спектров спиртов VII, VIII.

Бромирование окси- и диоксиацетофенонов проводят с помощью CuBr<sub>2</sub> в системе растворителей CHCl<sub>3</sub>-EtOAc [L. C. King, 1964; C. J. Sharpe, 1971]. 3,4-Диметоксифенацилбромид получают бромированием соответствующего ацетофенона в спирте по методике, описанной для 4-метоксиацетофенона в работе В.А. Анисимовой (2005)]. Ацетилирование 2,6-ди-*трет*-бутилфенола осуществлено в избытке хлористого ацетила в присутствии безводного хлористого алюминия при 10 °С [Н.В. Портных, 1966]. 3,5-Ди-*трет*-бутил-4-гидроксибром-ацетофенон получен при действии эквивалентного количества брома на соответствующий ацетофенон в октане или изооктане [А.А. Володькин, 1966; В.В.Ершов,1972].



I-VII a: n=1, b: n= 2; IX a: n=2, b: n=3; II: Ar=C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH-4; III: Ar=C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(OH)<sub>2</sub>-3,4; IV, V\*, VIII, IX: Ar=3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил; VI, VII: Ar=C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. \*в соединении Vb в положениях 7 и 8 находятся Me-группы.

**Гидробромид 9-(3,4-диметоксифенацил)-2,3-дигидроимидазо-[1,2-*a*]бензимидазола (VIa·HBr).** В нагретый раствор 1,59 г (10 ммоль) трицикла Ia [А. Ф. Пожарский, 1988] в смеси 40 мл ацетона и 25 мл ацетонитрила вносят 2,59 г (10 ммоль) 3,4-диметоксифенацилбромид и кипятят смесь при перемешивании 3-4 ч. На следующий день осадок отфильтровывают, промывают ацетоном, получая 3,8 г белоснежного осадка.

**Гидробромид 10-(3,4-диметоксифенацил)-2,3,4,10-тетра гидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазола (VIb·HBr).** Смесь 1,73 г (10 ммоль) основания Ib и 2,59 г (10 ммоль) 3,4-диметоксифенацил бромид в 5 мл сухого, освобожденного от аминов ДМФА, быстро нагревают до кипения, кипятят 5 мин, не допуская потемнения массы, и еще 30 мин нагревают на кипящей водяной бане. Охлаждают и осадок отфильтровывают через 2 ч, первоначально разбавив массу двойным количеством сухого эфира, промывают эфиром и получают 2,99 г белоснежных шелковистых иголочек.

**Гидробромид 9-(4-гидроксифенацил)-2,3-дигидроимидазо-[1,2-*a*]бензимидазола (IIa·HBr).** Раствор 3,88 г (10 ммоль) гидробромид 9-(4-метоксифенацил)-2,3-дигидроимидазо [1,2-*a*] бензимидазола [7] в 40 мл 48 % HBr кипятят 4-6 ч. На следующий день осадок (3,42 г, 91,9 %) отфильтровывают, промывают ацетоном (3 x 10 мл) и эфиром (10 мл), а затем перекристаллизовывают из смеси 30 мл EtOH и 20 мл H<sub>2</sub>O с использованием активированного угля, получая 2,7 г белых мелких кристаллов.

**Гидробромиды IIb и IIIa,** получают аналогично соли II a при омылении 4-метоксифенацил- и 3,4-диметоксифенацилзамещенных трициклов Ia, b в концентрированной HBr.

**Гидрохлорид 10-(4-гидроксифенацил)-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазола (IIb·HCl).** Действием конц. NH<sub>4</sub>OH на суспензию гидробромида в горячем EtOH получают основание II b. Его суспендируют в EtOH, нагревают до кипения и полученный раствор подкисляют раствором HCl в 2-PrOH до pH 2-3. Охлаждают и выпавший гидрохлорид II b отфильтровывают, промывают ацетоном.

**Гидробромид 9-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенацил)-2,3-дигидримидазо 1,2-*a*]бензимидазола (IVa·HBr).** В горячий раствор 1,2 г (7,5 ммоль) основания Ia в смеси 30 мл ацетона и 16 мл ацетонитрила вносят 2,5 г (7,5 ммоль) 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенацилбромид и кипятят смесь 6-8 ч. На следующий день белоснежный осадок отфильтровывают, промывают ацетоном, получая 3,0 г хроматографически чистой соли.

**Гидробромид 10-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенацил)-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазола (IVb·HBr).** К суспензии 1,3 г (7,5 ммоль) трицикла Ib в 6 мл сухого ДМФА прибавляют 2,46 г (7,5 ммоль) 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенацилбромид, быстро нагревают смесь при перемешивании до растворения осадка и кипятят 10 мин. Охлаждают, прибавляют двойной избыток сухого эфира, тщательно перемешивают до полной кристаллизации. Через 40-50 мин осадок отфильтровывают, промывают эфиром, получая 3,68 г соли, представляющей собой кристаллосольват с молекулой ДМФА, который не удастся удалить при высушивании. Однако при обработке этого осадка 15 мл MeCN при комнатной температуре он растворяется и из образовавшегося раствора сразу же выпадает крупнокристаллический кристаллосольват IV b с молекулой MeCN. Его кристаллизуют из 65 мл MeCN и длительно высушивают при 110°C, получая 3,36 г чистого гидробромида IV b.

По аналогичной методике синтезируют также и соль V b.

**Основание IVb** получают, обрабатывая 3 г гидробромида IV b избытком 22 % NH<sub>4</sub>OH. Соль оставляют под слоем аммиака на сутки при комнатной температуре, затем осадок отфильтровывают, промывают водой и сушат на воздухе. Выход 2,1 г. Основание трудно рас-

творимо в  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $\text{EtOH}$ ,  $2\text{-PrOH}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{MeCN}$ . В ДМФА вещество разлагается, поэтому далее основание IV b используют без дополнительной очистки.

**Гидрохлорид IVb·HCl.** Суспензию 2 г полученного основания в 20 мл воды нагревают до кипения и осторожно подкисляют конц. HCl, при этом наблюдается постепенное растворение осадка и при pH 2-3 образуется раствор, из которого сразу же выпадает осадок гидрохлорида. Смесь охлаждают и осадок (2,05 г) ототфильтровывают. Соль трудно растворяется в воде, но легко в водных растворах низших спиртов, кристаллизуется из очень небольшого объема EtOH, но лучше из 2-PrOH.

**Сукцинат IVbC.** Смесь 1,68 г (4 ммоль) основания IV b и 0,48 г (4 ммоль) янтарной кислоты растворяют при нагревании в 10 мл MeOH, образовавшийся желтоватый раствор оставляют стоять при комнатной температуре. На следующий день метанол упаривают досуха, маслянистый остаток при растирании кристаллизуется в слегка желтоватые кристаллы, которые перекристаллизовывают из небольшого объема EtOAc. Сушат в вакуум-эксикаторе над  $\text{P}_2\text{O}_5$ . В спектре соли IVbC четыре протона мостика  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$  янтарной кислоты проявляются в виде синглета при 2,27 м.д.

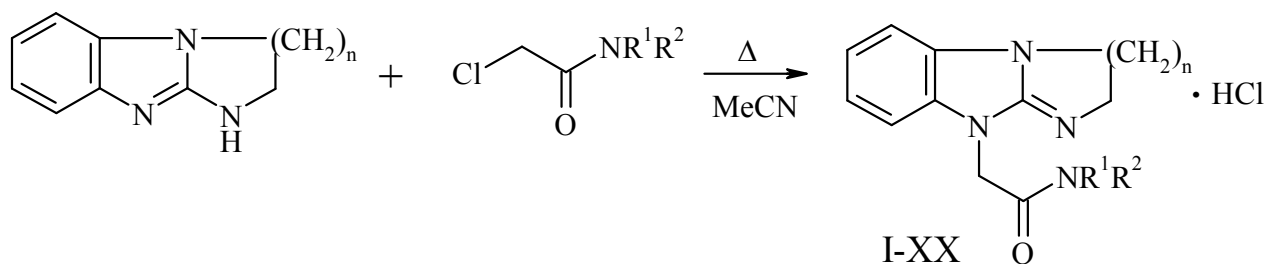
**Спирты VII b, VIIa, b.** К перемешиваемой суспензии 5 ммоль основания или гидробромида N-ацилметилзамещенного (IV, VI) в 30 мл MeOH прибавляют небольшими порциями 0,4 г (10 ммоль)  $\text{NaBH}_4$  в течение 1 ч. На следующий день массу подкисляют конц. HCl до pH 2-3, упаривают досуха и остаток обрабатывают холодной водой, гидрохлорид спирта отфильтровывают и промывают дважды водой на фильтре. После кристаллизации сушат при 105-110°C.

**Гидробромиды 1-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенацил)-2( $\omega$ -гидроксиалкиламино)бензимидазолов (IXa, b·HBr).** Смесь 10 ммоль 2-гидроксиэтил(пропил)аминобензимидазола и 10 ммоль 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенацилбромида в 15-20 мл 2-PrOH кипятят 5-7 ч. Охлаждают, добавляют полуторное количество ацетона и перемешивают до полной кристаллизации осадка, который от-

фильтровывают, промывают ацетоном до бесцветной промывной жидкости. Остаток после упаривания маточного раствора досуха обрабатывают ацетоном, получая дополнительное количество конечного продукта.

### 3.10. Синтез амидов 2,3-дигидроимидазо- и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолил-N-уксусных кислот

С целью исследования влияния ацетамидных группировок на биологическую активность трициклов изучено взаимодействие 1*H*-2,3-дигидроимидазо- и 1*H*-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а] бензимидазолов с различно замещенными амидами хлоруксусной кислоты. Так как исходные трициклы существуют в виде 1*H*-таутомеров [В.А. Анисимова, 1995] реакция алкилирования хлорацетамидами в нейтральной среде (нагревание в ацетонитриле или ацетоне) протекает по пиридиновому атому азота с образованием гидрохлоридов амидов I-XX. Конечные продукты образуются с высокими выходами.



NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>=NEt<sub>2</sub>, (I, II); N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)O, (III, IV); NHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>F-2, (V, VI); NHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>F-4, (VII, VIII); NHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CF<sub>3</sub>-3 (IX); N(Me)Ph (X, XI); NHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(Me)<sub>2</sub>-2,6 (XII, XIII); NHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OEt-4 (XIV); NHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(CHMe<sub>2</sub>)-4 (XV); NHC<sub>4</sub>HS(CO<sub>2</sub>Et)-2-Ph-3 (XVI), NH<sub>2</sub> (XVII, XVIII); N(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub> (XIX, XX).

Синтез используемых хлорацетамидов проводят по стандартной методике.

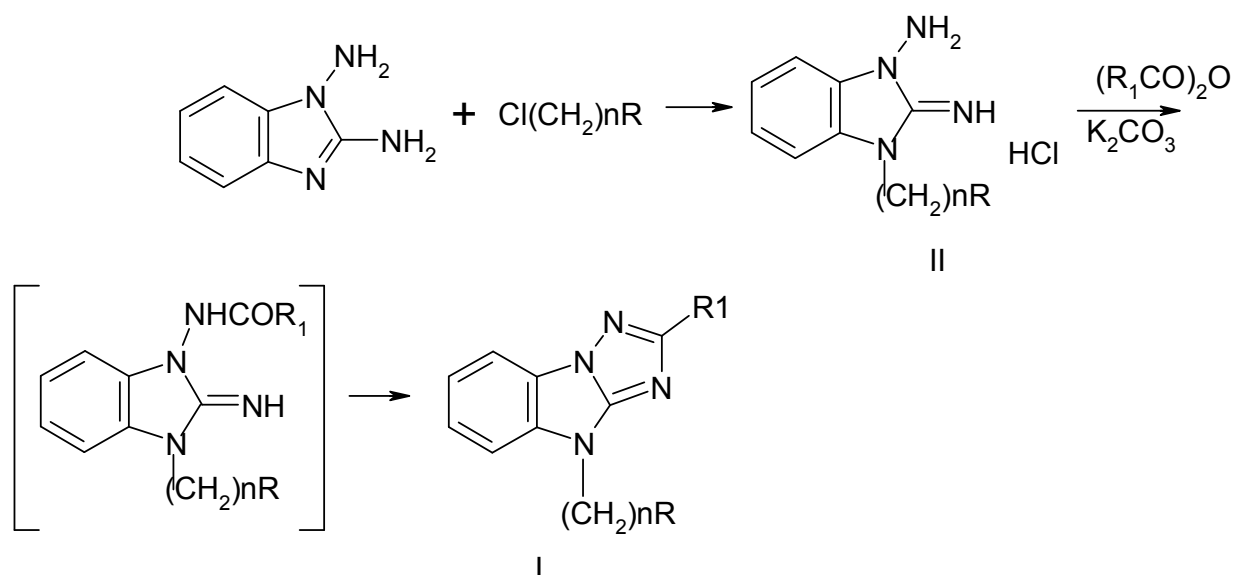
**Общая методика синтеза амидов 2,3-дигидроимидазо- и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолил-N-уксусных**



**кислот (I-XX).** Раствор 5 ммоль 1H-2,3-дигидроимидазо- или 1H-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-*a*]бензимидазола и 6 ммоль соответствующего хлорацетамида в 30 мл ацетонитрила кипятят до полного протекания реакции (5-12 ч, исчезновение пятна исходного соединения на ТСХ). Выпавший по охлаждению осадок отфильтровывают, обрабатывают ацетоном и перекристаллизовывают из подходящего растворителя. Если из реакционной массы осадок не выпадает, то раствор упаривают досуха на роторном испарителе. Остаток сушат в сушильном шкафу в начале при 85 °С, затем при 115 °С, после чего перекристаллизовывают. Реакцию также можно проводить в ацетоне (50-60 мл), но время реакции при этом значительно возрастает.

### **3.11. Синтез 2-алкил-4-диалкиламиноалкил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]бензимидазолов**

По аналогии с 4-алкил-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]бензимидазолами [1]4-диалкиламиноалкилпроизводные этого ряда синтезировали из четвертичных солей 1,2-диаминобензаимидазолия II, полученных при кипячении 1,2-диаминобензаимидазола с соответствующими диалкиламиноалкилхлоридами в спирте [2]. Эта реакция осложняется незначительным образованием диспиро-N,N<sup>1</sup>-пиперазиний хлоридов. Соли II циклизовали с помощью ангидридов карбоновых кислот в присутствии поташа.



$n=2, 3$   $R=N(Et)_2$ , пиперидин-1-ил, морфолин-4-ил, пирролидин-1-ил  
 $R_1=H, Me, Et, Ph$

Роль поташа, вероятно, заключается в превращении промежуточно образующейся ацилиевых солей в имины, которые вследствие высокой нуклеофильности иминного атома азота легко циклизуются. Для получения триазолобензимидазолов незамещенных по положению 2 ( $R_1=H$ ) в качестве конденсирующего агента успешно используют формамид. Соединения I представляют собой масла или весьма легкоплавкие кристаллы нерастворимые в воде. Чтобы повысить их растворимость, получают соответствующие гидрохлориды.

**Хлорид 1,2-диамино-3-[2-(морфолин-4-ил)этил]-бензимидазолия (IIa).** Раствор 4,44 г (0,03 моль) 1,2-диаминобензимидазола и 5,23 г (0,035 моль) 2-морфолиноэтилхлорида в 50 мл спирта кипятят 1,5 ч. Выделяющийся осадок (0,6 г), представляющий собой побочный продукт реакции (диспиро- $N,N^1$ -диморфолинпиперазиний дихлорид), отфильтровывают из горячего раствора. Фильтрат упаривают до половины объема выделяющийся по охлаждению осадок отфильтровывают. Выход 8,1 г (90%). Бесцветные кристаллы с т.пл. 257-259 °С (из спирта). ИК-спектр,  $cm^{-1}$  (вазелиновое масло): 1640, 1690, 3150, 3400 ( $NH_2$ ).

**Дигидрохлорид 4-[2-(морфолин-4-ил)этил]-2-этил-1,2,4-триазоло[1,5-а]бензимидазола (Ia).** Раствор 2,97 г (0,01 моль) полученно-

го соединения и 0,7 г (0,005 моль) 50 поташа в 20 мл пропионового ангидрида кипятят 5 ч. По охлаждении осадок неорганических солей отфильтровывают и избыток пропионового ангидрида отгоняют под уменьшенным давлением. Остаток обрабатывают 3 мл концентрированного  $\text{NH}_4\text{OH}$ , после испарения аммиака растворяют в 15 мл хлороформа и пропускают через колонку с  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (элюент-хлороформ), отбирая фракцию с  $R_f$  0,65. Хлороформ отгоняют, маслянистый остаток растворяют в 40 мл ацетона и подкисляют концентрированной  $\text{HCl}$  до pH 1. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают ацетоном. Выход соединения Ia 3,4 г (92%). Бесцветные кристаллы с т.пл. 233-236°C (из спирта), растворимые в воде. ИК-спектр: 1680 ( $\text{C}=\text{N}$ ), 2200-2600  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{N}^+\text{H}$ ).

**Хлорид 1,2-диамино-3-[2-(пиперидин-1-ил) этил]- бензимидазолия (IIб).** Получен аналогично четвертичной соли IIа с выходом 62 %. Бесцветные кристаллы ст.пл. 208-209 °C (из спирта).

**Дигидрохлорид 4-[2-(пиперидин-1-ил)этил]-2-метил-1,2,4-триазоло(1,5)-бензимидазола (Iб).** Получен из четвертичной соли IIб и уксусного ангидрида аналогично соединению Ia с выходом 93 %. Бесцветные кристаллы с т.пл. 230-233°C (из пропанола-2), растворимые в воде.

Исследования, описанные в данной главе, частично выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-25-00139).

# ГЛАВА 4

## НАПРАВЛЕННЫЙ ПОИСК СОЕДИНЕНИЙ, СНИЖАЮЩИХ СОДЕРЖАНИЕ САХАРА В КРОВИ

*П. М. Васильев, А. А. Спасов, Г. П. Дудченко,  
К. В. Ленская, В. А. Анисимова*

---

В настоящее время применение методов *in silico* является неотъемлемой частью поиска новых фармакологически активных молекул [Drug Design, 2010; Recent Advances in QSAR, 2010]. В связи с большой распространенностью сахарного диабета, весьма востребованным является поиск новых гипогликемических веществ [Дедов И.И., 2008]. Среди производных бензимидазола выявлено значительное число соединений с высокой гипогликемической активностью [Спасов А.А., 2015]. Таким образом, представляется актуальным направленный поиск компьютерными и экспериментальными методами новых производных бензимидазола, проявляющих гипогликемические свойства, с последующим углубленным изучением соединений, наиболее перспективных по данным предварительного скрининга.

### **4.1. Влияние производных бензимидазола на уровень глюкозы в крови крыс**

Скрининг веществ, проявляющих антидиабетогенное действие, проводят с использованием различных экспериментальных методов [Спасов А.А., 2012; Макаров В.Г., 2012; Parmar N.S., 2006]. Первая группа методов включает тестирование на интактных животных по уровню снижения сахара в крови. В данном методе хорошо выявля-

ются многие антидиабетогенные средства по снижению глюкозы в крови вследствие стимуляции выработки инсулина поджелудочной железой, так и вследствие повышения чувствительности тканей к инсулину и нарушения всасывания углеводов в кишечнике.

Вторая группа методов представляет собой тестирование веществ на животных с экспериментальными моделями сахарного диабета 1 или 2 типа. Однако этот процесс является дорогостоящим и длительным, поэтому целесообразно на первом этапе скрининга тестировать вещества на интактных животных, а наиболее активные соединения проверять в условиях экспериментального сахарного диабета.

При скрининге новых химических соединений определение гипогликемической активности проводили на половозрелых нелинейных крысах самцах (на одно вещество по 6 животных) массой 150-200 г, содержащихся в условиях вивария (естественный световой режим, полноценный рацион (ГОСТ Р 50258-92) и свободный питьевой режим) [Западнюк И.П., 1983].

Изучение гипогликемического действия веществ проводилось на интактных животных, которые в течение 18 часов находились на свободном питьевом режиме при полной пищевой депривации. Исследуемые вещества вводились однократно, внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг. Определение концентрации глюкозы определялось в пробах, взятых из вены хвоста перед введением изучаемых соединений и через 2, 4, 6 часов после введения, ортотолуидиновым методом [Северин С.Е., 1989] с помощью набора «Глюкоза ФКД» (Россия). Измерение оптической плотности проводилось на спектрофотометре PD-303 UVAREL (Япония) при длине волны 500 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. Показателем гипогликемической активности служила величина  $C$  (концентрация глюкозы в крови, ммоль/л). Кроме этого гипогликемическую активность рассчитывали по методу [Larsen S.D., 2001], где показателем служила величина  $Ind_R$  – отношение концентрации глюкозы в плазме крови крыс опытной и контрольной группы.

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

Острая токсичность активных соединений изучалась на 300 белых неинбредных мышах, прошедших карантин, обоего пола массой 15–30 г, путем определения средней летальной дозы (LD<sub>50</sub>) (в течение 14 дней) [Прозоровский В.Б., 1962]. Мышам вводили субстанцию изучаемых соединений внутрибрюшинно.

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

Материалы по влиянию производных бензимидазола на уровень глюкозы в плазме крови интактных животных приведены в табл. 4.1. На основании проведенных исследований установлено, что соединение РУ-254 оказывает выраженную гипогликемическую активность, имеет низкую острую токсичность и высокий условный гипогликемический индекс. Результаты исследования веществ, проявляющих высокую гипогликемическую активность, приведены в табл. 4.2.

**Влияние производных бензимидазола  
на уровень глюкозы в плазме крови  
интактных нелинейных крыс  
через 4 часа после введения изучаемых веществ**

№ п/п	Шифр вещества	Уровень глюкозы (баллы)
I. Производные 2-амино-бензимидазола		
1	АЖИ-1	0,68
2	АЖИ-2	0,7
3	АЖИ-3	0,81
4	АЖИ-4	0,94
5	АЖИ-5	1,19
6	АЖИ-6	1,15
7	АЖИ-7	1,36
8	АЖИ-8	0,99
9	АЖИ-9	0,77
10	АЖИ-10	0,91
11	АЖИ-11	0,91
12	АЖИ-12	0,83
13	АЖИ-13	0,81
14	АЖИ-15	0,9
II. Производные 2-имино-бензимидазола		
15	АЦИ-1	0,73,
16	АЦИ-2	1,06
17	АЦИ-3	1,03
18	АЦИ-4	0,65
19	АЦИ-5	1,08
20	АЦИ-6	0,95,
21	АЦИ-7	1,06,
22	АЦИ-8	Гибель, 100%
23	АЦИ-9	0,8
24	АЦИ-10	0,63
25	АЦИ-11	0,95,
26	АЦИ-12	0,74
27	АЦИ-14	0,75
28	АЦИ-15	0,70
29	АЦИ-16	0,97
30	АЦИ-17	1,01
31	АЦИ-18	0,71

№ п/п	Шифр вещества	Уровень глюкозы (баллы)
III. Производные N <sup>9</sup> -2,3-дигидро-имидазо[1,2-a]бензимидазола		
32	РУ-0252	0,72
33	РУ-0,253	0,91
34	РУ-0254	0,65
35	РУ-0255	0,77
36	РУ-0256	0,97
37	РУ-0283	0,91
38	РУ-0321	0,83
39	РУ-0322	0,78
40	РУ-0323	1,28
41	РУ-0324	1,1
42	РУ-1180	0,91
43	РУ-1213	0,92
44	РУ-1217	0,76
45	РУ-1219	0,9,
46	РУ-1293	0,88,
47	РУ-1294	1,0
48	РУ-1295	0,8
49	РУ-1297	0,83
50	РУ-1299	1,13
51	РУ-1301	1,13,
52	РУ-1303	0,96
53	РУ-1309	гибель, 100%
54	РУ-1311	1,1,
55	РУ-1312	1,27,
56	РУ-1316	0,7
57	РУ-1317	0,8
58	РУ-0623	0,8
59	РУ-0624	0,96
60	РУ-0634	0,86
61	РУ-0659	0,87
62	РУ-0660	1,0

Продолжение таблицы 4.1

№ п/п	Шифр вещества	Уровень глюкозы (баллы)
III. Производные N <sup>9</sup> -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола		
64	РУ-0661	0,96
65	РУ-0662	0,79
66	РУ-0663	0,67
67	РУ-0664	0,9
68	РУ-0665	0,85
69	РУ-0666	0,95
70	РУ-0667	0,88
71	РУ-0668	0,8
72	РУ-0770	1,06
73	РУ-0769	0,68
74	РУ-0856	0,86
75	РУ-0855	0,68
76	РУ-0856	0,86
77	РУ-0857	1,06
78	РУ-0588	1,07
79	РУ-0859	1,03
80	РУ-0860	0,75
81	РУ-0861	гибель
82	РУ-0862	1,34
83	РУ-0863	0,81
84	РУ-0861	1,05
85	РУ-0862	1,34
86	РУ-0863	0,81
87	РУ-0864	1,05
88	РУ-0865	1,02
89	РУ-0873	0,79
90	РУ-0874	1,03
91	РУ-0875	1,23
92	РУ-0876	1,04
93	РУ-0887	0,74
94	РУ-0891	1,03
95	РУ-0895	1,03

№ п/п	Шифр вещества	Уровень глюкозы (баллы)
IV. Производные N <sup>9</sup> -имидазо[1,2-а]бензимидазола		
96	РУ-0013	0,84
97	РУ-0017	0,78
98	РУ-0063	0,83
99	РУ-0189	1,06
100	РУ-0217	0,93
101	РУ-0218	1,00
102	РУ-0246	1,21
103	РУ-0284	0,77
104	РУ-0295	0,94
105	РУ-0451	0,89
106	РУ-0457	1,16
107	РУ-0458	0,9
108	РУ-0467	0,82
109	РУ-0502	0,86
110	РУ-509	0,96
111	РУ-0510	0,92
112	РУ-0511	0,91
113	РУ-0512	0,92
114	РУ-0513	0,94
115	РУ-0514	0,89
116	РУ-0515	0,95
117	РУ-0516	0,76
118	РУ-0517	0,88
119	РУ-0520	0,7
120	РУ-0523	0,91
121	РУ-0524	1,23
122	РУ-0529	0,77
123	РУ-0615	1,1
124	РУ-0620	1,04
125	РУ-0690	0,94
126	РУ-0691	1,03
127	РУ-0692	0,98



Продолжение таблицы 4.1

№ п/п	Шифр вещества	Уровень глюкозы (баллы)
IV. Производные N <sup>9</sup> -имидазо[1,2-а]бензимидазола		
128	РУ-0693	0,91
129	РУ-0694	0,98
130	РУ-0714	0,98
131	РУ-0866	1,04
V. Производные 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола		
132	РФ-101	1.01
133	РФ-102	0,95
134	РФ-103	0,92
135	РФ-104	0.87
136	РФ-105	0,99
137	РУ-0550	0,89
138	РУ-0551	0,89
139	РУ-0552	0,8
140	РУ-0553	0,78
141	РУ-0554	0,83
142	РУ-0555	0,87
143	РУ-0556	0,83
144	РУ-669	0,71
145	РУ-0670	0,86
146	РУ-0671	0,79
147	РУ-0672	0,86
148	РУ-0673	0,87
149	РУ-0674	1,17
150	РУ-0835	0,94
151	РУ-0837	0,93
152	РУ-0838	0,93
153	РУ-0839	1,05
154	РУ-0840	0,79
155	РУ-0841	0,85
156	РУ-0846	0,98
157	РУ-0847	0,93
158	РУ-0848	0,86

№ п/п	Шифр вещества	Уровень глюкозы (баллы)
V. Производные 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола		
159	РУ-0849	гибель
160	РУ-0850	1,00
161	РУ-0851	0,95
162	РУ-0852	0,96
163	РУ-0853	0,91
164	РУ -854	0,89
165	РУ-0870	1,05
166	РУ-0871	0,74
167	РУ-0873	0,79
168	РУ-0890	0,94
169	РУ-0896	0,89
170	РУ-0897	1,07
171	РУ-0898	1,04
172	РУ-1144	0,7
173	РУ-1214	0,86
174	РУ-1216	0,92
175	РУ-1218	0,98
176	РУ-1220	0,72
177	РУ-1222	0,81
178	РУ-1224	0,78
179	РУ-1298	0,92
180	РУ-1300	0,99
181	РУ-1302	0,96
182	РУ-1304	1,0
183	РУ-1308	0,93
184	РУ-1310	гибель, 100%
185	РУ-1314	0,83
186	РУ-1315	0,83
187	РУ-1318	0,8
VI. Производные N <sup>1</sup> -имидазо[1,2-а]бензимидазола		
188	РУ-270	1,13
189	РУ-271	1,1

Окончание таблицы 4.1

№ п/п	Шифр вещества	Уровень глюкозы (баллы)
VI. Производные N <sup>1</sup> -имидазо[1,2-а]бензимидазола		
190	РУ-0302	1,1
191	РУ-0304	0,88
192	РУ-0305	1,21
193	РУ-306	1,26
194	РУ-0307	1,05
195	РУ-0308	1,16
196	РУ-0309	0,93
197	РУ-0310	1,07
198	РУ-0312	1,12
200	РУ-0314	1,12
201	РУ-0353	0,89
202	РУ-0354	0,81
203	РУ-355	1,19
VII. Производные N <sup>1</sup> -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола		
204	РУ-0317	0,97
205	РУ-0320	0,99
206	РУ-503	0,93
207	РУ-504	1,13
208	РУ-505	1,03
209	РУ-506	0,94
210	РУ-0507	0,87
211	РУ-508	0,98
212	РУ-516	0,97
213	РУ-0899	0,9
214	РУ-1163	1,06
215	РУ-1180	0,96
216	РУ-1209	0,88

№ п/п	Шифр вещества	Уровень глюкозы (баллы)
VII. Производные N <sup>1</sup> -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола		
217	РУС-0038	0,95
218	РУС-0065	1,01
219	РУС-0065	1,01
220	РУС-0066	1,00
221	РУС-0067	0,9
222	РУС-0068	1,00
223	РУС-0070	0,99
224	РУС-0071	0,95
225	РУС-0072	1,00
226	РУС-0073	0,96
	РУС-0074	0,89
227	РУС-0075	0,83
228	РУС-0076	0,77
229	РУС-0078	0,88
230	РУС-0079	0,82
231	РУС-0080	0,83
232	РУС-0081	0,89
233	РУС-0082	0,84
234	РУС-0083	0,82
235	РУС-0090	0,82
236	РУС-0092	0,82
237	РУС-0094	0,77
238	РУС-0095	0,85
239	РУС-0096	0,97
240	РУС-0097	0,72
242	РУС-0098	0,94
	метформин	0,89

**Величина гипогликемической активности на интактных крысах,  
острая токсичность и условный гипогликемический индекс  
производных бензимидазола**

Шифр вещества	Гипогликемическое действие через 4 ч после введения ( $Ind_R$ , усл. ед.)	ЛД <sub>50</sub> (мыши, в/бр., мг/кг)	Условный гипогликемический индекс (ЛД <sub>50</sub> / $Ind_R$ )
РУ-254	0,651	210,3	323,5
АЖ-2	0,707	209,0	298,6
РУ-1316	0,706	153,2	218,8
РУ-669	0,718	155,0	218,3
РУ-663	0,673	119,0	177,6
АЦИ-4	0,652	107,4	165,2
РУ-1144	0,705	109,8	156,8
РУ-1220	0,729	105,5	146,5
АЖ-1	0,684	107,5	158

**4.2. Планирование *in silico* скрининга  
и экспериментальное изучение гипогликемических  
свойств производных бензимидазола**

Была проведен двухэтапный поиск новых производных бензимидазола с гипогликемической активностью: *in silico* с использованием двух компьютерных систем, с последующим экспериментальным тестированием перспективных по прогнозу соединений.

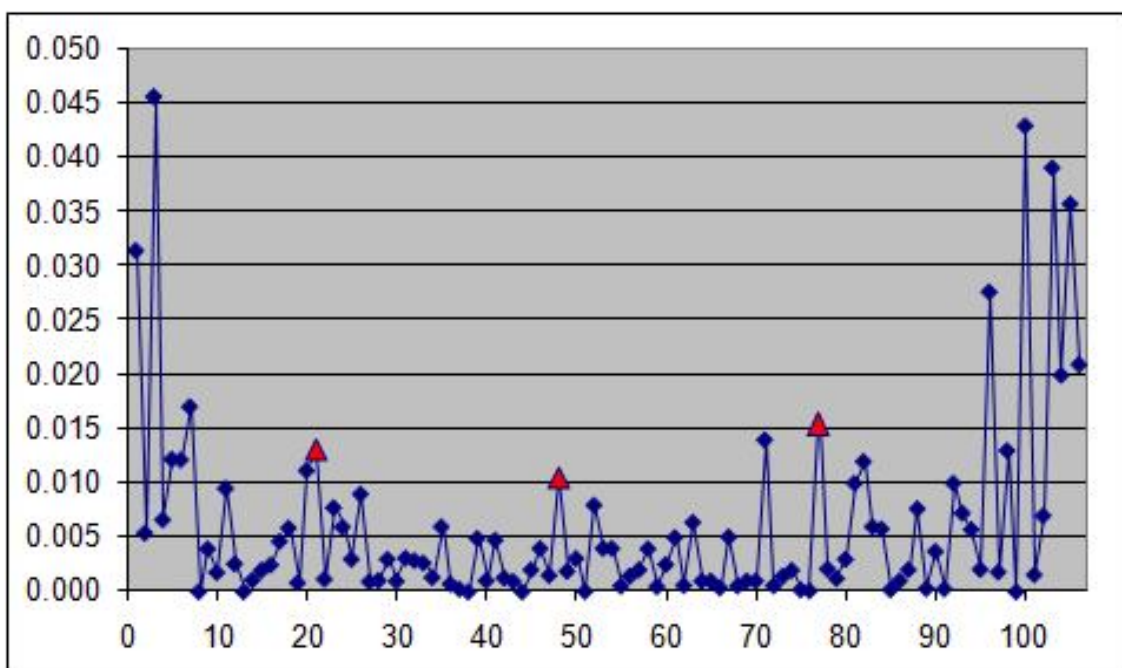
Гипогликемическое действие новых производных бензимидазола изучали на крысах при внутрибрюшинном введении в дозе 50 мг/кг, забор крови осуществляли через 4 часа. Показателем гипогликемической активности служила величина  $Ind_R$  – отношение концентрации глюкозы в плазме крови опытной и контрольной групп животных [Larsen S.D., 2001]. Подробное описание методики см. выше в разделе 4.1.

Компьютерный прогноз гипогликемической активности 1036 новых конденсированных и неконденсированных производных бензими-

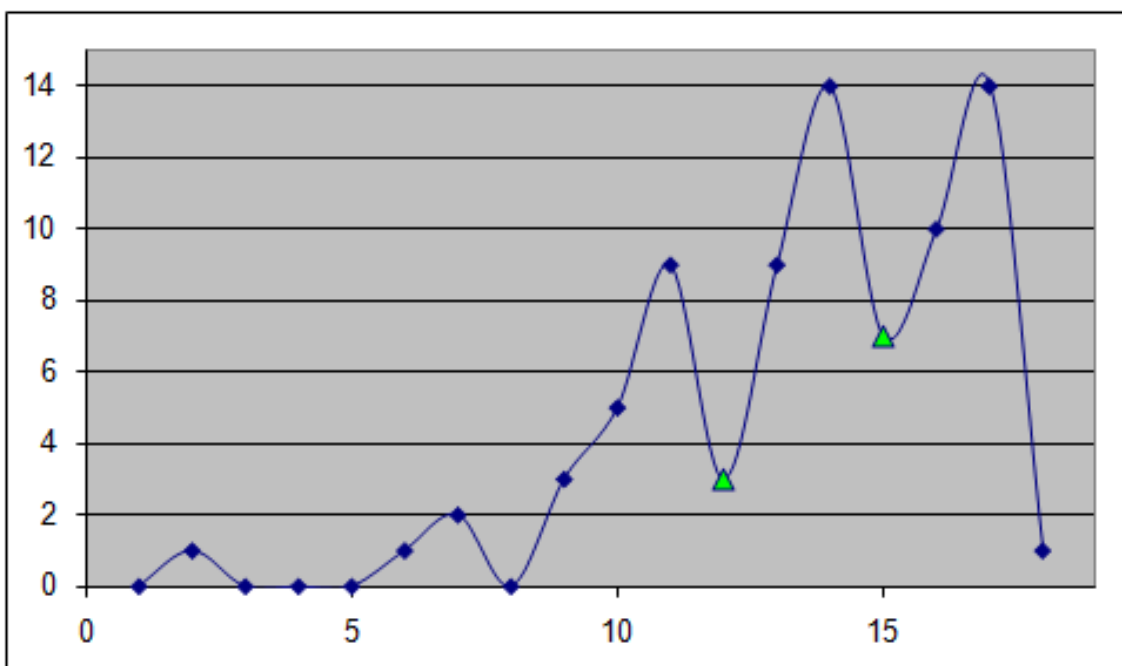
дазола был выполнен с помощью системы PASS [Свидетельство о государственной регистрации, 2006] и информационной технологии (ИТ) «Микрокосм» [Свидетельство о государственной регистрации, 2011]. Проанализированы структуры следующих химических классов: 2-амино-бензимидазолы (2-АмБИ);  $N^1, N^9$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы ( $N^1, N^9$ -ДгИмБИ);  $N^1$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы ( $N^1$ -ДгИмБИ);  $N^1$ -имидазо[1,2-а]бензимидазолы ( $N^1$ -ИмБИ);  $N^9$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолы ( $N^9$ -ДгИмБИ);  $N^9$ -имидазо[1,2-а]бензимидазолы; ( $N^9$ -ИмБИ); 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолы (ПрмБИ); триазино[2,3-а]бензимидазолы (ТрзиБИ); триазоло[1,5-а]бензимидазолы (ТрзоБИ).

Алгоритм прогноза в системе PASS подробно описан в работе [Филимонов Д. А., 2006]. Соединение считается активным, если для него вероятность наличия активности  $P_a$  больше вероятности ее отсутствия  $P_i$ . Прогноз в PASS осуществлялся по базе данных PASS10.SAR объемом 313344 биологически активных соединений, в том числе 413 гипогликемических.

Детальное описание математического аппарата ИТ «Микрокосм» приведено в монографии [Vassiliev P.M., 2014]. Прогноз в ИТ «Микрокосм» проведен с использованием двух обучающих выборок: первая включала 126 известных противодиабетических препаратов и 115 достоверно неактивных соединений; вторая – 109 экспериментально изученных новых производных бензимидазола (80 активных веществ и 29 неактивных). Для новых соединений граничное значение  $Ind_R < 0,82$ , разделяющее активные и малоактивные вещества, было получено в результате кластерного анализа методами расстояний и гистограмм [Мандель И.Д., 1988] экспериментальных данных по гипогликемической активности (рис. 4.1). В ИТ «Микрокосм» в качестве расчетных оценок уровня активности были взяты значения функций принадлежности к классу активных соединений  $F_{Cons}$ ,  $F_{Norm}$ ,  $F_{Risk}$ , рассчитанные с помощью консервативной, нормальной и рискованной стратегий, соответственно.



**A**



**B**

**Рис. 4.1.** Кластеризация гипогликемической активности производных бензимидазола: **A:** ось X – номер соединения в упорядоченном по величине  $Ind_R$  ряду; ось Y – разность активностей двух соседних соединений в этом ряду; **B:** ось X – номер интервала активности по величине  $Ind_R$ ; ось Y – число соединений в данном интервале

Для каждого химического класса производных бензимидазола были подсчитаны байесовские частоты встречаемости активных  $P_h$  и неактивных  $P_{nh}$  соединений (в эксперименте или по прогнозу). С помощью биномиального критерия [Глотов Н. В., 1982] для всех парных значений  $P_h$  и  $P_{nh}$  рассчитывали вероятность их равенства  $Pr$ . Оценкой достоверности различий между  $P_h$  и  $P_{nh}$  служил коэффициент информативности  $K_{Pr}$ , принимающий следующие целочисленные значения:

0 –  $Pr \geq 0,2$  – различий нет;

1 –  $0,1 \leq Pr < 0,2$  – очень слабые недостоверные различия;

2 –  $0,05 \leq Pr < 0,1$  – слабые недостоверные различия (тенденция);

3 –  $0,01 \leq Pr < 0,05$  – выраженные достоверные различия;

4 –  $0,001 \leq Pr < 0,01$  – сильные достоверные различия;

5 –  $Pr < 0,001$  – очень сильные достоверные различия.

Химический класс производных бензимидазола считался перспективным источником гипогликемических веществ, если  $P_h > P_{nh}$  – в этом случае величина  $K_{Pr}$  была положительной; если же  $P_h \leq P_{nh}$ , то класс считался неперспективным и величине  $K_{Pr}$  присваивалось отрицательное значение.

Интегральной оценкой перспективности класса в целом служила средняя величина четырех показателей  $K_{Pr}$ : одного, определенного на основании экспериментальных данных и трех, вычисленных по результатам прогноза в системе PASS и в ИТ «Микрокосм».

Итоговые результаты компьютерного планирования скрининга приведены в табл. 4.3. В соответствии со средним значением коэффициента информативности  $K_{Pr}$ , перспективность классов производных бензимидазола как источников соединений с гипогликемической активностью убывает в следующем ряду:  $N^9$ -ДгИмБИ>ПрмБИ>2-АмБИ> $N^1$ -ИмБИ> $N^1$ ,  $N^9$ -ДгИмБИ> $N^1$ -ДгИмБИ>ТрзиБИ>ТрзоБИ> $N^9$ -ИмБИ.

Две величины  $K_{Pr}$  статистически высоко достоверны: для классов производных  $N^9$ -ДгИмБИ и ПрмБИ. Класс 2-АмБИ имеет промежуточное, между достоверным и недостоверным, значение  $K_{Pr}$ .

Таким образом, наиболее перспективными, с точки зрения наличия в них гипогликемических веществ, являются классы производных  $N^9$ -ДгИмБИ и ПрмБИ.

**Коэффициенты информативности классов  
производных бензимидазола как источников веществ  
с гипогликемической активностью**

Химический класс	Прогнозные оценки			Оценка по данным эксперимента <sup>3</sup>	Среднее
	PASS	ИТ «Микрокосм»			
		ИГП <sup>1</sup>	ПБИ <sup>2</sup>		
2-АмБИ	5	5	5	-5	2.50
N <sup>1</sup> ,N <sup>9</sup> -ДгИмБИ	-1	3	3	—	1.67
N <sup>1</sup> -ДгИмБИ	-3	5	3	0	1.25
N <sup>1</sup> -ИмБИ	5	-2	5	0	2.00
N <sup>9</sup> -ДгИмБИ	5	5	5	3	<b>4.50</b>
N <sup>9</sup> -ИмБИ	5	-5	5	-4	0.25
ПрмБИ	5	5	5	2	<b>4.25</b>
ТрзиБИ	-2	3	2	—	1.00
ТрзоБИ	-3	0	5	—	0.67

<sup>1</sup> По обучающей выборке известных гипогликемических препаратов;

<sup>2</sup> по обучающей выборке испытанных производных бензимидазола;

<sup>3</sup> по результатам экспериментального изучения 109 новых производных бензимидазола.

В соответствии с полученными результатами планирования скрининга *in silico*, для последующего экспериментального изучения были отобраны новые неизученные вещества из двух перспективных классов: ПрмБИ – РФ-0101, РФ-0102, РФ-0104, РФ-0105, РУ-1300; и N<sup>9</sup>-ДгИмБИ – РУ-0254, РУ-1293, РУ-1297, РУ-1301, РУ-1303. Все эти соединения имеют консенсус прогнозных оценок по двум системам прогноза – как минимум, по одной положительной оценке «+», как в системе PASS, так и в ИТ «Микрокосм» (табл. 4.4.). Из 10 экспериментально изученных веществ 9 показали гипогликемическую активность. Таким образом, по результатам выполненного исследования, точность планирования *in silico*

скрининга новых гипогликемических веществ среди производных бензимидазола составила 60 %.

Таблица 4.4

**Гипогликемическая активность  
экспериментально испытанных соединений**

Шифр	Экспериментальное значение $Ind_R$	Прогнозные оценки	
		PASS <sup>1</sup>	ИТ «Микрокосм» <sup>2</sup>
РФ-0101	1,0	+	+
РФ-0102	0,95	++	+
РФ-0104	0,92	+	++
РФ-0105	0,99	++	++
РУ-1300	0,90	++	+++
РУ-0254	0,65	++	++
РУ-1293	0,95	+++	+++
РУ-1297	0,96	+	++
РУ-1301	0,97	++	++
РУ-1303	0,96	++	++

<sup>1</sup>«+++» –  $P_a/P_i \geq 100$ ; «++» –  $10 \leq P_a/P_i < 100$ ; «+» –  $1 < P_a/P_i < 10$ .

<sup>2</sup>число положительных прогнозных оценок по консервативной, нормальной и рисковому стратегиям прогноза.

Таким образом, на основе анализа *in silico* изучаемых классов конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола можно утверждать, что для поиска соединений с гипогликемической активностью наиболее перспективными являются производные N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазол (N<sup>9</sup>-ДгИмБИ) и 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола (ПрмБИ). По величине среднего коэффициента информативности самым перспективным является класс N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолов. Экспериментально изучены 10 перспективных по прогнозу соединений, найдено 9 активных веществ. По данным эксперименталь-



ного тестирования, точность планирования *in silico* скрининга производных бензимидазола с гипогликемической активностью оказалась достаточно высокой.

### 4.3. Подструктурный анализ гипогликемической активности производных бензимидазола

Одной из задач поиска фармакологически активных веществ является выявление среди соединений различной химической структуры базовых структур, ответственных за наличие той или иной активности, в том числе, ее высокого уровня [Drug Design, 2010]. Для решения данной задачи успешно используются методы теории распознавания образов [Горелик А. Л., 2004], в частности, подструктурный анализ [Chemoinformatics, 2003]. В рамках данного исследования подструктурный анализ позволяет определить, какая базовая химическая структура может обеспечить проявление среди производных бензимидазола высокой гипогликемической активности.

Была поставлена цель исследовать методом подструктурного анализа, зависимость между высокой гипогликемической активностью и типами базовых химических структур производных бензимидазола.

По описанной выше методике (см. раздел 4.1) было изучено 109 веществ, производных семи химических классов: 2-АмБИ; N<sup>9</sup>-ИмБИ; N<sup>1</sup>-ИмБИ; N<sup>9</sup>-ДгИмБИ; N<sup>1</sup>-ДгИмБИ, N<sup>1</sup>, N<sup>9</sup>-ДгИмБИ и ПрмБИ. Показателем гипогликемической активности также служила величина  $Ind_R$ .

Из испытанных веществ к классу высокоактивных относятся 22 соединения, имеющие  $Ind_R < 0,82$  (описание процедуры определения границ класса высокоактивных соединений методом кластерного анализа приведено выше в разделе 4.2). В качестве признаков, ответственных за проявление высокой гипогликемической активности, рассматривали базовые структуры производных бензимидазола. Оценка статистической значимости признаков производилась по сле-

дующей схеме: подсчитывали общее число признака  $i$  в классе активности  $h$  (высокоактивные) и  $nh$  (не высокоактивные)

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

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

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

$M$  – число видов признаков.

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

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

Вычисляли байесовскую вероятность встречаемости признака  $i$  в классе  $h$  и  $nh$  [Голендер В.Е., 1978]

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

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

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

По значению биномиального критерия определяли значимость влияния признака  $i$  на наличие или отсутствие высокой активности

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

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

По величине  $Pr$  определяли коэффициент информативности  $K_{Pr}$  (см. раздел 4.2). В случае отрицательного влияния типа базовой структуры на активность коэффициенту информативности  $K_{Pr}$  присваивался знак «-», а в случае положительного влияния – знак «+». В анализируемой выборке присутствовало только одно производное  $N^1, N^9$ -ДгИмБИ, поэтому этот класс в подструктурный анализ не был включен из-за малого объема данных. Результаты подструктурного анализа приведены в табл. 4.5. и на рис. 4.2.

Анализ полученных данных показывает, что наиболее перспективным, с точки зрения наличия веществ с высокой гипогликемической активностью, является класс  $N^9$ -ДгИмБИ, имеющий коэффициент информативности  $K_{Pr} = +3$  ( $Pr = 0,038$ ). Производные ПрмБИ также можно рассматривать, как возможный источник соединений с высокой гипогликемической активностью, но влияние базовой структуры в этом случае недостаточно достоверно, коэффициент информативности  $K_{Pr} = +2$  ( $Pr = 0,08$ ). Тем не менее, при наличии в структуре ПрмБИ заместителей, существенно влияющих на уровень гипогликемической активности, в этом классе возможно появление веществ с высоким уровнем гипогликемического действия. В соответствии с коэффициентом информативности, безусловно, не перспективными для поиска высокоактивных гипогликемических веществ являются следующие классы: 2-АмБИ – коэффициент информативности  $K_{Pr} = -5$  ( $Pr = 0,0008$ );  $N^9$ -ИмБИ – коэффициент информативности  $K_{Pr} = -4$  ( $Pr = 0,0095$ ).

**Подструктурный анализ влияния типа базовой структуры  
на высокую гипогликемическую активность  
производных бензимидазола**

Базовая структура	$N^1$	$P_h^2$	$P_{nh}^3$	$Z^4$	$Pr^5$	$K_{Pr}^6$
2-АмБИ	11	0,1125	0,8875	3,15	0,0008	-5
N <sup>9</sup> -ИмБИ	22	0,3056	0,6944	2,35	0,0095	-4
N <sup>1</sup> -ИмБИ	3	0,6068	0,3932	0,58	0,2824	0
N <sup>9</sup> -ДгИмБИ	35	0,5985	0,4015	1,77	0,0380	3
N <sup>1</sup> -ДгИмБИ	8	0,5558	0,4442	0,41	0,3414	0
ПрмБИ	30	0,5848	0,4152	1,37	0,0851	2

<sup>1</sup>Число соединений;

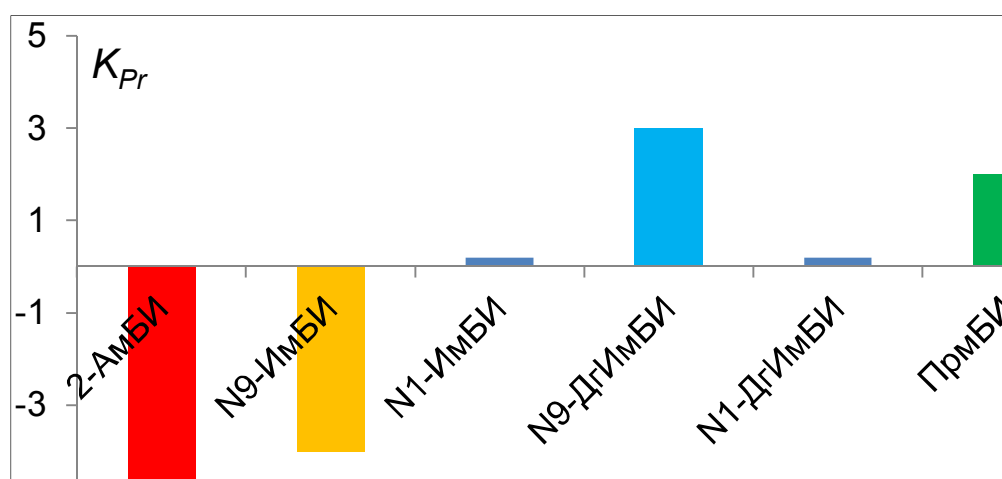
<sup>2</sup>байесовская вероятность встречаемости в классе высокоактивных соединений;

<sup>3</sup>байесовская вероятность встречаемости в классе не высокоактивных соединений;

<sup>4</sup>биномиальный критерий (имеет нормальное распределение);

<sup>5</sup>достоверность различий  $P_h$  и  $P_{nh}$ ;

<sup>6</sup>коэффициент информативности различий  $P_h$  и  $P_{nh}$ .



**Рис. 4.2. Коэффициенты информативности влияния типа базовой структуры на высокую гипогликемическую активность производных бензимидазола**

В отношении производных N<sup>1</sup>-ИмБИ видно, что влияние базовой структуры на уровень гипогликемической активности отсутствует. Однако каких-то определенных выводов сделать нельзя, так как в анализируемой выборке присутствует лишь три соединения данного класса, что является статистически недостаточным. Что касается N<sup>1</sup>-ДгИмБИ, то для этого класса влияние базовой структуры на уровень гипогликемической активности также отсутствует. Тем не менее, поскольку отрицательного влияния здесь не наблюдается, то при оптимальном подборе заместителей в данном химическом классе, возможно нахождение веществ с высокой гипогликемической активностью. Однако вероятность выявления таких соединений в данном классе следует считать более низкой, чем среди производных ПрмБИ.

Таким образом, подструктурный анализ показал, что наиболее перспективным химическим классом производных бензимидазола в плане возможного наличия соединений с высокой гипогликемической активностью является класс N<sup>9</sup>-замещенных 2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола. Как условно перспективным следует рассматривать класс производных 2,3,4,10-тетрагидро-пиримидо[1,2-а]бензимидазола. Полученные данные уточняют результаты, описанные в разделе 4.2.

#### **4.4. Анализ перспективности химических классов производных бензимидазола методом медианных и супремальных оценок**

Дополнительно к приведенным в разделах 4.2 и 4.3 расчетам было выполнено исследование методами медианных и супремальных оценок влияния вида базовой химической структуры производных бензимидазола на уровень гипогликемической активности. Анализировали данные по 105 экспериментально изученным производным бензимидазола пяти химических классов, включающих статистически достаточное число соединений (см. раздел 4.3).

Показано, что математическое ожидание величины активности в ряду соединений одного и того же химического класса является по-

казателем вклада базовой структуры в активность соединений данного ряда [Голендер В.Е., 1978]. В случае отсутствия информации о характере распределения, несмещенной и состоятельной оценкой математического ожидания является медиана (середица упорядоченного ряда наблюдений) [Глотов Н. В., 1982]

$$M(X) = \text{med} (X_i) ,$$

$$i = 1$$

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

При увеличении объема выборки медианная оценка асимптотически приближается к максимуму функции распределения, описывающей зависимость «структура – активность». В частности, такой подход используется в методе Фри-Вильсона [Голендер В.Е., 1978] для определения вклада базовой структуры в активность того или иного соединения. Таким образом, рассчитывая медианы в ряду активности соединений нескольких классов, мы получаем состоятельные несмещенные оценки вкладов базовых структур каждого конкретного класса в общую активность этих химических соединений.

Результаты медианного оценивания гипогликемической активности различных классов производных бензимидазола приведены в табл. 4.6.

Таблица 4.6

### Медианные оценки гипогликемической активности классов производных бензимидазола

Химический класс	Число соединений	Медиана $Ind_R$	Разность <sup>1</sup>
N <sup>1</sup> -ДгИмБИ	7	0,87	—
ПрмБИ	30	0,88	0.01
N <sup>9</sup> -ИмБИ	22	0,93	0.05
N <sup>9</sup> -ДгИмБИ	35	0,95	0.02
2-АмБИ	11	1,10	0.15

<sup>1</sup>Между соседними по величине  $Ind_R$  классами.

По значениям медианных оценок перспективность химических классов производных бензимидазола как источников веществ с гипогликемической активностью убывает в следующей последовательности: N<sup>1</sup>-ДгИмБИ > ПрмБИ > N<sup>9</sup>-ИмБИ > N<sup>9</sup>-ДгИмБИ >> 2-АмБИ. Анализ разностей этих величин в упорядоченном ряду показывает, что только класс 2-АмБИ можно считать неперспективным, так как его медианная оценка 1,10 существенно ниже оценки 0,95 соседнего с ним класса N<sup>9</sup>-ДгИмБИ (разность составляет 0,15). Остальные классы несущественно отличаются друг от друга: разность между парами соседних значений колеблется от 0,01 до 0,05, а максимальная разность между крайними по медианным оценкам классами N<sup>1</sup>-ДгИмБИ и N<sup>9</sup>-ДгИмБИ составляет 0,08.

Таким образом, по результатам анализа методом медианных оценок влияния базовой структуры на уровень гипогликемической активности, класс 2-амино-бензимидазолов является неперспективным. Остальные классы производных бензимидазола: N<sup>1</sup>-ДгИмБИ, ПрмБИ, N<sup>9</sup>-ИмБИ и N<sup>9</sup>-ДгИмБИ – характеризуются примерно одинаковой степенью влияния базовой структуры на величину гипогликемического действия.

Важной характеристикой химического класса является лабильность основной химической структуры при модификации ее заместителями, так или иначе влияющими на уровень фармакологического эффекта. В математической статистике показателем вариабельности случайной величины является дисперсия, для оценки которой могут быть использованы разного рода супремальные функции [Корн Г., 2003]. Высокая лабильность базовой химической структуры порождает увеличение дисперсии в ряду значений активности соединений, содержащих различные заместители. Поскольку поиск новых лекарственных веществ ориентирован прежде всего на высокоактивные соединения, то для оценки перспективности анализируемого класса, с точки зрения усиления активности базовой структуры, имеет смысл рассматривать именно супремальные оценки ряда, т.е. оценки, отражающие максимальные значения показателя фармакологической активности.

В рамках данной работы метод супремального оценивания был применен для определения влияния вводимых заместителей на уровень гипогликемической активности производных бензимидазолов различных химических классов.

Наиболее естественным способом оценки вариабельности в данном случае является функция максимума

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

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

При увеличении объема выборки функция максимума асимптотически приближается к супремуму функции, описывающей зависимость «структура-активность». Таким образом, максимальное значение среди всех полученных экспериментальных величин активности отражает степень влияния на базовую структуру вводимых в эту структуру заместителей, усиливающих активность соединения. Результаты супремального оценивания гипогликемической активности различных классов производных бензимидазола приведены в табл. 4.7. и на рис. 4.3.

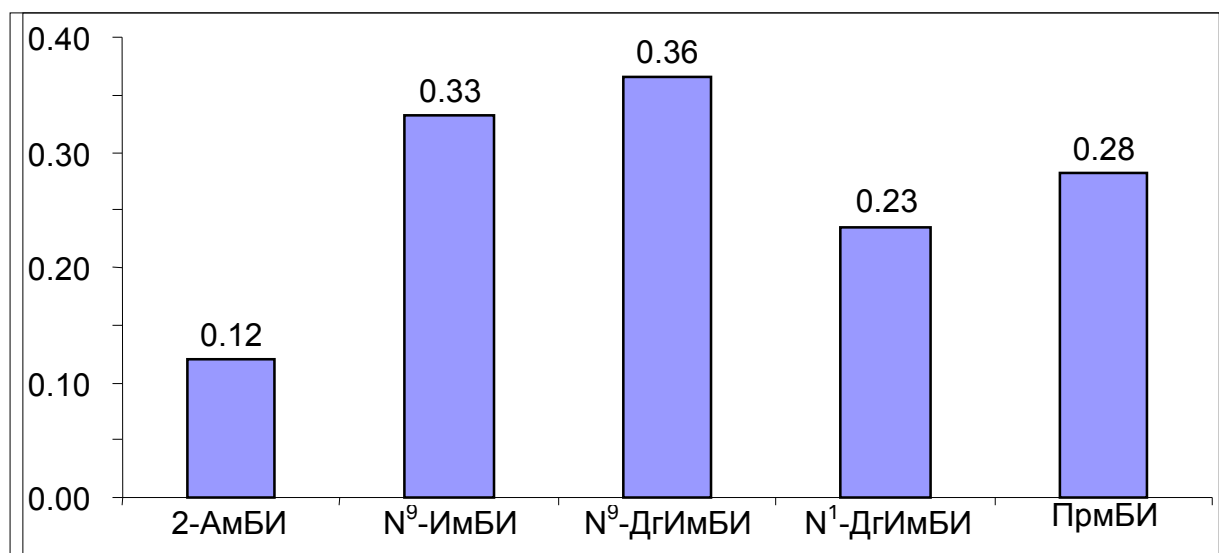
Из приведенных данных видно, что наиболее лабильной структурой в отношении заместителей, повышающих уровень гипогликемической активности, являются  $N^9$ -ДгИмБИ (супремальный показатель равен 0,36). Также весьма восприимчивой к повышению гипогликемической активности, путем введения соответствующих заместителей, является структура  $N^9$ -ИмБИ (супремальный показатель 0,33). Остальные базовые структуры имеют более низкие величины этого параметра. Таким образом, в результате проведенного анализа методом супремальных оценок установлено, что наиболее лабильной к введению заместителей, повышающих уровень гипогликемической активности, является структура  $N^9$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола.



**Супремальные оценки гипогликемической активности классов производных бензимидазола**

Химический класс	Число соединений	Максимум( $1-Ind_R$ ) <sup>1</sup>
N <sup>1</sup> -ДгИмБИ	7	0,23
ПрмБИ	30	0,28
N <sup>9</sup> -ИмБИ	22	0,33
N <sup>9</sup> -ДгИмБИ	35	0,36
2-АмБИ	11	0,12

<sup>1</sup>Снижение концентрации глюкозы в крови подопытных животных.



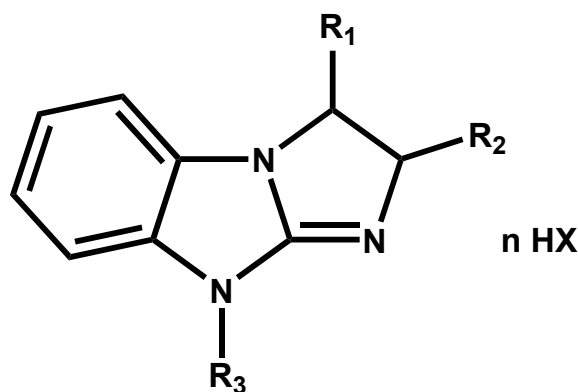
**Рис. 4.3. Супремальные оценки влияния типа базовой структуры на высокую гипогликемическую активность производных бензимидазола**

Обобщая изложенные в разделах 4.2, 4.3, 4.4 результаты анализа семью различными методами *in silico* влияния базовой структуры девяти химических классов производных конденсированных и неконденсированных бензимидазолов на их гипогликемическую активность, можно с высокой достоверностью утверждать, что класс N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолов является наиболее пер-

спективным для поиска веществ с высокой гипогликемической активностью, как по величине вклада собственно основной структуры в суммарный гипогликемический эффект, так и по степени лабильности этой основной структуры к введению в нее заместителей, усиливающих гипогликемическое действие.

#### 4.5. Подструктурный анализ уровня гипогликемической активности в ряду N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазолов

Для 56 экспериментально изученных производных N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола общей формулой



проведен подструктурный анализ влияния заместителей на уровень гипогликемической активности, отдельно по двум градациям: «высокая» ( $Ind_R < 0,82$ ), «высокая или умеренная» или «выраженная» ( $Ind_R < 0,90$ ).

Процедура определения границ классов активности методом кластерного анализа описана в разделе 4.2. Алгоритм подструктурного анализа изложен в разделе 4.3.

В данной части исследования в качестве признаков, ответственных за проявление высокой или выраженной гипогликемической активности, рассматривали вид заместителей  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  и вид кислотного остатка nHX. Всего проанализировано 52 структурных признака, характер и степень влияния каждого из которых на уровень активности отражал коэффициент информативности  $K_{Pr}$  (см. раздел 4.2).

Для выраженной гипогликемической активности ( $Ind_R < 0,90$ ) выявлено семь признаков, так или иначе влияющих на данный уровень активности; результаты анализа приведены в табл. 4.8.

Пять признаков оказывают очень слабое, статистически недостоверное, положительное или отрицательное влияние на данный уровень активности. Два признака характеризуются выраженным, статистически достоверным влиянием: феноксиметил в положении  $R_2$  влияет отрицательно, а кислотный остаток иодид – положительно.

Таблица 4.8

### Подструктурный анализ выраженной гипогликемической активности производных N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола<sup>1</sup>

Признак активности	$P_h^2$	$P_{nh}^3$	$Z^4$	$Pr^5$	$K_{Pr}^6$
<b><math>R_2</math></b>					
–CH <sub>2</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ; феноксиметил	0,2000	0,8000	1,74	0,0410	–3
<b><math>R_3</math></b>					
–C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ; этил	0,7500	0,2500	1,24	0,1080	+1
–(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NC <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O; морфолиноэтил	0,2500	0,7500	1,24	0,1080	–1
–CH <sub>2</sub> CO(4-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br); (4-бромфенил)карбосометил	0,7500	0,2500	1,24	0,1080	+1
<b>n NH</b>					
2HCl; дигидрохлорид	0,3846	0,6154	1,08	0,1404	–1
2HBr; дигидробромид	0,2500	0,7500	1,24	0,1080	–1
I <sup>–</sup> ; иодид	0,8000	0,2000	1,74	0,0410	+3

<sup>1</sup>Градация активности «высокая или умеренная», соответствует  $Ind_R < 0,90$ ;

<sup>2</sup>байесовская вероятность встречаемости в классе соединений с выраженной активностью;

<sup>3</sup>байесовская вероятность встречаемости в классе соединений, не обладающих выраженной активностью;

<sup>4</sup>биномиальный критерий (имеет нормальное распределение);

<sup>5</sup>достоверность различий  $P_h$  и  $P_{nh}$ ;

<sup>6</sup>коэффициент информативности различий  $P_h$  и  $P_{nh}$ .

Для высокой гипогликемической активности ( $Ind_R < 0,82$ ) выявлено 19 признаков, имеющих влияние на этот уровень активности;

результаты анализа приведены в табл. 4.9. 16 признаков оказывают очень слабое, статистически недостоверное положительное или отрицательное влияние на высокий уровень активности. Два признака оказывают слабое, статистически недостоверное влияние: феноксиметил в положении  $R_2$  влияет отрицательно, а кислотный остаток иодид – положительно (как в случае «выраженной» активности). Статистически достоверным влиянием на высокий уровень гипогликемической активности обладает один единственный заместитель в положении  $R_3$  – диэтиламиноэтил.

Таким образом, по данным подструктурного анализа, для производных  $N^9$ -2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола статистически достоверно «умеренный или высокий» уровень активности обуславливает кислотный остаток иодид, а «высокий» уровень активности детерминирует заместитель диэтиламиноэтил в положении  $R_3$ .

**Подструктурный анализ высокой гипогликемической активности производных N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола<sup>1</sup>**

Признак активности	$P_h$ <sup>2)</sup>	$P_{nh}$ <sup>3)</sup>	$Z$ <sup>4)</sup>	$Pr$ <sup>5)</sup>	$K_{Pr}$ <sup>6)</sup>
<b>R<sub>2</sub></b>					
-CH <sub>2</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ; феноксиметил	0,2407	0,7593	1,32	0,0932	-2
<b>R<sub>3</sub></b>					
-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ; этил	0,2910	0,7090	0,90	0,1828	-1
-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ; бензил	0,7258	0,2742	1,03	0,1504	+1
-CH <sub>3</sub> ; метил	0,6381	0,3619	0,88	0,1903	+1
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NC <sub>5</sub> H <sub>10</sub> ; пиперидиноэтил	0,6381	0,3619	0,88	0,1903	+1
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> ; диэтиламиноэтил	0,7064	0,2936	1,81	0,0355	+3
-CH <sub>2</sub> CO(α-C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> ); (α-нафтил)карбосометил	0,7258	0,2742	1,03	0,1504	+1
-CH <sub>2</sub> CH(OH)(t-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ); 2-трет-бутил-2-гидроксиэтил	0,7258	0,2742	1,03	0,1504	+1
-CH <sub>2</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ; этилкарбосометил	0,7258	0,2742	1,03	0,1504	+1
-CH <sub>2</sub> COOC <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ; н-бутилкарбосометил	0,7258	0,2742	1,03	0,1504	+1
-CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> ; аминокарбосометил	0,7258	0,2742	1,03	0,1504	+1
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NC <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O; морфолиноэтил	0,2910	0,7090	0,90	0,1828	-1
-CH <sub>2</sub> CO(4-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); (4-бензо[1,3]диоксолил)карбосометил	0,7258	0,2742	1,03	0,1504	+1
-CH <sub>2</sub> CO(4-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> ); (4-нитрофенил)карбосометил	0,7258	0,2742	1,03	0,1504	+1
-CH <sub>2</sub> CO(4-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br); (4-бромфенил)карбосометил	0,2910	0,7090	0,90	0,1828	-1
<b>n НХ</b>					
2HNO <sub>3</sub> ; динитрат	0,7258	0,2742	1,03	0,1504	+1
HCl; гидрохлорид	0,4171	0,5829	1,22	0,1110	-1
2HBr; дигидробромид	0,2910	0,7090	0,90	0,1828	-1
Г; иодид	0,7142	0,2858	1,34	0,0899	+2

<sup>1</sup> Градация активности «высокая» соответствует  $Ind_R < 0,82$ ;

<sup>2</sup> байесовская вероятность встречаемости в классе высокоактивных соединений;

<sup>3</sup> байесовская вероятность встречаемости в классе не высокоактивных соединений;

<sup>4</sup> биномиальный критерий (имеет нормальное распределение);

<sup>5</sup> достоверность различий  $P_h$  и  $P_{nh}$ ;

<sup>6</sup> коэффициент информативности различий  $P_h$  и  $P_{nh}$ .

#### 4.6. Частотный анализ физико-химических параметров производных N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола с различным уровнем гипогликемической активности

С целью выявления дополнительных QSAR-закономерностей, характерных для производных N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола с выраженной ( $Ind_R < 0,90$ ) или с высокой ( $Ind_R < 0,82$ ) гипогликемической активностью, был выполнен частотный анализ липофильных, стерических и электронных параметров 49 соединений.

Показатели липофильности в виде логарифма коэффициента распределения в системе «октанол-вода»  $\log P$  вычислялись с применением различных схем фрагментного приближения [Broto P., 1984]. Этот параметр был вычислен без учета кислотного остатка:  $\log P_0$  – для всей молекулы в целом;  $\log P_2$  – для заместителя R<sub>2</sub>;  $\log P_3$  – для заместителя R<sub>3</sub>; заместителем R<sub>1</sub> во всех структурах был водород.

В качестве стерического параметра использовалась молекулярная рефракция MR, значения которой рассчитывались с использованием классической аддитивной схемы в различных модификациях [Иоффе Б.В., 1983]. Стерические характеристики также были вычислены без учета кислотного остатка: MR<sub>0</sub> – для всей молекулы в целом; MR<sub>2</sub> – для заместителя R<sub>2</sub>; MR<sub>3</sub> – для заместителя R<sub>3</sub>.

Электронными характеристиками служили заряды на атомах, которые рассчитывались с использованием метода AM1 [Dewar M.J.S., 1985], с предварительной оптимизацией конформации методом молекулярной механики MM2 [Буркерт У., 1986]. С учетом кислотного остатка, были вычислены следующие электронные параметры:

$M(Q)_1$  – средний заряд на заместителе R<sub>1</sub>;

$M|Q|_1$  – средний абсолютный заряд на заместителе R<sub>1</sub>;

$Max(Q^+)_1$  – максимальный положительный заряд на заместителе R<sub>1</sub>;

$Min(Q^+)_1$  – минимальный положительный заряд на заместителе R<sub>1</sub>;

$M(Q)_2$  – средний заряд на заместителе R<sub>2</sub>;

$M|Q|_2$  – средний абсолютный заряд на заместителе  $R_2$ ;  
 $\text{Max}(Q^+)_2$  – максимальный положительный заряд на заместителе  $R_2$ ;  
 $\text{Max}(Q^-)_2$  – максимальный отрицательный заряд на заместителе  $R_2$ ;  
 $\text{Min}(Q^+)_2$  – минимальный положительный заряд на заместителе  $R_2$ ;  
 $\text{Min}(Q^-)_2$  – минимальный отрицательный заряд на заместителе  $R_2$ ;  
 $Q(\text{Het}^1)_2$  – заряд на первом гетероатоме заместителя  $R_2$ ;  
 $M(Q)^3$  – средний заряд на заместителе  $R_3$ ;  
 $M|Q|^3$  – средний абсолютный заряд на заместителе  $R_3$ ;  
 $\text{Max}(Q^+)_3$  – максимальный положительный заряд на заместителе  $R_3$ ;  
 $\text{Max}(Q^-)_3$  – максимальный отрицательный заряд на заместителе  $R_3$ ;  
 $\text{Min}(Q^+)_3$  – минимальный положительный заряд на заместителе  $R_3$ ;  
 $\text{Min}(Q^-)_3$  – минимальный отрицательный заряд на заместителе  $R_3$ ;  
 $Q(\text{Het}_1)_3$  – заряд на первом гетероатоме заместителя  $R_3$ ;  
 $Q(\text{Het}_2)_3$  – заряд на втором гетероатоме заместителя  $R_3$ ;  
 $Q(\text{Het}_3)_3$  – заряд на третьем гетероатоме заместителя  $R_3$ ;  
 $M(Q)_{CS}$  – средний заряд на конденсированной системе;  
 $M|Q|_{CS}$  – средний абсолютный заряд на конденсированной системе;  
 $\text{Max}(Q^+)_{CS}$  – максимальный положительный заряд на конденсированной системе;  
 $\text{Max}(Q^-)_{CS}$  – максимальный отрицательный заряд на конденсированной системе;  
 $\text{Min}(Q^+)_{CS}$  – минимальный положительный заряд на конденсированной системе;  
 $\text{Min}(Q^-)_{CS}$  – минимальный отрицательный заряд на конденсированной системе;  
 $Q(N_1)_{CS}$  – заряд на атоме  $N_1$  конденсированной системы;  
 $Q(N_9)_{CS}$  – заряд на атоме  $N_9$  конденсированной системы;  
 $Q(N_4)_{CS}$  – заряд на атоме  $N_4$  конденсированной системы;  
 $Q(\text{Benz})_{CS}$  – суммарный заряд на бензольном кольце конденсированной системы;  
 $Q(\text{Imid}_1)_{CS}$  – суммарный заряд на внутреннем имидазольном кольце конденсированной системы;  
 $Q(\text{Imid}_2)_{CS}$  – суммарный заряд на внешнем имидазольном кольце конденсированной системы;

$Q(Ac_R)$  – суммарный заряд на кислотном остатке, координированном к заместителю;

$Q(Ac_{Cond})$  – суммарный заряд на кислотном остатке, координированном к конденсированной системе.

Всего было рассчитано 40 физико-химических параметров. Дискретные физико-химические признаки описания структуры соединений формировали посредством разбивки на пять интервалов диапазона значений каждого физико-химического параметра. В результате были сформированы 200 дискретных физико-химических признаков. Влияние каждого такого дискретного физико-химических признака на различные уровни гипогликемической активности производных N<sup>9</sup>-ДгИмБИ было оценено по алгоритму подструктурного анализа (см. раздел 4.3) с расчетом коэффициентов информативности  $K_{Pr}$  (см. раздел 4.2). В табл. 4.10. приведены наиболее значимые физико-химические признаки выраженной гипогликемической активности, имеющие коэффициент информативности не менее двух.

Найдено три физико-химических признака, статистически достоверно положительно влияющих на наличие у производных N<sub>9</sub>-ДгИмИ выраженной гипогликемической активности и только один признак, имеющий статистически достоверное отрицательное влияние.

В табл. 4.11. приведены наиболее значимые физико-химические признаки высокой гипогликемической активности, имеющие коэффициент информативности не менее двух.

Найдено шесть физико-химических признаков, статистически достоверно положительно влияющих на наличие у производных N<sub>9</sub>-ДгИмИ высокой гипогликемической активности, из них один признак обладает сильным достоверным положительным влиянием ( $K_{Pr} = +4$ ).

Найдено четыре физико-химических признака, статистически достоверно отрицательно влияющих на высокую гипогликемическую активность производных N<sub>9</sub>-ДгИмИ, из них один признак обладает сильным достоверным отрицательным влиянием ( $K_{Pr} = -4$ ).

Обращает на себя внимание тот факт, что, в сравнении с выраженной активностью, для высокой активности производных N<sub>9</sub>-



ДГИМБИ выявлено больше статистически достоверно влияющих на активность физико-химических признаков, имеющих большую статистическую значимость.

Таблица 4.10

**Частотный анализ физико-химических параметров производных  
N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола с выраженной  
гипогликемической активностью<sup>1</sup>**

Признак активности	$P_h$ <sup>2)</sup>	$P_{nh}$ <sup>3)</sup>	$Z$ <sup>4)</sup>	$Pr$ <sup>5)</sup>	$K_{Pr}$ <sup>6)</sup>
$13,16 \leq MR_3 < 27,51$	0,7026	0,2974	1,93	0,0269	+3
$M Q _{CS} < 0,105$	0,8128	0,1872	1,89	0,0293	+3
$Q(\text{Imid}_1)_{CS} \geq -0,109$	0,7409	0,2591	1,72	0,0429	+3
$60,69 \leq MR_0 < 75,04$	0,7000	0,3000	1,62	0,0529	+2
$2,09 \leq \log P_3 < 3,26$	0,7000	0,3000	1,62	0,0529	+2
$M Q _3 \geq 0,184$	0,7634	0,2366	1,36	0,0869	+2
$-0,474 \leq \text{Min}(Q^-)_3 < -0,393$	0,7634	0,2366	1,36	0,0869	+2
$-0,216 \leq Q(\text{Het}_3)_3 < -0,120$	0,7634	0,2366	1,36	0,0869	+2
$M(Q)_{CS} \geq -0,067$	0,7634	0,2366	1,36	0,0869	+2
$\text{Min}(Q^+)_{CS} \geq 0,037$	0,7634	0,2366	1,36	0,0869	+2
$-0,451 \leq Q(\text{N}_4)_{CS} < -0,372$	0,7634	0,2366	1,36	0,0869	+2
$Q(\text{Imid}_2)_{CS} \geq -0,262$	0,7634	0,2366	1,36	0,0869	+2
$-0,284 \leq Q(\text{Het}_2)_3 < -0,059$	0,2810	0,7190	2,00	0,0230	-3
$MR_0 \geq 103,72$	0,3337	0,6663	1,35	0,0886	-2
$\text{Max}(Q^-)_3 < -0,096$	0,2118	0,7882	1,61	0,0538	-2
$-0,092 \leq M(Q)_{CS} < -0,080$	0,3337	0,6663	1,35	0,0886	-2
$\text{Min}(Q^+)_{CS} < 0,014$	0,2118	0,7882	1,61	0,0538	-2
$-0,509 \leq Q(\text{Imid}_2)_{CS} < -0,386$	0,4016	0,5984	1,39	0,0821	-2

<sup>1</sup>Градация активности «высокая или умеренная», соответствует  $Ind_R < 0,90$ ;

<sup>2</sup>байесовская вероятность встречаемости в классе соединений с выраженной активностью;

<sup>3</sup>байесовская вероятность встречаемости в классе соединений, не обладающих выраженной активностью;

<sup>4</sup>биномиальный критерий (имеет нормальное распределение);

<sup>5</sup>достоверность различий  $P_h$  и  $P_{nh}$ ;

<sup>6</sup>коэффициент информативности различий  $P_h$  и  $P_{nh}$ ;

**Частотный анализ физико-химических параметров  
производных N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола  
с высокой гипогликемической активностью <sup>1)</sup>**

Признак активности	$P_h^2$	$P_{nh}^3$	$Z^4$	$Pr^5$	$K_{Pr}^6$
$0,029 \leq \text{Min}(Q^+)_{CS} < 0,037$	0,7834	0,2166	2,54	0,0056	+4
$60,69 \leq MR_0 < 75,04$	0,7373	0,2627	2,18	0,0146	+3
$13,16 \leq MR_3 < 27,51$	0,7030	0,2970	2,12	0,0170	+3
$M(Q)_3 \geq 0,066$	0,7984	0,2016	2,31	0,0103	+3
$\text{Min}(Q^+)_{CS} \geq 0,037$	0,8267	0,1733	2,07	0,0191	+3
$Q(N_4)_{CS} < -0,232$	0,6964	0,3036	1,84	0,0326	+3
$0,111 \leq M(Q)_2 < 0,156$	0,6119	0,3881	1,34	0,0900	+2
$0,030 \leq M(Q)_3 < 0,066$	0,6863	0,3137	1,53	0,0634	+2
$0,069 \leq \text{Min}(Q^+)_3 < 0,095$	0,6179	0,3821	1,28	0,0996	+2
$\text{Max}(Q^+)_{CS} \geq 0,240$	0,7394	0,2606	1,58	0,0570	+2
$Q(Ac_R) < -0,213$	0,6863	0,3137	1,53	0,0634	+2
$0,018 \leq \text{Min}(Q^+)_3 < 0,043$	0,1478	0,8522	2,45	0,0071	-4
$-0,006 \leq M(Q)_3 < 0,030$	0,3986	0,6014	1,65	0,0492	-3
$\text{Max}(Q^+)_3 < 0,156$	0,2882	0,7118	1,78	0,0372	-3
$0,014 \leq \text{Min}(Q^+)_{CS} < 0,021$	0,2537	0,7463	2,24	0,0124	-3
$-0,384 \leq Q(\text{Het}_1)_3 < -0,299$	0,3598	0,6402	1,35	0,0890	-2
$-0,185 \leq Q(N_4)_{CS} < -0,139$	0,2118	0,7882	1,61	0,0538	-2

<sup>1)</sup> Градация активности «высокая» соответствует  $Ind_R < 0,82$ ;

<sup>2)</sup> байесовская вероятность встречаемости в классе высокоактивных соединений;

<sup>3)</sup> байесовская вероятность встречаемости в классе не высокоактивных соединений;

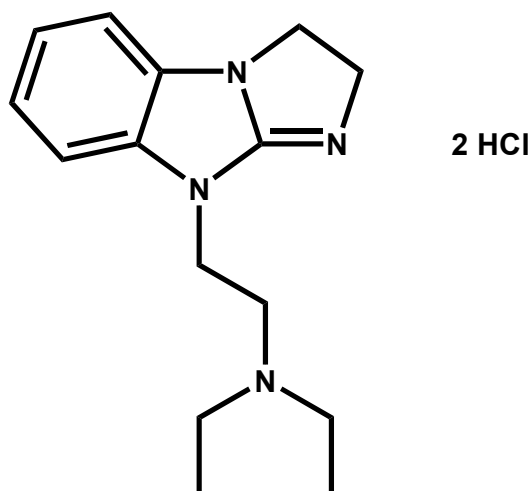
<sup>4)</sup> биномиальный критерий (имеет нормальное распределение);

<sup>5)</sup> достоверность различий  $P_h$  и  $P_{nh}$ ;

<sup>6)</sup> коэффициент информативности различий  $P_h$  и  $P_{nh}$ .

Таким образом, в результате проведенного частотного анализа физико-химических параметров производных N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазола найдено 14 статистически значимых физико-химических признаков, достоверно детерминирующих наличие или отсутствие у данных соединений высокой или выраженной гипогликемической активности. Полученные данные могут быть использованы в направленном поиске новых высокоактивных веществ данного химического класса.

Анализируя полученные результаты и сопоставляя их с характеристиками изученных производных бензимидазола, можно с достаточно высокой достоверностью утверждать, что наиболее перспективным для дальнейшего исследования гипогликемических свойств является соединение – дигидрохлорид 9-диэтиламино-этил-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола, лабораторный шифр соединения РУ-254 (диабенол).



Соединение РУ-254 соответствует следующим критическим характеристикам, определяющим необходимость его более детального изучения:

- по результатам прогноза с помощью системы PASS и ИТ «Микрокосм» базы данных из 1036 структур производных бензимидазола, класс N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола является перспективным источником веществ с высокой гипогликемической активностью;
- по результатам подструктурного анализа 109 экспериментально изученных производных бензимидазола, класс N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола также является перспективным источником веществ с высокой гипогликемической активностью;
- по данным анализа методом медианных и супремальных оценок 105 экспериментально изученных производных бензимидазола, класс N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола является перспективным для поиска веществ с высокой гипогликемической активностью, как по величине вклада основной структуры в суммарный гипогликемический эффект, так и по степени лабильности основной структу-

ры к введению в нее заместителей, усиливающих гипогликемическое действие;

- по результатам подструктурного анализа 56 экспериментально изученных производных N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола выявлен значимый признак высокой гипогликемической активности – заместитель диэтиламиноэтил в положении N<sup>9</sup>, который входит в структуру соединения «диабенол»;
- по данным частотного анализа физико-химических параметров 56 экспериментально изученных производных N<sup>9</sup>-2,3-дигидро-имидазо[1,2-а]бензимидазола, выявлен значимый признак высокой гипогликемической активности, характеризующий заряд на внутреннем цикле имидазольного кольца конденсированной системы  $Q(\text{Imid}_1)_{\text{CS}} \geq -0.109$ . Электронные параметры соединения «диабенол» соответствуют этому условию.

#### **4.7. Анализ *in silico* по показателям ADME перспективности изучения гипогликемических свойств соединения диабетенол**

Методами *in silico* были рассчитаны фармакокинетические показатели диабетенола и референсных противодиабетических препаратов метформина и глибенкламида, с последующим сравнительным анализом полученных данных с целью оценки диабетенола, как достаточно хорошего кандидата на лекарственное вещество.

Исследование проводили в два этапа. На первом этапе было оценено лекарственное подобие (drug-likeness) изучаемых веществ. В виртуальном скрининге для этого используются простые фильтры, основанные на физико-химических свойствах, характерных для лекарственных соединений [Kerns E.H., 2008]. Наиболее известным из таких фильтров является правило Липински [Lipinski C.A., 1997]. Расчеты были выполнены с помощью программы DruLiTo [Drug Likeness Tool, 2015], в которой для каждой химической структуры рассчитываются следующие показатели:

- MW – молекулярный вес;
- logP – липофильность, логарифм коэффициента распределения в системе «октанол-вода»;
- HBA – число групп, выступающих как акцепторы протона при образовании водородной связи;
- HBD – число групп, выступающих как доноры протона при образовании водородной связи;
- AMR – атомная молекулярная рефракция;
- nAtom – число атомов;
- TPSA – площадь топологической полярной поверхности;
- nRB – число конформационно подвижных связей;
- RC – число циклов;
- nRigidB – число конформационно жестких связей;
- nAcidicGroup – число кислотных групп;
- nHB – число групп, способных образовывать водородные связи;
- AlogP – липофильность с учетом гидратации, логарифм коэффициента распределения в системе «октанол-вода»;
- nAromRing – число ароматических циклов;
- SAlerts – индекс опасности;
- uwQED – невзвешенная количественная оценка лекарственного подобия;
- wQED – взвешенная количественная оценка лекарственного подобия.

Результаты расчета программой DruLiToADME-свойств диабенола, метформина и глибенкламида приведены в табл. 4.12.

Следует отметить, что для диабенола характерны существенно более высокие количественные оценки лекарственного подобия  $uwQED = 0,791$  и  $wQED = 0,832$ , в сравнении с метформином и глибенкламидом. Вероятно, диабенол будет обладать лучшими фармакокинетическими характеристиками и проявлять меньше побочных эффектов, чем два указанных препарата сравнения.

**Расчетные ADME-характеристики диабенола, метформина  
и глибенкламида<sup>1</sup>**

Параметр	Диабенол	Метформин	Глибенкламин
MW	258,18	129,10	493,14
logP	2,491	0,558	2,589
AlogP	0,581	-0,223	-1,072
HBA	4	5	8
HBD	0	4	3
TPSA	22,08	88,99	121,98
AMR	82,35	31,29	123,30
nRB	5	3	11
nAtom	41	20	61
nAcidicGroup	0	0	0
RC	3	0	3
nRigidB	16	5	24
nAromRing	1	0	2
nHB	4	9	11
SAalerts	0	2	0
uwQED	0,791	0,485	0,445
wQED	0,832	0,401	0,460

<sup>1</sup>Расчеты выполнены в программе DruLiTo.

В программе DruLiTo определены следующие фильтры лекарственного подобия:

1. «Lipinski's Rule»:  $MW \leq 500$ ;  $-5,0 \leq \log P \leq 5,0$ ;  $HBA \leq 5$ ;  $HBD \leq 10$  [Lipinski C.A., 1997];
2. «Ghose Filter»:  $160 \leq MW \leq 480$ ;  $-0,4 \leq \log P \leq 5,6$ ;  $20 \leq nAtom \leq 70$ ;  $40 \leq AMR \leq 130$  [Ghose A.K., 1999];
3. «CMC-50-Like Rule»:  $1,3 \leq \log P \leq 4,1$ ;  $30 \leq nAtom \leq 55$ ;  $230 \leq MW \leq 390$ ;  $70 \leq AMR \leq 110$  [Brenk R., 2008; Kerns E.H., 2008];
4. «Veber Filter»:  $nRB \leq 10$ ;  $TPSA \leq 140$  [Veber D.F., 2002];
5. «MDDR-Like Rule»:  $RC \geq 3$ ;  $nRigidB \geq 16$ ;  $nRB \geq 5$  [Oprea T.I., 2000];
6. «BBB Likeness»:  $MW \leq 400$ ;  $nHB \leq 8$ ;  $nAcidicGroup = 0$  [Kerns E.H., 2008];

7. «Unweighted QED»:  $uwQED \geq 0,5$  [Bickerton G.R., 2012];
8. «Weighted QED»:  $wQED \geq 0,5$  [Bickerton G.R., 2012].

Результат применения всех этих восьми фильтров к трем анализируемым соединениям приведен на рис. 4.4.

The screenshot shows the DruLiTo software interface. At the top, there are tabs for 'Properties', 'Lipinski'sRule', 'GhoseFilter', 'CMC-50-Like Rule', 'VeberFilter', 'MDDR-Like Rule', 'BBB Likeness', 'uwQED', 'wQED', 'AllSelectedFilters', and 'Summary'. Below the tabs is a table with the following data:

Sr. No.	Title	MW	logp	Alogp	HBA	HBD	TPSA	AMR	nRB	nAtom	nAcidic...	RC	nRigidB	nAtom...	nHB	SAlerts
1	Diablenol	258.18	2.491	0.581	4	0	22.08	82.35	5	41	0	3	16	1	4	0
2	Metformin	129.1	0.558	-0.223	5	4	88.99	31.29	3	20	0	0	5	0	9	2
3	Glibenclamide	493.14	2.589	-1.072	8	3	121.98	123.3	11	61	0	3	24	2	11	0

Below the table, there is a file input field containing 'E:\01Diablenol Metformin Glibenclamide.sdf', a 'Browse' button, and buttons for 'Calculate Properties', 'Apply Filter', and 'Reset'. A status bar indicates 'Molecules completed(3)'. At the bottom, there are checkboxes for various filters: Lipinski's Rule, Ghose Filter, CMC-50-Like Rule, Veber Filter, MDDR-Like Rule, BBB Likeness, Unweighted QED, and Weighted QED, each with a 'customize' button.

**Рис. 4.4. Соответствие фильтрам лекарственного подобия программы DruLiTo соединений диабенол, метформин и глибенкламид**

Согласно расчетам, метформин соответствует только двум фильтрам из восьми: «Lipinski'sRule» и «VeberFilter»; глибенкламид – также только двум фильтрам: «Lipinski'sRule» и «MDDR-LikeRule». Диабенол по своим ADME-параметрам удовлетворяет граничным условиям всех восьми фильтров лекарственного подобия программы DruLiTo.

На втором этапе для более детальной оценки расчетных фармакокинетических параметров диабенола, метформина и глибенкламида была использована программа QikProp [QikProp, 2015]. Рассчитаны следующие ADME-характеристики:

1.  $\text{Log } S$  – логарифм растворимости в воде;
2.  $\text{Log } K_{\text{HSA}}$  – логарифм константы связывания с сывороточным альбумином;

3.  $Perm_{Caco-2}$  – кажущаяся проницаемость клеток аденокарциномы толстого кишечника человека Caco-2, нмоль/сек;
4.  $Perm_{MDCK}$  – кажущаяся проницаемость клеток эпителия почек собаки MDCK, нмоль/сек;
5.  $Absr_{HOGI}$  – степень всасывания в желудочно-кишечном тракте человека при пероральном введении, %.

Для 95 % известных лекарственных средств установлены следующие граничные значения этих показателей:

$$-6,5 \leq \log S \leq 0,5;$$

$$-1,5 \leq \log K_{HSA} \leq 1,5;$$

$Perm_{Caco-2}$  – низкая < 25, высокая > 500;

$Perm_{MDCK}$  – низкая < 25, высокая > 500;

$Absr_{HOGI}$  – низкая < 25.

Результаты расчетов указанных показателей для диабенола, метформина и глибенкламида приведены в табл. 4.13.

*Таблица 4.13*

### Расчетные фармакокинетические характеристики диабенола, метформина и глибенкламида<sup>1</sup>

Параметр	Диабенол	Метформин	Глибенкламин
Log S	-2.587	-0.856	-4.98
Log $K_{HSA}$	0.193	-0.826	0.546
$Perm_{Caco-2}$ , нМ/сек	1521	196	89
$Perm_{MDCK}$ , нМ/сек	861	85	189
$Absr_{HOGI}$ , %	100	64	86

<sup>1</sup>Расчеты выполнены в программе QikProp.

В соответствии с расчетными данными, растворимость в воде  $\log S$  и степень связывания с сывороточным альбумином  $\log K_{HSA}$  у диабенола выше, чем у глибенкламида и ниже, чем у метформина.

Показатели биодоступности в тестах на клеточных культурах  $Perm_{Caco-2}$  и  $Perm_{MDCK}$  у диабенола выше, чем у метформина и глибенк-



ламида. В сравнении с данными для большинства лекарственных препаратов, расчетные величины биодоступности диабенола соответствуют градации «высокая», тогда как расчетные значения биодоступности метформина и глибенкламида относятся к градации «низкая».

Степень расчетного всасывания в желудочно-кишечном тракте при пероральном введении  $Absr_{НОGI}$  у диабенола превышает аналогичные показатели для метформина и глибенкламида.

Таким образом, по совокупности рассчитанных в программе QikProp фармакокинетических характеристик диабенол не уступает метформину и глибенкламиду.

Следует отметить, что определенные значения фармакокинетических показателей всех трех соединений находятся в диапазонах, характерных для лекарственных средств.

Обобщая результаты оценки показателей ADME, полученных с помощью двух компьютерных программ, можно с достаточно высокой достоверностью утверждать, что соединение диабенол по своим расчетным лекарственно-подобным и фармакокинетическим характеристикам сопоставимо с метформином и глибенкламидом и является весьма перспективным веществом.

В целом результаты анализа *in silico* показали следующее:

- 1) соединение диабенол относится к классу N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолов, перспективных для поиска веществ с высокой гипогликемической активностью;
- 2) химическая структура диабенола содержит заместитель N<sup>9</sup>-диэтиламиноэтил, который является значимым признаком высокой гипогликемической активности;
- 3) физико-химические параметры молекулы диабенола соответствуют значимому признаку высокой гипогликемической активности: суммарный заряд на внутреннем цикле имидазольного кольца конденсированной системы превышает величину -0,109;
- 4) по совокупности характеристик лекарственного подобия диабенол превосходит метформин и глибенкламид;
- 5) по совокупности расчетных фармакокинетических характеристик диабенол также превосходит метформин и глибенкламид.

В соответствии с вышеперечисленным, соединение РУ-254 (диабенол) является новым гипогликемическим веществом, перспективным для дальнейшего углубленного изучения.

#### **4.8. Экспериментальное изучение гипогликемических свойств соединения диабенол**

Задачами классических подходов к выявлению гипогликемической активности у веществ, является выявление специфичности их действия на углеводный обмен в условия *in vivo* и сопоставление величины эффективности изучаемого средства с эталонным/и препаратами [Спасов А.А., 2007]. В соответствии с этим, на первом этапе доклинического исследования была произведена оценка гипогликемической активности диабенола (в дозах 10, 25, 50 мг/кг) с определением базального уровня глюкозы в плазме крови экспериментальных животных при однократном пероральном введении, а также исследована продолжительность гипогликемического действия диабенола и степень его эффективности, соотнесенная к гипогликемическому действию широко применяемых в клинической практике препаратов: гликлазида и глибенкламида (в качестве препаратов сравнения).

Исследования гипогликемической активности диабенола проводили на двух видах лабораторных животных (нелинейных крысах и кроликах), получающих в течение минимум одной недели видоспецифичный, полнорационный, стандартный корм (ГОСТ Р 50258-92), сбалансированный по содержанию питательных веществ рацион питания с пищевой депривацией за 8–10 часов до проведения эксперимента. В пробах крови, которые забирали через 2 и 4 ч после введения препаратов определяли содержание глюкозы ортотолуидиновым методом при помощи наборов Био-ла-тест (Лакхема, ЧССР). Для оценки гипогликемической активности диабенола и препаратов сравнения определяли дозу (мг/кг), в которой вещества снижали содержание глюкозы в крови на 30 % (ЕД<sub>30</sub>).

В результате проведенного исследования дозозависимый гипогликемический эффект диабенола был выявлен как в экспериментах на кроликах, так и в экспериментах на крысах. В последнем случае величина  $ED_{30}$  диабенола была практически равна таковой, полученной для гликлазида и в 1,5 раза активнее глибенкламида (табл. 4.14.).

*Таблица 4.14*

**Величина гипогликемической активности диабенола, гликлазида и глибенкламида при внутрижелудочном введении крысам**

Препарат	$ED_{30}$ , мг/кг
Диабенол	24,3
Гликлазид	20,7
Глибенкламид	40,6

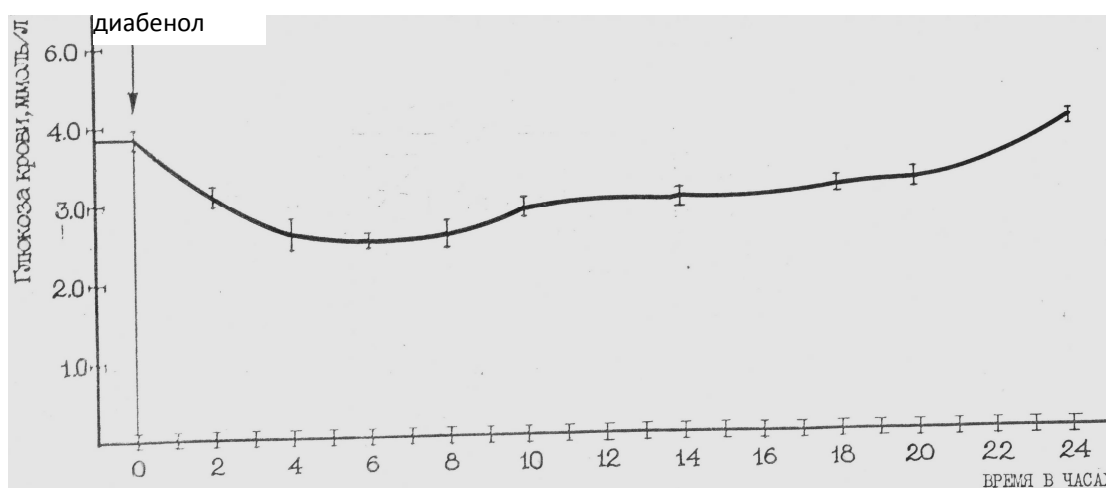
При проведении исследования на кроликах, в группе животных получавших диабенол, через два часа после введения отмечалось снижение уровня глюкозы в периферическом кровотоке, по сравнению с животными, получавшими гликлазид. К 4-му часу эксперимента величина гипогликемического эффекта диабенола достоверно удвоилась, при этом полученные значения на 10,1% превалировали над эффективностью препарата сравнения.

В отдельной серии экспериментов изучали продолжительность гипогликемического действия диабенола на крысах и кроликах. Так было выявлено, что диабенол, через два часа после введения интактным крысам (рис. 4.5), снижает содержание глюкозы в крови на 18,8 % ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с исходными значениями. Далее гипогликемический эффект продолжал нарастать и к 4-му часу достигал максимальных значений (уменьшение уровня глюкозы в плазме крови на 30,8 %,  $p \leq 0,05$ ). К 18-му часу эксперимента этот показатель все еще оставался сниженным на 16,2 % ( $p \leq 0,05$ ), а к концу суток наблю-

дения уровень сахара в плазме крови опытных животных достиг исходного уровня

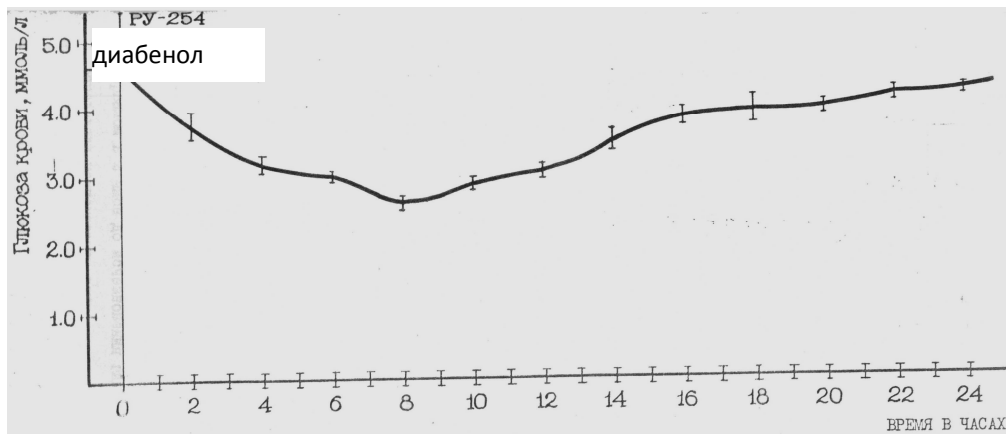
При изучении влияния диабенола на концентрацию глюкозы в крови интактных кроликов (рис. 4.6.), гипогликемический эффект был отмечен уже на втором часу эксперимента - снижение содержания глюкозы в крови на 31,4 %, а к восьмому часу на 45,1 % ( $p \leq 0,05$ ). В последующем концентрация глюкозы в плазме крови начала медленно нарастать и через 20 ч после начала эксперимента достигла исходных величин.

Таким образом, длительность гипогликемического действия диабенола не зависела от вида экспериментальных животных и составила 20–22 ч, что соответствует длительности гипогликемического действия, оказываемого производными сульфонил мочевины [Балаболкин М.И., 2005].



*Примечание.* Вертикальные штрихи соответствуют стандартной ошибке средней величины.

**Рис. 4.5. Влияние диабенола (25 мг/кг, внутрижелудочно) на содержание глюкозы в крови интактных крыс ( $M \pm m$ )**



*Примечание.* Вертикальные штрихи соответствуют стандартной ошибке средней величины.

**Рис. 4.6. Влияние диабенола (25 мг/кг, внутрижелудочно) на содержание глюкозы в крови intactных кроликов ( $M \pm m$ )**

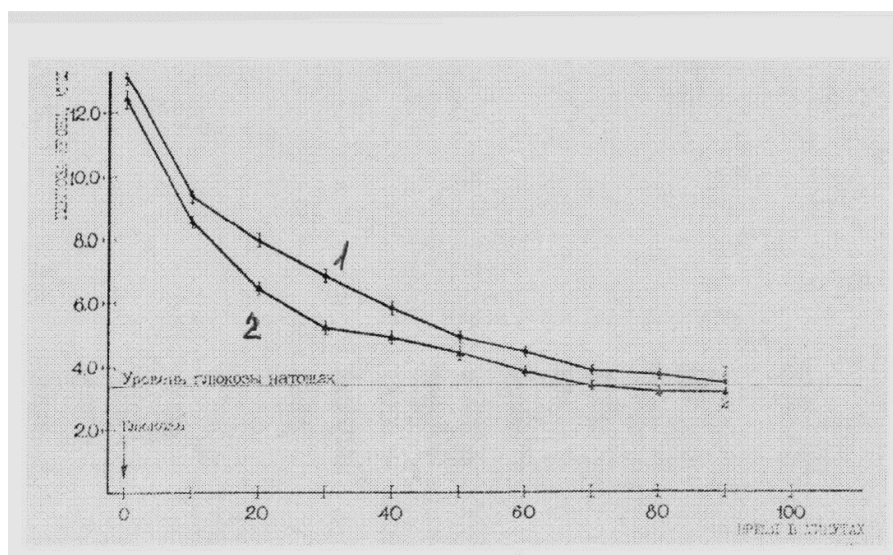
#### **4.9. Изучение сахароснижающего эффекта диабенола при внутривенной глюкозной нагрузке на intactных крысах**

При изучении сахароснижающего эффекта диабенола был использован непрямой метод оценки эффектов эндогенного инсулина на экспериментальной модели внутривенного глюкозотолерантного теста (ВВГТТ), с предварительным (в течение 10 дней) введением диабенола (25 мг/кг, перорально). Этот метод, во-первых, позволяет оценивать обе фазы секреции инсулина, т.е. глюкозозависимый механизм выделения инсулина и, во-вторых, является динамическим тестом, позволяющим воспроизвести нормальную физиологическую реакцию действия инсулина от начала до конца. Сахарную нагрузку проводили глюкозой (1 г/кг, в/в) по методу Ng. Frank (1974) в модификации P. Masiello (1998), с отбором проб крови для определения уровня глюкозы в течение 90 мин через 5 мин после введения глюкозы и далее с 10-минутными интервалами. Кроме того, в ходе проведения ВВГТТ теста оценивали чувствительность тканей к инсулину по наклону кривой снижения плазменной концентрации глюкозы, измеренной после внутривенного введения глюкозы, так называемая

константа снижения глюкозы или константа Коонарда –  $k$ . Результаты теста оценивали по методу А.В. Древалъ (1985). Принцип расчета основан на предположении, что кривая исчезновения глюкозы из крови подчиняется логарифмической зависимости.

Через 5 мин после введения глюкозы контрольной группе интактных крыс отмечается резкое повышение концентрации сахара в крови, при этом она доходит до максимального уровня уже к 30-й минуте исследования, превышая исходные значения в 2 раза. Затем отмечается снижение концентрации сахара в крови, и ко второму часу гликемия не превышает исходный уровень. Следует отметить, что скорость элиминации глюкозы за первые 50 мин эксперимента в 2 раза превышала скорость снижения сахара в крови за последующие 40 мин наблюдения.

У животных, получавших диабенол, уровень сахара в крови через 5 мин после введения глюкозы увеличился в 4 раза по сравнению с исходными значениями (12,4 ммоль/л), к 10-й минуте эксперимента содержание сахара в крови достоверно снизилось на 32 % ( $p \leq 0,05$ ), а к 70-й минуте концентрация глюкозы в крови равнялась исходной и сохранялась на этом уровне до конца периода наблюдений (рис. 4.7.).



**Рис. 4.7. Влияние диабенола при 10-дневном введении (25 мг/кг, внутрижелудочно) на содержание глюкозы в крови крыс при проведении ВВГТТ: 1 – контроль, 2 – опыт**

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно утверждать, что диабенол снижает содержание глюкозы в крови опытных животных с гипергликемией, полученной путем нагрузки глюкозой. Кроме того следует отметить, что исследуемый препарат при применении в течение 10 дней увеличивает утилизацию глюкозы, т.к. показатель скорости потребления экзогенных углеводов (К-критерий) при проведении внутривенного теста толерантности к глюкозе под его влиянием возрос в 2 раза.

#### 4.10. Заключение

Таким образом, на основе комбинированного подхода к поиску соединений, проявляющих гипогликемическое действие с использованием методов экспериментальной фармакологии и *in silico* в рядах новых производных бензимидазола были выявлены структуры, перспективные для последующей оптимизации химической структуры с целью выявления средств для лечения сахарного диабета.

На основании анализа *in silico* девяти классов конденсированных и неконденсированных производных бензимидазола, изученных по их гипогликемическому влиянию, установлены наиболее перспективные классы: N<sup>9</sup>-2,3-дигидро[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола. По величине среднего коэффициента информативности, подструктурного анализа и анализа перспективности химических классов наиболее активным является класс производных N<sup>9</sup>-2,3-дигидро[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола.

В результате проведенного частотного анализа физико-химических параметров было выявлено 14 физико-химических признаков, статистически достоверно влияющих на высокий уровень гипогликемической активности производных N<sup>9</sup>-2,3-дигидро[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола.

На основании экспериментальных данных и исследований *in silico* было выбрано соединение РУ-254 (диабенол) – N<sup>9</sup>-2,3-дигидро[1,2- $\alpha$ ]бензимидазола, как наиболее оптимальное для после-

дующего углубленного изучения гипогликемической и антидиабетогенной активности. Кроме того, соединение РУ-254 имеет более высокие количественные оценки лекарственного подобия (uwQED) и более низкий уровень опасности (SALerts), чем препараты сравнения (по данным расчетных характеристик ADME).

По данным влияния на содержание сахара в крови соединение РУ-254 при введении крысам и кроликам внутрь в дозе 25 мг/кг оказывает выраженное и длительное гипогликемическое действие.

Исследования, описанные в данной главе, выполнены в Волгоградском государственном медицинском университете при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-25-00139).



## ГЛАВА 5

# АНТИДИАБЕТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ ДИАБЕНОЛ

*А. А. Спасов, Г. П. Дудченко, М. П. Воронкова*

---

При доклиническом изучении веществ с антидиабетической активностью целесообразно проверить их эффективность в экспериментах на интактных животных и на животных с экспериментальной патологией [Wei M., 2003; Макаров В.Г., 2012]. В этом отношении использование  $\beta$ -цитотоксинов является общепринятым для моделирования различных состояний углеводного обмена, и, в зависимости от дозы повреждающего агента, соответствующим определенным клиническим классам сахарного диабета (сахарный диабет различных форм: инсулинозависимый, инсулинонезависимый, смешанная форма СД и нарушенная толерантность к углеводам, приравниваемая к латентному или скрытому диабету) [Srinivasan K., 2007; Спасов А.А. 2012]. В ходе эксперимента, как правило, производится оценка влияния фармакологического вещества на базовые показатели углеводного обмена (уровень глюкозы, инсулина и С-пептида, гликозилированного гемоглобина) и на толерантность к сахарной нагрузке, с использованием перорального [Цюхно З.И., 1981; Баранов В.Г., 1983] и внутривенного [Masiello P., 1998; Бондарь Т.П., 2003] глюкозотолерантных тестов. Кроме того, при изучении механизма действия пероральных сахароснижающих веществ, действующих на уровне  $\beta$ -эндокриноцитов, желательным является определение их эффекта на образование и выделение инсулина при их хроническом введении, для прогнозирования влияния испытуемого соединения на состояние компенсаторных свойств  $\beta$ -эндокриноцитов, и обеспечение преимущественно-

го выбора препаратов для долгосрочного применения [Смирнов А.Н., 2008]. Целесообразность сочетанного определения биосинтеза и секреции инсулина обоснована данными литературы о возможности диссоциированного влияния лекарственных препаратов на оба эти процесса, в условиях целого организма, и тормозящим действием отдельных сахароснижающих сульфаниламидов на образование инсулина, приводящем к снижению его содержания в поджелудочной железе [Дедов И. И., 2008].

### **5.1. Изучение гипогликемического действия диабенола на животных с нарушенной толерантностью к глюкозе**

Известно, что помимо прямого воздействия на систему утилизации углеводов, антидиабетические средства могут повышать чувствительность тканей к инсулину через другие механизмы. В качестве примера можно привести производные тиазолидина, которые оказывают влияние на рецепторном уровне, усиливая связывания инсулина с рецепторами в органах-мишенях – мышцах и жировой ткани [Kim H.J., 2007], а также на пострецепторном уровне, влияя не только на переносчиков глюкозы, но и на ее метаболизм. Есть литературные данные, полученные в опытах на крысах с аллоксановым и стрептозотоциновым диабетом (в тех случаях, когда первопричиной СД является инсулиновая недостаточность) об уменьшении влияния инсулина на утилизацию глюкозы [Srinivasan K., 2007]. Поэтому, для уточнения механизма действия диабенола на  $\beta$ -эндокриноциты поджелудочной железы и на процесс утилизации глюкозы, было сочтено целесообразным провести ряд экспериментов, в которых исключались отдельные факторы регуляции гомеостаза глюкозы – экспериментальных моделей латентной формы сахарного диабета, инсулинорезистентности, экзогенной гипергликемии и алиментарного ожирения.

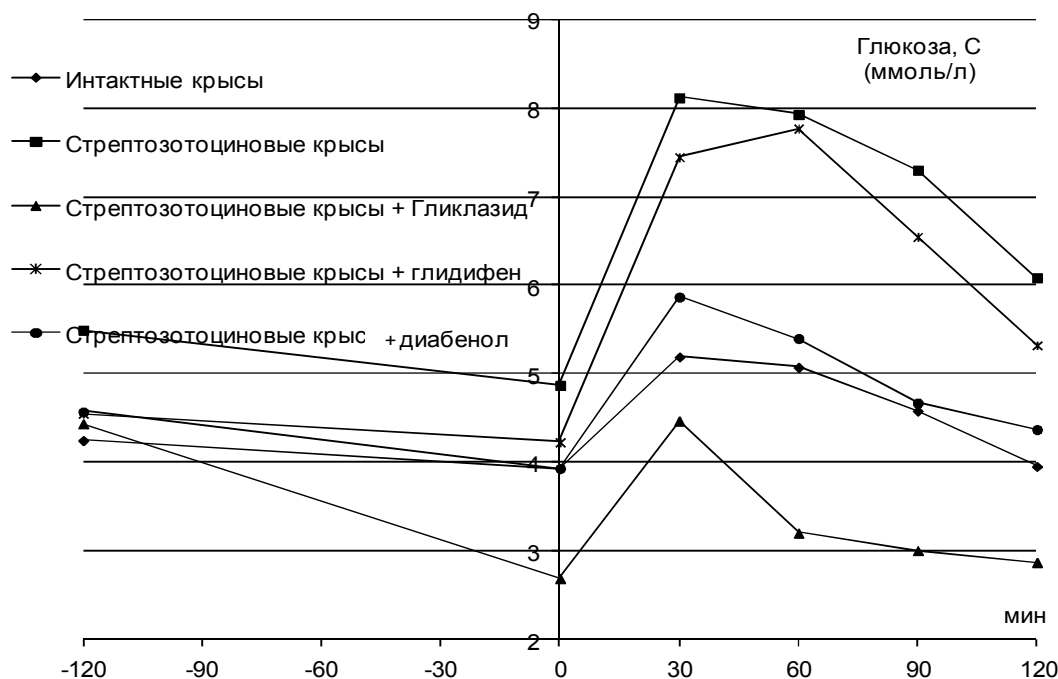
### **5.1.1. Действие диабенола на содержание глюкозы в крови животных с латентной формой стрептозотоцинового диабета**

Патологию моделировали, применяя преддиабетогенные дозы стрептозотоцина (35 мг/кг, «Sigma») по методу Ю.М. Колесник, (1993). Через неделю после введения цитотоксина проводили диагностику патологии, используя пероральный глюкозотолерантный тест глюкозой (ПГТТ), т.к. замена обычного рациона питания грызунов пероральным введением глюкозы не влияет на основные этапы регуляции секреции инсулина через энтероинсулярную ось и имитирует процессы, происходящие при естественном употреблении пищи. Экспериментальных животных (нелинейных крыс) отбирали в соответствии с критериями, позволяющими констатировать нарушенную толерантность к углеводам – пробу Химсворда [Цюхно З.И., 1981], позволяющую оценить чувствительность тканей к инсулину. Для этого раствор глюкозы вводили внутрь из расчета 30 г/м<sup>2</sup> поверхности тела, которую рассчитывают по формуле Дюбуа. Инсулин вводился внутримышечно (5 ЕД/м<sup>2</sup> поверхности тела), уровень глюкозы в крови определялся в течение 1 часа каждые 10 минут. После чего был проведен анализ гликемических кривых. Отсутствие изменений в площади под кривой «глюкоза-время» в течение часа после нагрузки свидетельствовало о снижении чувствительности к инсулину у данного животного.

Диабенол и препараты сравнения – гликлазид (с выраженным панкреотропным действием) и глидифен (с преобладанием экстрапанкреатических эффектов) животные получали внутрижелудочно за два часа до начала эксперимента, в дозах 25 и 50 мг/кг, соответственно. По истечении данного времени им перорально вводили раствор глюкозы (3 г/кг), и в течение последующих 2 часов наблюдали за динамикой изменений глюкозы в крови крыс.

В ходе проведенного эксперимента было отмечено, что через два часа после введения глюкозы ее уровень в крови крыс всех экспе-

риментальных групп по абсолютным значениям достоверно уменьшился, в сравнении с данными, полученными для контрольной группы животных (рис. 5.1).



**Рис. 5.1. Влияние гликлазида (50 мг/кг), глидифена (50 мг/кг), диабенола (25 мг/кг) внутрижелудочно на уровень глюкозы в крови крыс с экспериментальным сахарным диабетом (стрептозотоцин 35 мг/кг внутрибрюшинно) на фоне пероральной нагрузки глюкозой (3 г/кг)**

При этом следует отметить, что в группе животных, получавших диабенол, уже на 30-й минуте достоверно замедлялись темпы прироста уровня глюкозы, в то время как в группе крыс, получавших гликлазид, этот показатель снижался только через час после углеводной нагрузки. Однако отмеченное преимущество было кратковременным, и в последующие временные интервалы забора проб крови, ан-

тигипергликемический эффект гликлазида имел более выраженный характер по сравнению с диабенолом. Глидифен на данной модели не оказывал антигипергликемического действия, т.к. полученные результаты для этой группы животных соответствовали данным контрольной группы крыс.

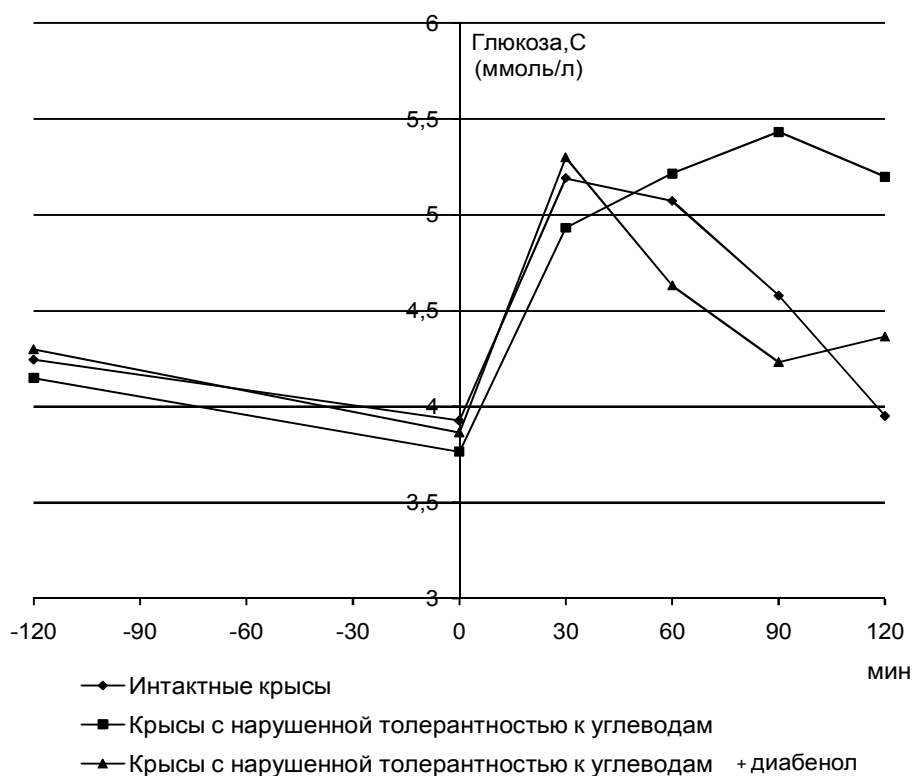
По результатам проведенных исследований можно утверждать, что диабенол уменьшает выраженность проявлений толерантности к глюкозе у экспериментальных животных. Принимая во внимание механизм действия препаратов сравнения и патофизиологические особенности экспериментальной модели, на которой была проведена данная серия исследований, полученные эффекты для диабенола можно объяснить влиянием его либо на динамику секреции инсулина, либо влиянием на механизмы утилизации глюкозы периферическими тканями.

### **5.1.2. Оценка эффективности диабенола у крыс с экзогенной гиперинсулинемией**

Патологию моделировали двукратным ежедневным подкожным введением инсулина из расчета 2 ЕД/жив на протяжении 28 дней [Гордиенко О.Е., 1973]. Животных с нарушенной толерантностью к углеводам (по результатам проведения ПГТТ) и синдромом инсулинрезистентности (диагностика с использованием пробы Химсворда) делили на две группы: первой – вводили исследуемые препараты (однократно, перорально), а второй группе – отстоянную воду. За динамикой изменений уровня глюкозы в крови начинали наблюдать через 2 ч после введения веществ, а затем на фоне ПГТТ еще в течение последующих двух часов, отбирая пробы крови через каждые 30 мин.

В результате было выявлено, что через 30 минут после введения глюкозы, в группе животных, получавших диабенол, был отмечен достоверный сахароснижающий эффект, при этом уровень глюкозы

в данной группе был практически в 2 раза ниже, чем у животных контрольной группы на протяжении всего периода наблюдения (рис. 5.2).



**Рис. 5.2. Влияние диабенола (25 мг/кг, внутрижелудочно) на уровень глюкозы в крови крыс с нарушенной толерантностью к углеводам после 27-дневного введения инсулина (0,4 ЕД/кг внутривнутрибрюшинно) на фоне пероральной нагрузки глюкозой (3 г/кг)**

Стоит отметить, что через 2 часа наблюдения, значения концентрации глюкозы в плазме крови у животных, получавших диабенол, практически приблизились к исходным данным этой группы, в то время как у крыс контрольной группы данные значения на 25,1 % преваляировали над значением, зафиксированным в начале эксперимента.

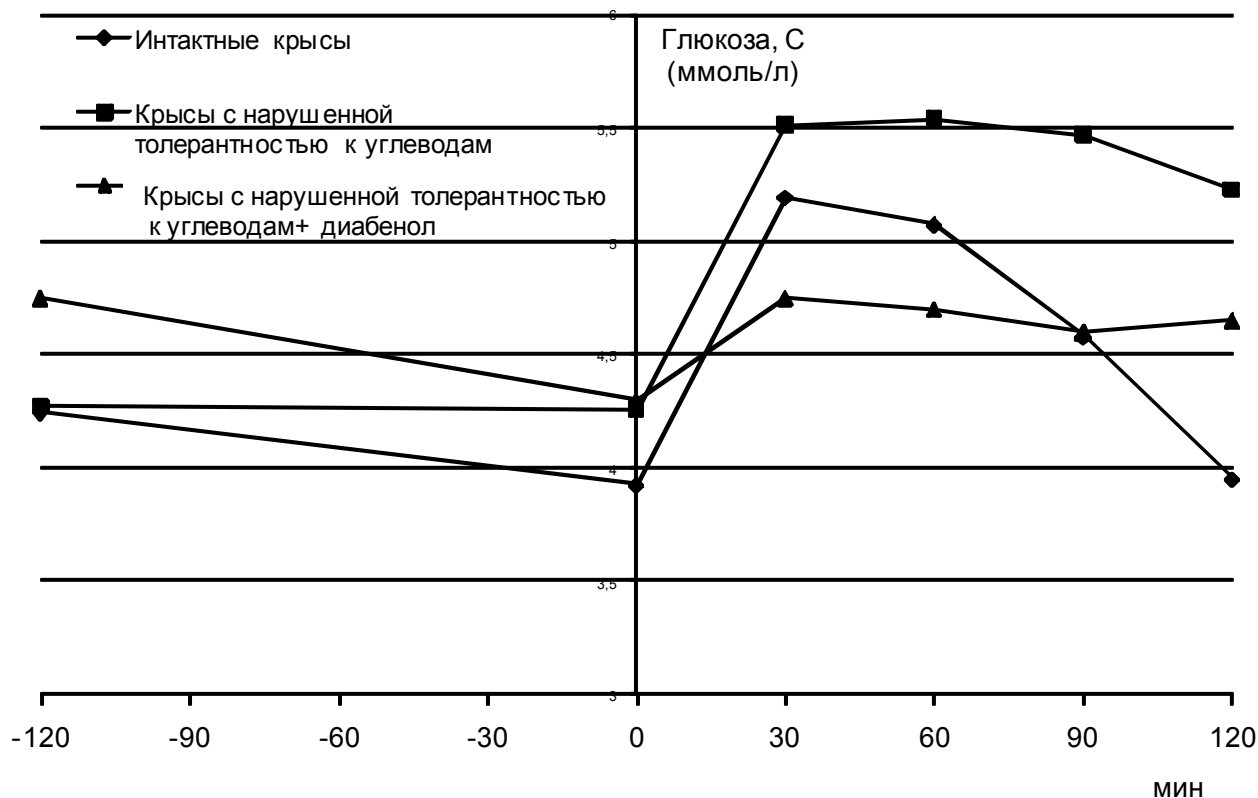
Таким образом, антигипергликемический эффект подтверждает присутствие у диабенола помимо панкреотропного действия, которое не может быть реализовано на данной экспериментальной модели, наличие экстрапанкреатических эффектов, реализуемых на рецепторном, либо пострецепторном уровнях.

### **5.1.3. Исследования на животных с экспериментальным ожирением**

Целью проведения этой серии экспериментов было изучение влияния диабенола на утилизацию глюкозы в периферические ткани, на экспериментальной модели алиментарного ожирения, исходя из постулата, что в клинической практике известны препараты, которые при курсовом введении крысам с ожирением увеличивают чувствительность тканей к инсулину и, как следствие этого, улучшают метаболизм глюкозы в мышечной ткани и на изолированных адипоцитах тучных крыс [Бессесен Д. Г., 2006; Ройтберг Г. Е., 2007]. Животных с ожирением, у которых диагностировали нарушение толерантности к углеводам и синдром инсулинрезистентности (по приведенным выше методикам), делили на две группы: одна из которых служила контролем, а животные другой группы получали диабенол. За изменениями уровня глюкозы наблюдали в течение двух часов до глюкозной нагрузки и двух часов после нее.

В результате эксперимента (рис 5.3.) было выявлено, что диабенол через два часа после введения оказывал статистически незначимое гипогликемическое действие (снижение уровня глюкозы до 10 %). Такая же по выраженности тенденция к снижению уровня глюкозы сохранилась и после проведения ПГТТ. Следует отметить, что антигипергликемический эффект, полученный для диабенола на протяжении всего эксперимента, был стабильным, без изменений в сторону уменьшения или увеличения. Достоверные отличия по сравнению с животными контрольной группы, наблюдались после

30-й мин перорально введенной глюкозы. Вместе с тем, несмотря на то, что на 120-й мин после углеводной нагрузки сахароснижающий эффект диабинола продолжал сохраняться, он потерял статистическую значимость.



**Рис. 5.3. Влияние диабенола (25 мг/кг, внутрижелудочно) на уровень глюкозы в крови крыс с нарушенной толерантностью к углеводам (животные с алиментарным ожирением) после пероральной нагрузки глюкозой (3 г/кг)**

Полученные результаты исследования позволяют предполагать, что при содержании глюкозы в пределах физиологической нормы, ее транспортные системы работают нормально, при повышенном содержании углеводов у животных, в анамнезе которых присутствует ожирение, транспортеры глюкозы не справляются со своими функциями. По-видимому, диабенол при подобных состояниях, связанных



с повышением уровня глюкозы в результате экзогенного введения углевода животным с ожирением, улучшает работу транспортных систем. После снижения концентрации глюкозы в крови до нормальных величин, воздействие препарата на транспортные системы углевода прекращается.

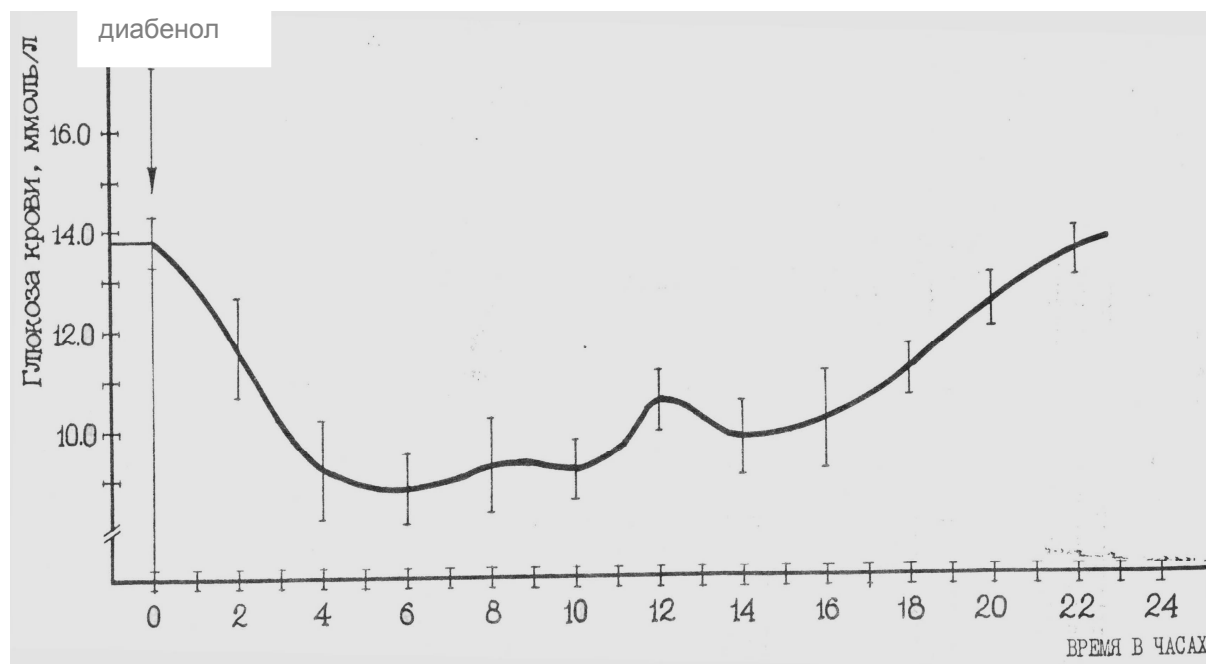
## **5.2. Исследование действия диабенола на животных с экспериментальным сахарным диабетом**

Для того чтобы подтвердить или опровергнуть предположение о том, что помимо экстрапанкреатических эффектов диабенол оказывает действие и на функциональное состояние инсулин-продуцирующего аппарата поджелудочной железы, были проведены исследования на животных с экспериментальным сахарным диабетом [Lenzen S., 2008; Орловский М.А., 2006]. При этом, было сочтено целесообразным использовать экспериментальные модели как острой инсулиновой недостаточности (нейтрализация инсулина введением антител к нему), так и хронической (аллоксановый диабет, животные после панкреат-эктомии).

Хронический диабет моделировали аллоксана гидратом (180 мг/кг, внутривентриально), который вводили крысам после предварительного 18-часового голодания. В опыт брали животных, у которых развивалась стойкая гипергликемия с содержанием глюкозы в крови выше 12 ммоль/л. Для изучения влияния диабенола на содержание глюкозы в крови крыс с аллоксановым сахарным диабетом, диабенол вводили в дозе 25 мг/кг, внутривентриально. В пробах крови, которые забирали из хвостовой вены крыс с интервалом в 2 часа до исчезновения антидиабетического эффекта, определяли концентрацию глюкозы ортотолуидиновым методом.

На первом этапе был определен период продолжительности действия диабенола у крыс с аллоксан-индуцированным СД. Было выявлено, что диабенол, через 2 часа после введения, снижал содержание

глюкозы в плазме крови крыс на 17,1 %, к 4-му часу наблюдений эта величина составила 35,2 %, оставаясь на этом уровне до 6-го часа эксперимента. В последующем временном промежутке отмечалось медленное повышение концентрации глюкозы в крови опытных животных, и к 22-м часам после начала эксперимента концентрация сахара в плазме крови экспериментальных животных достигла исходных величин (рис. 5.4).



**Рис. 5.4. Влияние диабенола (25 мг/кг, внутрижелудочно) на содержание глюкозы в крови крыс с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом**

Таким образом, диабенол оказывал выраженное антидиабетогенное действие. Максимальное снижение глюкозы на 37,6 % под влиянием изучаемого препарата наблюдалось на 6-м часу эксперимента. По полученным результатам можно констатировать, что длительность антидиабетического действия диабенола соответствует продолжительности сахароснижающего действия изучаемого препарата при проведении экспериментов на интактных животных.

Так как диабенол в дозе 25 мг/кг снижал содержание глюкозы в крови животных с экспериментальным диабетом в большей степени, чем у интактных животных, его антидиабетогенное действие было исследовано также в диапазоне доз от 2,5 до 25 мг/кг. Как показали результаты исследования, диабенол в дозе 5 мг/кг снижал содержание глюкозы в крови крыс с аллоксан-индуцированным СД практически в такой же степени, как и у интактных животных при введении в дозе 25 мг/кг. По этой причине, при дальнейших исследованиях, связанных с длительным применением данного вещества, а именно при исследовании хронической токсичности, кумулятивных свойств и т.д., действие диабенола исследовали в диапазоне доз от 5 мг/кг до 250 мг/кг.

### **5.3. Влияние диабенола на животных с острой инсулиновой недостаточностью**

Острую инсулиновую недостаточность вызывали у сытых кроликов внутривенным введением 3 мл антиинсулиновой сыворотки морских свинок (инсулин-нейтрализующая активность АИС 0,8-2 ЕД/мл), полученную по методу Mofonej P.J. (1955). Для исследования влияния диабенола на глюкозу крови кроликов с острой инсулиновой недостаточностью опытной группе животных препарат вводили в дозе 25 мг/кг перорально. Через час контрольной и опытной группам кроликов была введена антиинсулиновая сыворотка морских свинок. Пробы крови забирали через 2 и 4 часа после введения исследуемого соединения.

В результате эксперимента было выявлено, что содержание глюкозы в крови контрольных животных повысилось с 5,8 ммоль/л до 17,2 ммоль/л, опытных – с 6,5 ммоль/л до 17,8 ммоль/л через час после введения антиинсулиновой сыворотки (что соответствовало 2-м часам после начала эксперимента). К 4-му часу экспери-

мента концентрация глюкозы в контрольной группе кроликов снизилась на 22,4 %, а в группе опытных животных на 33,8 % относительно показателей 2-го часа эксперимента, и была повышена на 131,5 % (контрольная группа) и 81,7 % (опытная группа) относительно исходного уровня.

Таким образом, диабенол оказывал гипогликемическое действие в опытах на кроликах с острой инсулиновой недостаточностью, по-видимому, препятствуя связыванию инсулина с антителами или освобождая его из комплекса с ними.

#### **5.4. Влияние диабенола на сахароснижающее действие экзогенно введенного инсулина**

В эксперименте использовали панкреатэктомированных по схеме В.А. Houssay (1960) собак, массой 8,6–11,5 кг. Удаление поджелудочной железы проводили под гексеналовым наркозом (50 мг/кг, внутривенно) в асептических условиях. Исследование проводили на 7-й день после операции, когда концентрация глюкозы в крови собак достигла 23–26 ммоль/л. К этому времени у животных развиваются клинические признаки, характерные для тяжелой формы диабета, основной причиной которого является дефицит инсулина. Влияние диабенола на сахароснижающий эффект инсулина проводили в три этапа:

1. Изучали влияние диабенола на глюкозу крови у панкреатэктомированных собак. Исследуемый препарат вводили животным однократно внутривенно в дозе 5 мг/кг. Сахароснижающее действие диабенола изучали на протяжении 6 часов. Пробы крови забирали через каждый час.

2. Изучали сахароснижающее действие инсулина для инъекций (Минмедпром, Московский эндокринный завод), введенного

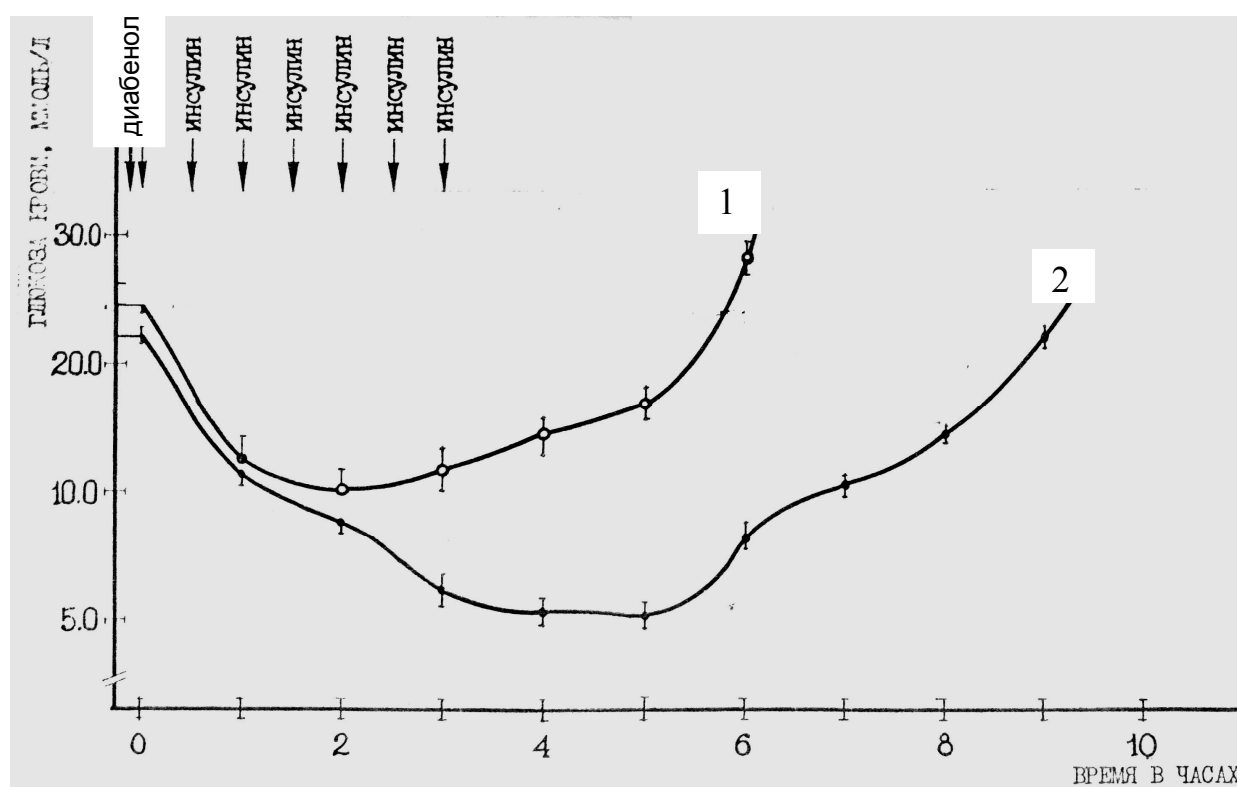
внутривенно в дозе 0,04 ЕД/кг в течение 3 часов с 30-минутными интервалами.

3. Изучали влияние инсулина в комплексе с диабенолом на содержание глюкозы крови. Диабенол в дозе 5 мг/кг вводили внутривенно с первой порцией инсулина. Наблюдение за содержанием глюкозы в крови опытных животных продолжали до исчезновения гипогликемического эффекта. Пробы крови отбирали через каждый час на протяжении всего эксперимента.

Обобщенные данные по влиянию инсулина и диабенола, введенных отдельно, и инсулина, введенного в комплексе с диабенолом, на концентрацию глюкозы в крови собак с панкреатэктомией приведены на рисунке 5.5. В результате исследования было выявлено, что диабенол не влиял на количественный показатель глюкозы в крови у собак с удаленной поджелудочной железой. Поскольку изменения концентрации глюкозы колебались в пределах 2,7–4,6 % и были статистически не достоверны, по-видимому, их следует рассматривать как физиологические колебания, а не как следствие фармакодинамического эффекта изучаемого препарата. По-другому ситуация развивалась после введения инсулина собакам с панкреатэктомией. В частности, через час после введения инсулина содержание глюкозы в плазме крови экспериментальных животных достоверно понизилось на 23,1 % и продолжало нарастать; через 2 часа, после введения инсулина, гипогликемический эффект достиг максимальных значений (16,6 ммоль/л вместо исходных 23,2 ммоль/л). К 5-му часу наблюдений концентрация глюкозы в плазме крови достигла исходного уровня, а через 6 часов был зарегистрирован рост уровня глюкозы, что, вероятно, связано с прекращением сахароснижающего действия инсулина.

При совместном введении инсулина с диабенолом концентрация глюкозы в крови собак через час снизилась на 23,2 %, что соответствовало величине гипогликемического эффекта инсулина. Ко 2-му часу эксперимента наблюдалось усиление сахароснижающего действия

инсулина, которое к 3-му часу после введения стало статистически значимым, по сравнению с группой собак, получавших только инсулин. Максимальное сахароснижающее действие (46,1 %) комплекса диабенол+инсулин было зарегистрировано к 4-му часу эксперимента, достоверно (в 2,7 раза) превысив сахароснижающий эффект, который наблюдался в группе собак, получавших только инсулин. Далее концентрация глюкозы в крови начала повышаться и к 9-му часу эксперимента содержание глюкозы в крови достигло исходных значений этой группы.



**Рис. 5.5. Влияние инсулина (1), инсулина в комплексе с диабенолом (2) на содержание глюкозы в крови собак с панкреатэктомией**

Таким образом, снижение уровня глюкозы в крови собак с панкреатэктомией, получавших комплекс диабенол + инсулин, было более выраженным и длительным, чем в группе животных, получавших только инсулин, что, по-видимому, можно объяснить либо инак-

тивирующим действием изучаемого препарата на печеночную инсулиназу, либо его способностью тормозить связывание инсулина с белками плазмы или усилением действия на утилизацию глюкозы.

## **5.5. Заключение**

В исследованиях на животных с моделями инсулинорезистентности, экспериментального сахарного диабета, вызванного аллоксаном и при острой инсулиновой недостаточности, вызванной антиинсулиновой сывороткой, диабенол оказывал длительное гипогликемическое действие. Но в опытах на собаках с удаленной поджелудочной железой, эффект препарата отсутствовал. Однако при введении этим животным экзогенного инсулина, диабенол пролонгировал и усиливал его гипогликемическое действие. Исходя из этих данных, можно предположить сложный механизм антидиабетогенного действия диабенола: как панкреатотропное, так и экстрапанкреатотропное влияние.

## ГЛАВА 6

# ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА АНТИДИАБЕТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ДИАБЕНОЛА

*А. А. Спасов, Г. П. Дудченко,  
Н. И. Чепляева, К. В. Ленская*

---

При изучении механизма действия потенциальных антидиабетических соединений важным является исследование, в первую очередь, его центральных (панкреотропных – инсулиногенных влияний) и периферических (снижение глюкозотолерантности, повышение скорости утилизации углеводов инсулинозависимыми и инсулиннезависимыми органами и тканями, снижение образования углеводов печенью – скорость гликогенолиза, всасывание углеводов в кишечнике) механизмов действия. В частности, в отношении влияния изучаемого препарата на секрецию инсулина известно, что периферический уровень инсулина не всегда является достаточным отражением инсулиновой секреции, поскольку печень элиминирует 50–60 % поступающего в нее инсулина, и концентрация его даже натощак в крови воротной вены в 3 раза выше, чем в периферической крови. При резких же «всплесках» секреции инсулина (в ответ на введение глюкозы или аминокислот) градиент уровней инсулина «воротная вена – периферическая кровь» может повышаться до 10:1 [Федотов В.П., 1973; Дагаева Л.Н., 1978]. Кроме того, несмотря на пристальное внимание исследователей к проблеме СД, остаются недостаточно ясными многие механизмы его развития и особенности изменения морфологических структур в поджелудочной железе [E. Bertalli, 2005]. Поджелу-



дочные железы человека и крысы различаются по анатомическому строению, однако единый план гистологической организации железы у позвоночных животных и человека позволяет моделировать патологические процессы и изучать лекарственный патоморфоз [Т. Веер, 1998]. Для уточнения патогенеза СД, степени повреждения и регенерации  $\beta$ -эндокриноцитов необходимо учитывать не только степень функциональных нарушений, но и структурные изменения островкового аппарата поджелудочной железы. Многообразие пусковых механизмов СД значительно затрудняет выявление ранних структурных изменений в поджелудочной железе [Балаболкин М. И., 2005]. Так, для СД 1-го типа наиболее характерными изменениями являются выраженное повреждение инсулярного аппарата островков Лангерганса в виде дегрануляции  $\beta$ -клеток, уменьшения количества островков и их разрушение за счет деструкции и прогрессирующей убыли  $\beta$ -эндокриноцитов, а также наличие воспалительной инфильтрации – «инсулиты» [Севергина Э. С., 2002]. Однако изменения в островках Лангерганса могут представлять полиморфную картину: в некоторых островках воспалительная инфильтрация может отсутствовать, в других – определяются нормальные или гипертрофированные  $\beta$ -клетки. Наравне с неизменными островками могут встречаться панкреатические островки с выраженной лимфо-макрофа-гальной инфильтрацией (как правило, при манифестации СД). Гетерогенность повреждения эндокриноцитов обусловлена не только отсутствием начальной деструкции клеток в отдельных островках или отсутствием специфических реактивных Т-лимфоцитов, а также возможностью развития репаративной регенерации уже поврежденных панкреатических  $\beta$ -клеток [Туссо М., 2005]. Наравне с дегенеративно-дистрофическими и воспалительными изменениями в части  $\beta$ -эндокриноцитов определяются выраженные регенераторные изменения – гипертрофия, гиперплазия. Спустя несколько лет от манифестации заболевания, в поджелудочной железе отмечается практически полное отсутствие  $\beta$ -эндокриноцитов [Reed J. C., 2011].

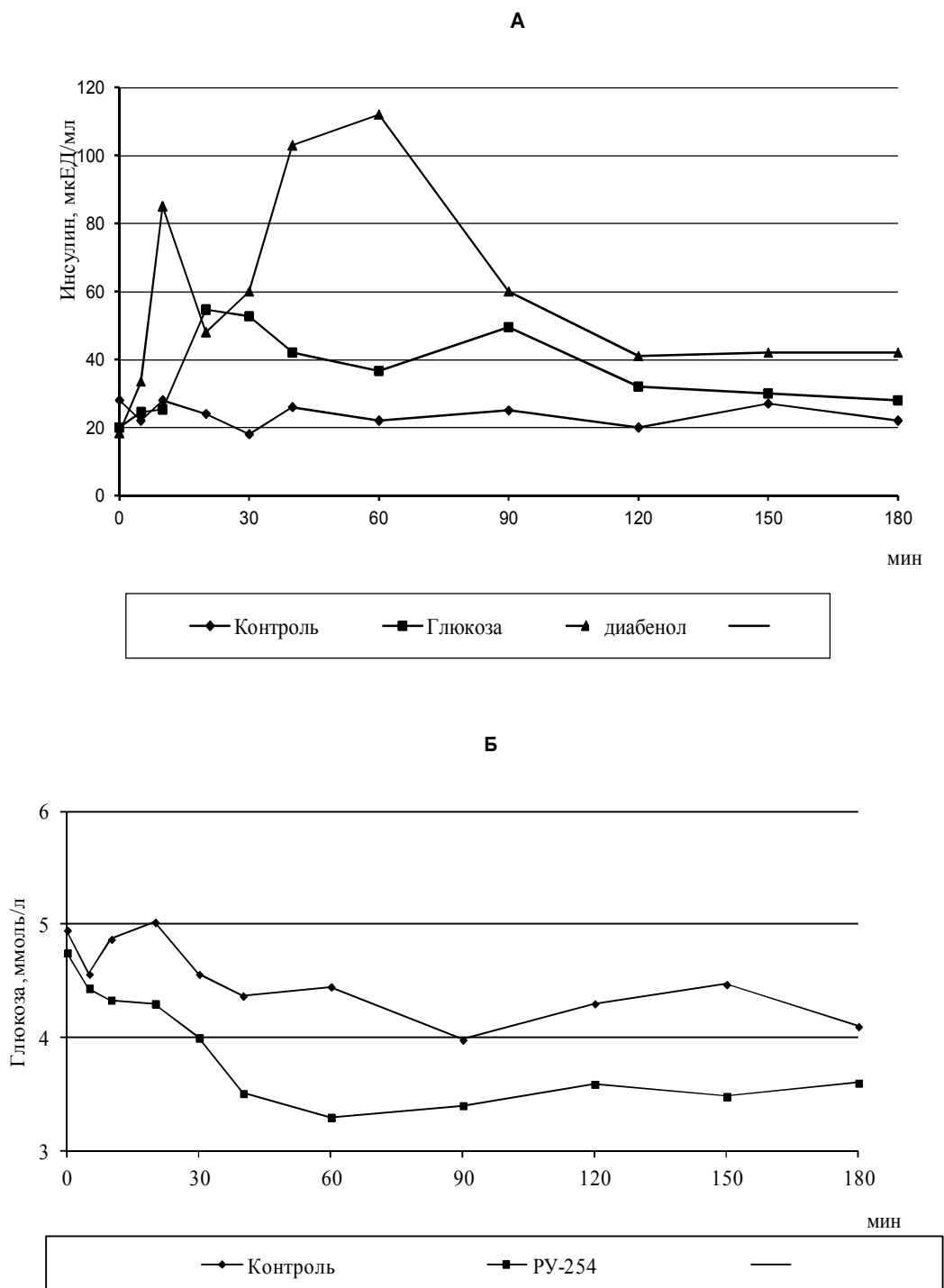
Таким образом, такую комплексную клинико-морфологическую оценку экспериментального материала можно расценивать как значимый метод исследования на всех стадиях развития СД.

### **6.1. Влияние соединения диабенол на секрецию инсулина**

Для установления центрального антидиабетогенного действия диабенола были проведены эксперименты по изучению влияния препарата на секрецию инсулина, которые были выполнены на наркотизированных кошках (нембутал, 50 мг/кг, внутривенно). У животных катетеризировали портальную вену, и в зависимости от целей эксперимента, одну или две бедренные вены, в которые, в соответствии с протоколом исследования, вводили исследуемые препараты или глюкозу (в виде водного 40 % раствора) из расчета 1 г/кг/1мл/мин. Забор проб крови для определения инсулина и глюкозы проводили из портальной вены в течение 3 часов: в 1-й час с 10 минутными интервалами, в последующие 2 часа – через каждые 30 минут. Концентрацию инсулина определяли иммуноферментным методом, используя стандартные наборы «Boehringer» (Германия).

Колебания базального уровня инсулина, наблюдаемые на протяжении трех часов эксперимента, находились в пределах физиологической нормы (рис. 6.2А). Диабенол достоверно увеличивал концентрацию инсулина в крови кошек более чем в 4 раза по сравнению с исходным его содержанием (рис. 6.1А), начиная с 10-й минуты эксперимента. Этот эффект сохранялся до 60-й минуты наблюдения, составив, в среднем, 80,7 мкЕД/мл, что соответствовало по абсолютной величине содержанию гормона при первом отборе проб. Между 60–90-й минутами исследования концентрация инсулина понизилась в 2 раза, а в последующие 30 минут его содержание уменьшилось еще на 33,3%. К 120-й минуте концентрация гормона в крови кошек равнялась исходным значениям. В отношении концентрации глюкозы в плазме крови (рис. 6.1Б) стоит отметить, что уже через 20 мин после поступления

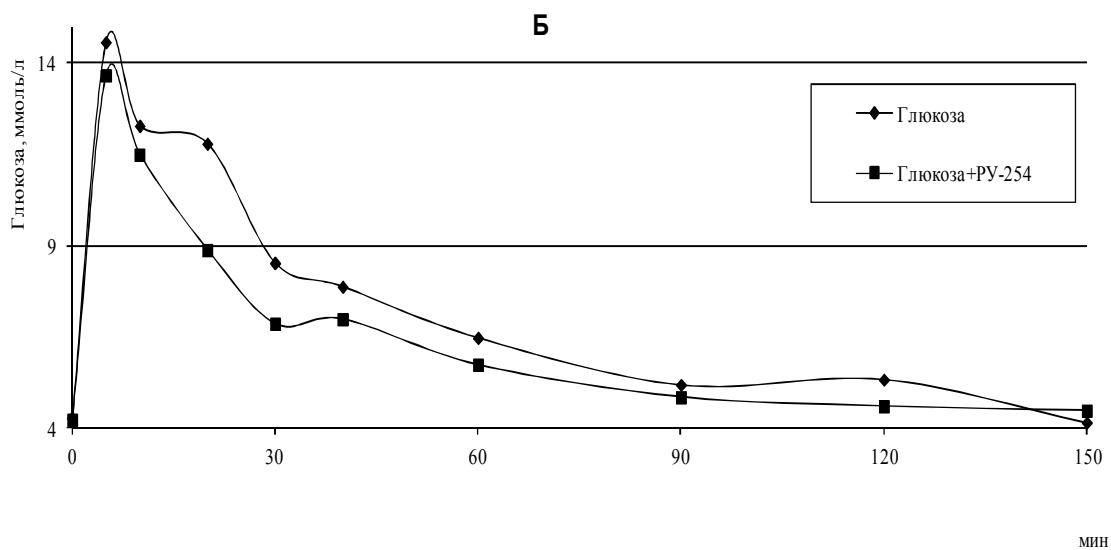
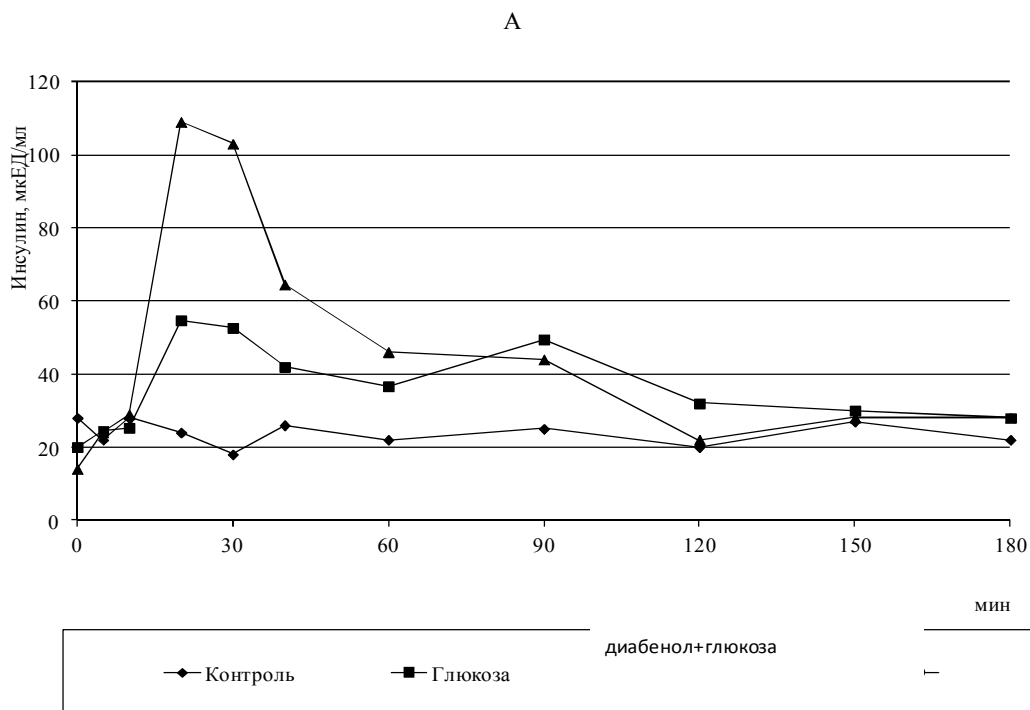
диабенола в периферический кровоток ее количество снижалось, оставаясь на стабильно пониженном уровне в течение всего эксперимента.



**Рис. 6.1. Влияние диабенола (10 мг/кг) при внутривенном введении на уровень инсулина (А) и глюкозы (Б) в крови кошек**

Секреция инсулина в ответ на острую однократную стимуляцию глюкозой носила двухфазный характер (рис. 6.2А), что согласуется с данными литературы [Генес С.Г., 1980; Вуме М.М., 1996]. Первый пик соответствовал 1-й (ранней) фазе секреции инсулина, 2-й пик – поздней фазе секреции гормона в ответ на смешанную пищу. На 10–15-й минутах эксперимента наблюдалась максимальная концентрация гормона, зарегистрированная на протяжении всего эксперимента (55 мкЕД/мл по сравнению с 20 мкЕД/мл исходного его уровня). Второй пик был менее выражен: составил в среднем 44 мкЕД/мл и приходился на 90-ю минуту эксперимента. Между 120–180-й минутами эксперимента повышение уровня инсулина, в ответ на внутривенное введение глюкозы, было статистически не достоверно по сравнению с исходными значениями концентрации гормона. Максимальные концентрации глюкозы были определены на 5-й минуте после начала исследования (14,5 ммоль/л) после чего ее уровень в крови постепенно снижался, достигая исходных величин между 2-м и 3-м часом (рис. 6.2Б).

Диабенол, введенный вместе с глюкозой, более чем в 2 раза, по сравнению с отдельно введенным углеводом, увеличивал концентрацию инсулина в крови экспериментальных животных в 1-ю фазу секреции инсулина (рис. 6.2А). После 40-й минуты исследования прирост сахаропонижающего гормона в группе животных, получавших исследуемое вещество в комплексе с глюкозой, снизилось на 40,8 % относительно максимальных его значений у этих животных, оставаясь повышенным относительно контрольных животных. На 90-й минуте эксперимента стимулирующие секрецию инсулина эффекты глюкозы и ее комплекса с диабенолом не отличались между собой, а после 120-й минуты наблюдений концентрация гормона в обеих группах приблизилась к исходным величинам (рис. 6.2А). Утилизация глюкозы периферическими тканями под действием диабенола улучшалась, что подтверждается уменьшением площади под кинетической кривой, отражающей исчезновение из кровяного русла глюкозы, введенной в комбинации с исследуемым препаратом (рис. 6.2Б).



**Рис. 6.2. Влияние диабенола (10 мг/кг, в/в), введенного совместно с глюкозой (1 г/кг), на уровень инсулина (А) и глюкозы (Б) в крови кошек**

Таким образом, анализ результатов проведенных исследований позволяет сделать вывод, что секреция инсулина из  $\beta$ -клеток поджелудочной железы под влиянием соединения диабенол не является глюкозозависимым процессом. Секреция гормона под действием исследуемого вещества носит двухфазный характер. Это позволяет предполагать, принимая во внимание результаты серии по совместному введению соединения с глюкозой, что вещество диабенол будет влиять на кинетику секреции гормона, нарушенную у больных инсулиннезависимым сахарным диабетом, нормализуя физиологический профиль гормона.

## **6.2. Влияние диабенола на утилизацию глюкозы периферическими тканями**

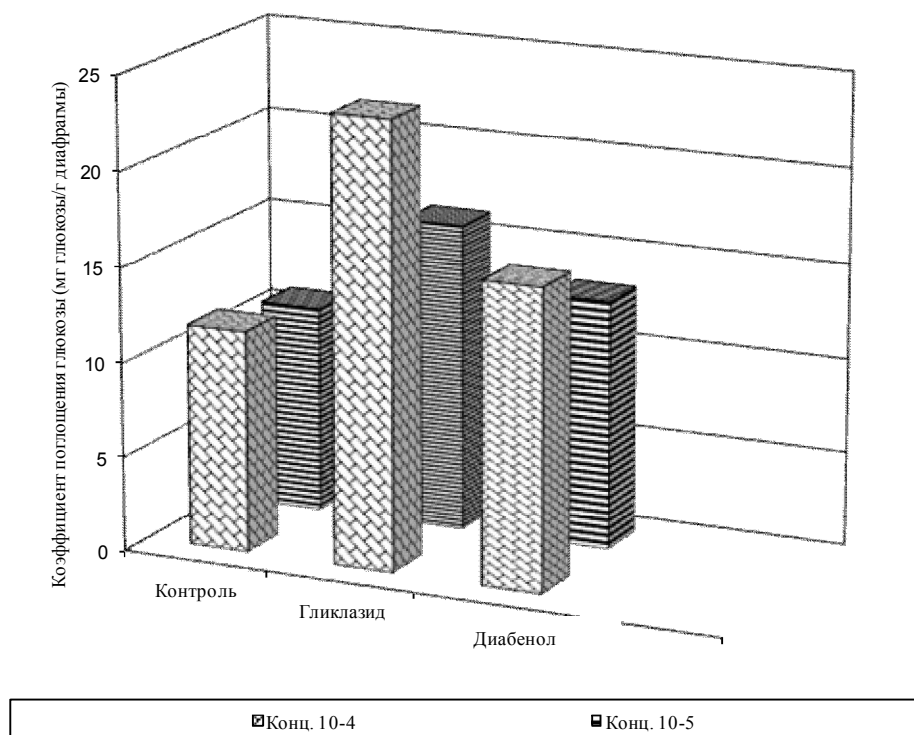
Внепанкреатические эффекты некоторых групп сахароснижающих препаратов могут быть связаны с их способностью замедлять всасывание глюкозы и повышать скорость ее метаболизма в кишечнике, связанную с ингибированием энергозависимого транспорта глюкозы [Т. Fushiki, 1999]. Например, ингибиторы  $\alpha$ -глюкозидаз препятствуют расщеплению олигополисахаридов до моносахаридов путем подавления активности сахаролитических ферментов слизистой тонкого кишечника, замедляя процессы всасывания углеводов в кишечнике и препятствуя послепрандиальному повышению уровня глюкозы [И.И. Дедов, 2008]. Для изучения веществ с такого рода активностью предлагается проведение эксперимента по изучению влияния диабенола на утилизацию глюкозы периферическими тканями. Для этого при изучении способности гипогликемического вещества усиливать поглощение глюкозы мышечной тканью использовали крыс, голодавших в течение 14 часов. После декапитации их диафрагмы промывали на льду в буферном растворе, просушивали фильтром и разрезали на две половинки, одну из которых помещали в контрольную кювету, вторую – в опытную. После чего в буферную среду, представляющую собой раствор Кребса-Рингера с рН 7,4, со-

держанием глюкозы 11,1 ммоль/л и инсулина 0,05 ЕД/мл, Исследуемые вещества добавляли в концентрациях  $1 \times 10^{-4}$  и  $1 \times 10^{-5}$  г/мл. Контрольные пробы содержали физиологический раствор. Исследуемые образцы инкубировали в термостате при  $+37$  °С на протяжении 2 часов, в пробах определяли ферментативным глюкозооксидазным методом остаточное количество глюкозы, после чего вычисляли коэффициент поглощения глюкозы по формуле: мг глюкозы/г диафрагмы. В качестве препарата сравнения, в серии экспериментов по изучению влияния исследуемых веществ на утилизацию глюкозы изолированной крысиной диафрагмой в присутствии инсулина, использовали субстанцию гликлазида («Сервье», Франция).

Полученные результаты исследования выглядели следующим образом: через 2 часа после инкубации диафрагмы в растворе Кребса-Рингера, с содержанием глюкозы 11 ммоль/л, ее концентрация в инкубационной среде снизилась в среднем на 7 %. После инкубации, с таким же содержанием глюкозы в растворе буфера, но в присутствии инсулина, утилизация глюкозы мышечной тканью возросла в 3 раза, а остаточная концентрация глюкозы определялась в различных сериях в пределах от 6,72–7,9 ммоль/л, что соответствовало ее снижению на 28,2–39,1 %. Добавление в пробы диабенола или препарата сравнения гликлазида, в изучаемых концентрациях, приводило к улучшению утилизации глюкозы, при этом поглощение глюкозы мышечной тканью носило дозозависимый характер – в среднем, на 35 % больше, относительно контроля (буферный раствор с глюкозой и инсулином), уменьшалось остаточное содержание глюкозы в пробах.

Серию исследования инсулиноподобных эффектов проводили в тех же условиях, что и в предыдущей серии экспериментов, за исключением добавления в буферные смеси раствора инсулина. Препараты исследовали в концентрации ( $10^{-4}$ – $10^{-5}$  г/мл), для которой был показан максимальный стимулирующий эффект на утилизацию глюкозы мышечной тканью у интактных животных в присутствии инсулина (рис. 6.3).

Полученные результаты свидетельствуют об экстрапанкреатических эффектах в механизме гипогликемизирующего действия диабенола и дают основания считать, что его периферическое гипогликемическое действие зависит от присутствия инсулина, и связано (на уровне тканей) именно со стимулирующим влиянием на действие гормона.

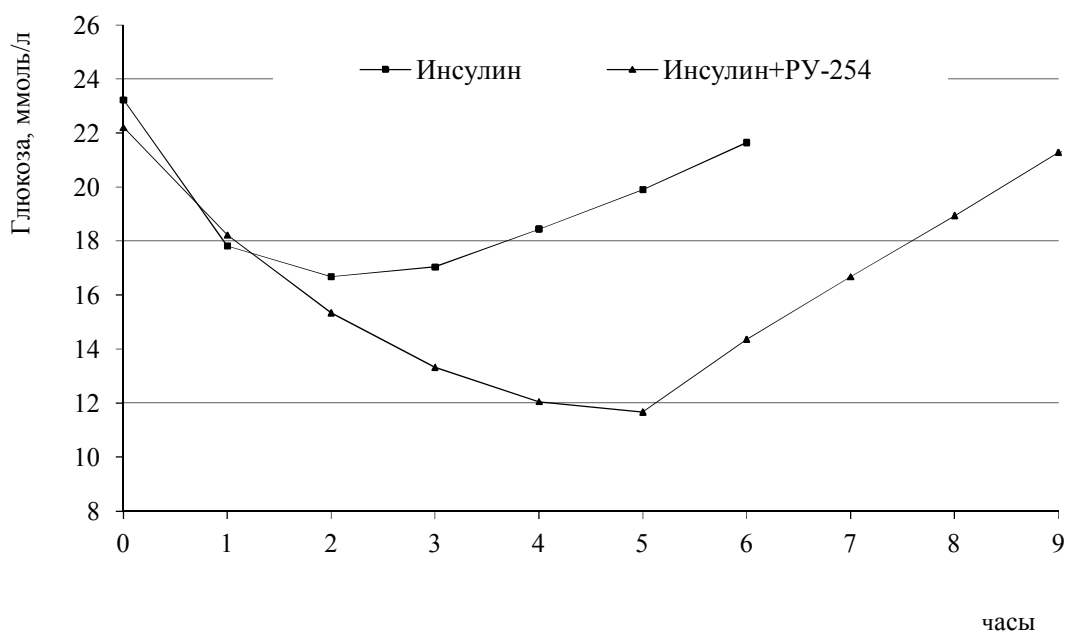


**Рис. 6.3. Влияние гликлазида, диабенола в концентрациях  $10^{-4}$  г/мл,  $10^{-5}$  г/мл на поглощение глюкозы изолированной диафрагмой крыс в присутствии инсулина (0,05 ЕД/мл)**

### **6.3. Действие диабенола на сахароснижающую активность инсулина**

Обобщенные данные по влиянию инсулина, введенного отдельно, и в комплексе с диабенолом на концентрацию глюкозы в крови собак с панкреатэктомией представлены на рисунке 6.4.





**Рис. 6.4. Влияние инсулина (0,4 ЕД/кг в течение 3 часов внутривенно), диабенола ( РУ-254 10 мг/кг внутривенно) при его комбинированном применении с инсулином (0,4 ЕД/кг в течение 3 часов внутривенно) на уровень глюкозы в крови собак с панкреатэктомией**

Через час после введения инсулин достоверно снизил содержание глюкозы в крови в среднем на 23,1 % ( $p < 0,05$ ). Гипогликемический эффект продолжал нарастать, и через 2 часа был максимально выражен, содержание глюкозы в крови снизилось на 28,1 % ( $p < 0,05$ ), что в абсолютных цифрах соответствовало 16,6 ммоль/л вместо 23,2 ммоль/л исходного содержания. На 3-м часу эксперимента у 3 из 5 собак глюкоза в крови удерживалась на этом уровне, однако наметилась тенденция к ее стабилизации. Между 5-м и 6-м часом эксперимента концентрация глюкозы в крови достигла исходного значения, а через шесть часов у 3 собак даже несколько превысила концентрацию глюкозы, которая отмечалась до начала эксперимента. При совместном введении инсулина с диабенолом содержание глюкозы в крови через час снизилось на 23,1 %, что соответствовало гипогликемическому эффекту инсулина. Ко 2-му часу эксперимента наблюдалось усиление сахароснижающего дей-

ствия инсулина, которое к 3-му часу после введения стало статистически значимым. Максимальное снижение глюкозы на 46 % ( $P < 0,05$ ) отмечалось к 4–5 часу наблюдения.

Гипогликемическое действие инсулина, введенного в комплексе с диабенолом, в 2,7 раза превысило гипогликемический эффект, который отмечался при введении одного инсулина. Через шесть часов концентрация глюкозы в крови начала повышаться и только к 9-му часу эксперимента содержание глюкозы в крови животных достигло исходного уровня.

#### **6.4. Действие диабенола на некоторые показатели углеводного обмена**

При изучении влияния антидиабетических препаратов на процессы обмена веществ, контролируемые инсулином и известные под названием «инсулиновых эффектов» можно получить дополнительные сведения, которые помогут высказать предположение об их возможном механизме сахароснижающего действия. В связи с этим было изучено влияние диабенола на содержание гликогена, скорость гликолиза и гликогенолиза в инсулинзависимых (печень, мышцы) и инсулиннезависимых (почки) органах и тканях животных с экспериментальным диабетом

Аллоксановый диабет вызывали у крыс самцов массой 140–200 г. Крысам, предварительно лишенным пищи в течение 18 ч без ограничения в воде, вводили однократно аллоксангидрат (Chemapol, Чехия) внутривентриально в дозе 180 мг/кг. На 2–3 день после введения аллоксана у крыс развивалась гипергликемия и изменялось их состояние. Животные были вялыми, малоподвижными, появилась жажда, полиурия, сухость слизистых оболочек. Через неделю после начала заболевания у животных отмечалась потеря массы тела. В опыт брали животных, у которых развивалась стойкая гипергликемия с содержанием глюкозы в крови выше 12 ммоль/л.

Опытной группе животных вводили диабенол в дозе 25 мг/кг внутривенно однократно. Контрольным крысам вводили растворитель – физиологический раствор. Через 4 часа, после введения изучаемого соединения, опытную и контрольную группы животных забивали под эфирным наркозом. Для биохимических исследований забирали кровь, органы (печень, почки) и ткани (поперечно-полосатые мышцы – квадрицепс). В сыворотке определяли содержание аминного азота и молочной кислоты. Органы замораживали углекислым газом (-78 °С), а затем определяли в них содержание гликогена, скорость гликолиза и гликогенолиза.

Гликоген определяли в инсулинзависимых (печень, мышцы) и инсулиннезависимых (почки) органах и тканях по методу J. Horeysi (1967).

Скорость гликолиза и гликогенолиза определяли по методике, описанной Ф. З. Меерсоном и Н. П. Ларионовым (1969), оценивая ее по конечному продукту – лактату. Гомогенаты готовили из инсулинзависимых (печень, мышцы) и инсулиннезависимых (почки) органов и тканей. С этой целью печень, мышцы и почки отмывали от крови в холодном (при 0 °С) физиологическом растворе, взвешивали, размельчали и гомогенизировали при охлаждении с экстракционным раствором (1:10) в стекло-тефлоновом гомогенизаторе в течение 1,5 мин. Экстракционный раствор – 0,44 М раствор манита готовили на 0,04 М раствора калий-фосфатного буфера рН 7,4 и прибавляли ЭДТА (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты) из расчета 0,1 мг/мл. После экстракции (60 минут при 5 °С) смесь центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 минут в центрифуге РС-6. Надосадочную жидкость использовали для проведения исследования скорости гликолиза и гликогенолиза. Инкубационная смесь содержала аденозинтрифосфат (АТФ)  $1 \cdot 10^{-3}$  М; никотинамид  $8 \cdot 10^{-3}$ ; никотинамид-аденин-динуклеотид (НАД)  $2 \cdot 10^{-4}$  М; хлорид магния ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )  $2 \cdot 10^{-3}$  М. Все указанные реактивы готовили на 0,04 М растворе калий-фосфатного буфера с рН 7,4.

Инкубацию проводили в аэробных условиях в течение 30 минут при температуре 37 °С. В качестве субстрата использовали глюкозу

и гликоген. Реакцию останавливали 1,2 М раствором хлорной кислоты. Белок осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут на центрифуге ОПН-3. В супернатанте определяли содержание молочной кислоты энзиматическим методом.

Скорость гликолиза и гликогенолиза оценивали по накоплению молочной кислоты за 1 мин инкубации и выражали в нмоль лактата на мг белка ткани [А.Е.Панин, 1978].

У контрольной группы животных с аллоксановым диабетом содержание гликогена в печени и мышцах было снижено на 26,9 % ( $p < 0.05$ ) и 58,7 % ( $p < 0.05$ ) соответственно по сравнению с его количеством в этих же органах и тканях интактных животных. Диабенол увеличивал содержание гликогена в печени на 20 % ( $p < 0.05$ ), а в мышцах на 75 % ( $p < 0.05$ ), при этом его количество в почках не изменилось (табл. 6.1.). Скорость гликолиза в печени и мышцах крыс с аллоксановым диабетом была снижена на 76,1 % и 34,6 % соответственно, а скорость гликогенолиза повышена в мышцах на 13,9 % по сравнению со скоростью гликолиза и гликогенолиза в этих же органах и тканях интактных животных. Под действием диабенола повышалась скорость гликолиза в печени на 187,3 %, а в мышцах – на 28,8 %. Скорость гликогенолиза, в этих же органах и тканях, снижалась на 35 % и 37,7 % соответственно, по сравнению с контрольной группой животных (табл. 6.1.). Изменений в почках отмечено не было. Таким образом, диабенол увеличивал содержание гликогена, скорость гликолиза и снижал скорость гликогенолиза в инсулинзависимых (печень, мышцы) и не влиял на эти показатели в инсулиннезависимых (почки) органах и тканях.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что под влиянием диабенола повышается содержание гликогена в печени и мышцах, увеличивается скорость гликолиза и уменьшается скорость гликогенолиза. С одной стороны это может быть связано с усилением секреции инсулина под влиянием диабенола  $\beta$ -клетками поджелудочной железы, оставшимися непораженными аллоксаном,

и, как следствие этого, развитие всех метаболических эффектов гормона. С другой стороны, выраженный гипогликемический эффект на аллоксановой модели диабета трудно объяснить только стимулирующим влиянием диабенола на секрецию инсулина.

Не исключено, что диабенол сенсibiliзирует клетки периферических тканей (печень, мышцы) к действию инсулина, ингибирует энзимы ответственные за гликогенолиз.

Таблица 6.1

**Влияние диабенола (в дозе 25 мг/кг, внутрь) на содержание гликогена, скорость гликолиза и гликогенолиза в инсулинзависимых (печень, мышца) и инсулиннезависимых (почки) органах и тканях крыс с аллоксановым диабетом (M ± m)**

Показатели	Интактные животные	Аллоксановый диабет	Аллоксановый диабет + диабенол 25 мг/кг (внутри)
<b>Печень</b>			
Гликоген, мг/кг	19,70 ± 0,72	15,1 ± 1,1*	18,4 ± 0,9**
V гликолиза, нмоль лактата·мин <sup>-1</sup> • мг белка <sup>-1</sup>	12,20 ± 0,69	2,94 ± 0,34*	8,39 ± 0,58**
V гликогенолиза, нмоль лактата·мин <sup>-1</sup> • мг белка <sup>-1</sup>	16,80 ± 1,45	17,40 ± 0,79	11,32 ± 0,84**
<b>Почки</b>			
Гликоген, мг/кг	0,85 ± 0,12	0,78 ± 0,10	0,62 ± 0,15
V гликолиза, нмоль лактата·мин <sup>-1</sup> • мг белка <sup>-1</sup>	8,50 ± 0,16	9,18 ± 0,58	9,72 ± 0,52
V гликогенолиза, нмоль лактата·мин <sup>-1</sup> • мг белка <sup>-1</sup>	11,40 ± 0,41	13,34 ± 1,84	13,80 ± 0,92
<b>Поперечно-полосатая мышца</b>			
Гликоген, мг/кг	6,50 ± 0,42	0,25 ± 0,59*	5,50 ± 0,62**
V гликолиза, нмоль лактата·мин <sup>-1</sup> • мг белка <sup>-1</sup>	49,70 ± 2,79	32,53 ± 1,80*	41,90 ± 1,9*
V гликогенолиза, нмоль лактата·мин <sup>-1</sup> • мг белка <sup>-1</sup>	166,50 ± 6,73	189,7 ± 6,8	118,2 ± 6,5**

\*Данные достоверны относительно группы интактных животных ( $p < 0,05$ );

\*\*данные достоверны относительно группы животных с аллоксановым диабетом ( $p < 0,05$ ).

## **6.5. Влияние диабенола на активность дипептидил пептидазы 4 (ДПП-4) при стрептозотоциновом сахарном диабете**

Одними из эндогенных регуляторов секреции инсулина являются гастроинтестинальные гормоны (инкретины). Эти гормоны синтезируются в энтероэндокринных клетках желудочно-кишечного тракта и выделяются в ответ на прием пищи и представлены глюкагоноподобным полипептидом-1 (ГПП-1) и гастроингибирующим полипептидом (ГИП). Важнейшим физиологическим эффектом инкретинов является потенцирование глюкозостимулированной секреции инсулина. Помимо инсулинотропного действия, ГПП-1 участвует в регуляции процессов регенерации и неогенеза бета-клеток. Период циркуляции эндогенных или экзогенных инкретинов в крови чрезвычайно мал в связи с быстрой инактивацией под влиянием фермента дипептидил, пептидаза типа 4 (ДПП-4), отвечающего за начальный распад ГПП-1 и ГИП [Spasov A.A., 2014]. Вследствие этого фермент является мишенью для поиска и создания препаратов – ингибиторов ДПП-4.

Следует отметить, что рядом авторов [Золотов Н.Н., Креминская В.Н., 2013] была выявлена ДПП-4 ингибирующая активность у диабенола: ИК<sub>50</sub> составила (150,5 + 17,9) нМ и соединение уступало в 29 раз вилдаглиптину и в 6 раз – ситаглиптину. Таким образом, предположительный механизм действия данного вещества включает ингибирование ДПП-4 и модуляцию инсулиносекреторной функции поджелудочной железы.

Исходя из вышеизложенного, было изучено влияние препарата диабенол на ДПП-4 *in vivo* и *in vitro* при стрептозотоциновом экспериментальном диабете.

Для оценки ДПП-4 ингибиторной активности *in vitro* смешивали 10 мкл раствора исследуемого соединения в диапазоне концентрации с 50 мкл 0,1 М Трис-НСl буфера (рН 8,4) и 40 мкл плазмы человека. Анализируемую смесь преинкубировали при 37°C в течение 5 мин. После преинкубации добавляли 100 мкл 1 мМ субстрата реакции Гли-Про-*p*-нитроанилида (Sigma, США), полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Развитие желтого окрашивания из-за высвобождения 4-нитроанилина определяли при длине волны 405 нм, используя прибор для спектрофотометрического считывания планшетов (ELx800, BioТес, США) [Таран А.С., 2014]. В качестве препаратов сравнения были выбраны ситаглиптин (Sigma, США) и вилдаглиптин (Новатрис Фарма АГ, Швейцария), в концентрациях 1000-1 нМ, дипротин А (Sigma, США) в концентрациях 100-0,1 мкМ, диабенол («ООО След», Россия) в концентрациях 1-1000 мкМ. Величину ингибирования рассчитывали по следующей формуле: (контроль – тест/контроль) • 100 %. Значения ИК<sub>50</sub> подсчитывали, используя Graphit 4.0.15 (Erithacus Software, Ltd, UK).

Эксперименты проводили также *in vivo* на 70 половозрелых нелинейных белых крысах-самцах массой 250–300 г (ООО «Питомник РАМТН», Москва), содержащихся в условиях вивария с естественным световым режимом на полноценном рационе. Исследование проводили в соответствии с требованиями «Правил лабораторной практики», утвержденных приказом Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 №708н, с соблюдением положений «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях».

Гипогликемическое действие изучали на животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом. Моделировали диабет с использованием стрептозотоцина (Sigma, США) (45 мг/кг однократно внутривенно на цитратном буфере, рН = 4,5) [Спасов А.А., 2011]. Гипогликемическое действие диабенола изучали при ежедневном пероральном введении водного раствора животным в дозе 50

мг/кг в течение 28 дней. Уровень глюкозы в плазме крови оценивали с помощью набора «Глюкоза ФКД» (Россия). Динамику уровня глюкозы в плазме крови крыс оценивали еженедельно. Животных тестировали на толерантность к углеводам при пероральной нагрузке глюкозой (ч.д.а., «Экрос», Россия) в дозе 3 г/кг на 28 сутки курсового введения. За 12 ч до эксперимента животные подвергались пищевой депривации со свободным доступом к воде. За 2 ч до проведения теста опытным животным перорально вводили исследуемые препараты, крысам контрольной группы – дистиллированную воду в аналогичном объеме. Образцы крови для оценки гликемии забирали до введения препаратов, перед введением глюкозы, через 30 мин после введения глюкозы и далее в течение 2 ч с 30-минутными интервалами. Уровень глюкозы определяли в цельной крови вышеуказанным способом. Скорость утилизации глюкозы оценивали, исходя из степени снижения площади под кривой «содержание глюкозы – время» [Миронов А.Н., 2012].

Оценку активности ДПП-4 в плазме животных проводили по стандартному протоколу (Sigma) и выражали в нмоль *p*-нитроанилида, образовавшегося в результате реакции в мл реакционной смеси в минуту.

Результаты обрабатывали методами базисного статистического анализа на ПК с использованием программы Microsoft Office Excel (Microsoft, USA) и STATISTICA 6.0 (StatSoftInc, USA). Оценка нормальности распределения проводилась по критерию Шапиро-Уилка. Анализ параметров при нормальном распределении значений проводили с помощью критерия Стьюдента. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне  $p < 0,05$ .

При исследовании способности известных препаратов (вилдаглиптин, ситаглиптин, дипротин А) ингибировать ДПП-4 и гомологичные ферменты плазмы крови человека выявлено, что зависимость доза – эффект носила сигмовидный характер. Полученные данные показателей  $IK_{50}$  согласуются с результатами исследований, согласно кото-



рым она составляет для ситаглип-тина 19 нМ, вилдаглиптина – 62 нМ (табл. 6.2.) [ Thomas L.,2008].

Таблица 6.2

**ДПП-4 ингибирующая активность вилдаглиптина, ситаглиптина, дипротина А и диабенола**

Соединение	ИК50
Ситаглиптин	3,39–21,50 нМ
Вилдаглиптин	6,73–24,91 нМ
Дипротин А	6,06–30,03 мкМ
Диабенол	1,35–2,05 Мм

Дипротин А – трипептид (Phe-Pro-Phe) – одно из первых соединений, используемых в качестве ингибитора ДПП-4 в экспериментальных исследованиях, в данном исследовании по активности значительно уступало вилдаглиптину и ситаглиптину и ингибировало фермент в микромолярных концентрациях. Диабенол ( $IK_{50} = 1,67$  мМ) существенно уступал по способности ингибирования дипептидилпептидазы вилдаглиптину, ситаглиптину и дипротину А. Следует отметить, что соединение демонстрирует низкий уровень активности, что говорит о том, что ДПП-4 не является основной мишенью действия для диабенола.

В ходе курсового введения диабенола (50 мг/кг) крысам с СД уровень глюкозы в крови через неделю уменьшался на 34 %, по сравнению с данными гликемии крыс с СД контрольной группы, стойкое снижение сохранялось на протяжении всего эксперимента, достигнув минимальных величин к 28-дню введения препарата (снижение уровня глюкозы в крови на 47%, по сравнению с показателями животных с СД (табл. 6.3.).

При проведении теста оценки толерантности к глюкозе на 14-й день эксперимента у крыс со стрептозотоциновым эксперименталь-

ным диабетом отмечалось стойкое повышение уровня глюкозы в крови, которое достигало максимума к 90-й мин исследования (табл. 6.3.).

Концентрация глюкозы превышала значения у крыс группы интактного контроля практически в 3 раза во все временные промежутки наблюдений. Данные подтверждались достоверным увеличением площади под кривой “глюкоза – время” у животных с экспериментальным диабетом в 2,8 раза, по отношению к интактной группе, что, возможно, свидетельствует о нарушении всасывания глюкозы в кишечнике, снижении захвата глюкозы периферическими тканями и снижении секреции инсулина [Миронов А.Н., 2012]. Уровень гликемии в опытной группе животных, получавших диабенол (50 мг/кг), был ниже, чем в контрольной группе с СД во всех временных промежутках, кроме того выявлено уменьшение площади под кривой утилизации глюкозы в 1,7 раза по отношению к группе с СД без применения лекарственных веществ.

*Таблица 6.3*

**Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг) на уровень глюкозы (ммоль/л) крыс со стрептозотоциновым экспериментальным диабетом при пероральном тесте оценки толерантности к глюкозе (3 г/кг, 14 день) (M ± m)**

Группа животных	Исход	90 мин	120 мин	Площадь под кривой "глюкоза-время", у.е.
Интактные	3,91 ± 0,31	7,02 ± 0,15	5,70 ± 0,08	806,30 ± 145,37
Стрептозотоциновый диабет	14,05 ± 0,23	17,36 ± 0,37	15,8 ± 0,22	2089,64 ± 167,25*
Стрептозотоциновый диабет + диабенол	10,25 ± 1,73	11,48 ± 1,92	10,63 ± 0,78	1122,33 ± 232,33**

\*Достоверно по отношению к контролю ( $p < 0,05$ );

\*\*достоверно по отношению к группе с экспериментальным СД, критерий Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

На 28-й день исследования наблюдались изменения, аналогичные 14 дню исследования. Помимо этого, при экспериментальном стрептозотоциновом диабете активность ДПП-4 увеличивалась на 48 %, а курсовая терапия диабенолом в дозе 50 мг/кг не приводила к значимым изменениям данного показателя (табл. 6.4). Известно, что ситаглиптин в дозе 100 мг/кг у интактных животных и с экспериментальным диабетом снижал активность ДПП-4 на 17 % по отношению к контролю [Макаренко И.Е., 2015].

Таким образом, в ходе проведенного исследования выявлено, что диабенол в тест-системе *in vitro* проявляет низкую ДПП-4 ингибирующую активность, уступая препаратам сравнения вилдаглиптину, ситаглиптину, дипротину А.

Таблица 6.4

**Активность ДПП-4 в крови животных с экспериментальным стрептозотоциновым СД (курсовое введение диабенола, 28 дней) ( $M \pm m$ )**

Группа животных	Активность ДПП-4, нмоль/мл/мин
Интактные	$2,40 \pm 0,12$
Стрептозотоциновый диабет	$3,54 \pm 0,43^*$
Стрептозотоциновый диабет + диабенол	$3,38 \pm 0,28^*$

\*Данные статистически значимы по отношению к интактному контролю ( $p < 0,05$ ).

Однако при курсовом введении препарата при стрептозотоциновом СД диабенол не оказывал влияния на активность фермента в плазме крови, что вероятно связано с невозможностью достижения в крови необходимой концентрации препарата для развития ингиби-

рующего эффекта. Полученные экспериментальные данные при курсовом введении также свидетельствуют об отсутствии ДПП-4 ингибирующей активности и у возможных метаболитов диабенола.

### **6.6. Действие диабенола на всасывание углеводов в кишечнике**

Влияние диабенола на активность кишечных олигосахаридаз, которые обладают различной субстратной специфичностью, изучали методом углеводных нагрузок по типу сахарных кривых. В связи с этим субстраты подбирали в соответствии с ферментным спектром кишки подопытных животных [Уголев А.М., 1991,1992].

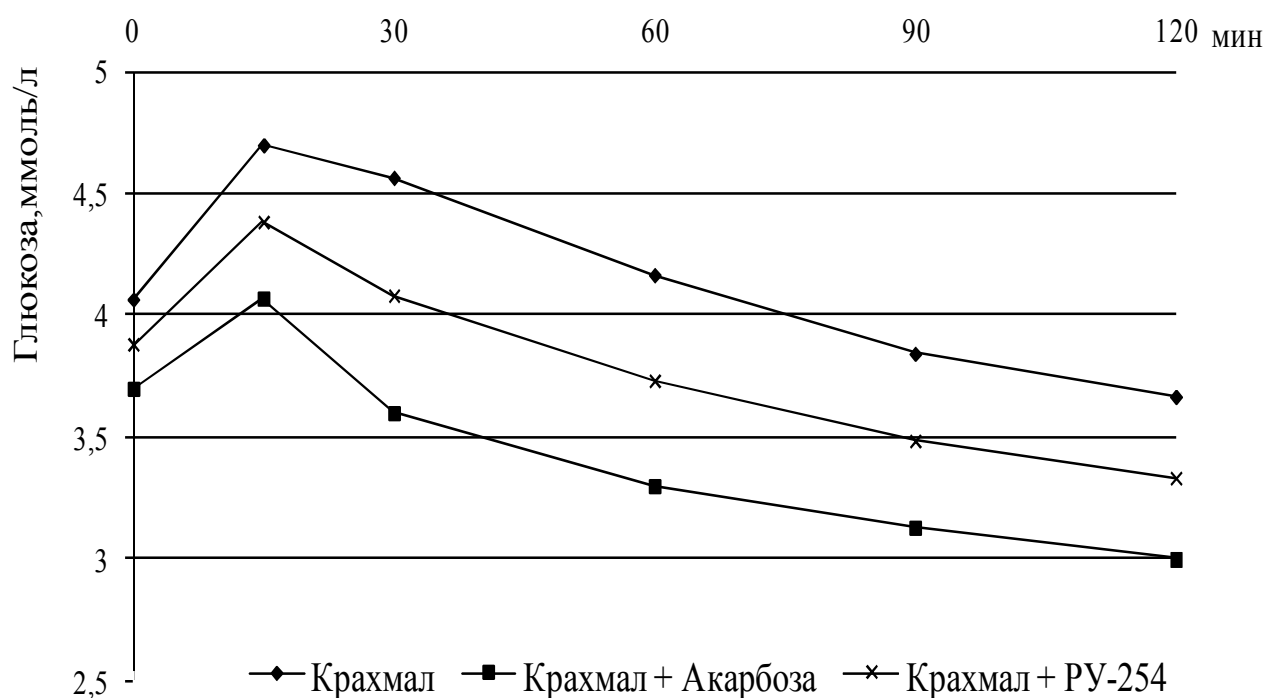
В качестве субстрата использовали крахмал (ГОСТ-101163-62) и сахарозу. Углеводы вводили животным из расчета 3 г/кг в виде 10–12%-го раствора (раствор крахмал предварительно разводили в холодной воде, затем, при помешивании, доводили до кипения и охлаждали до комнатной температуры).

Исследования проводили через 8–10 часов после последнего приема пищи. Об интенсивности расщепления углевода в кишечнике судили по уровню глюкозы крови. В качестве препарата сравнения использовали акарбозу («Глюкобай», «Байер») в дозе, применяемой при исследовании ее фармакологических свойств в опытах на животных [Puls W., et al., 1983].

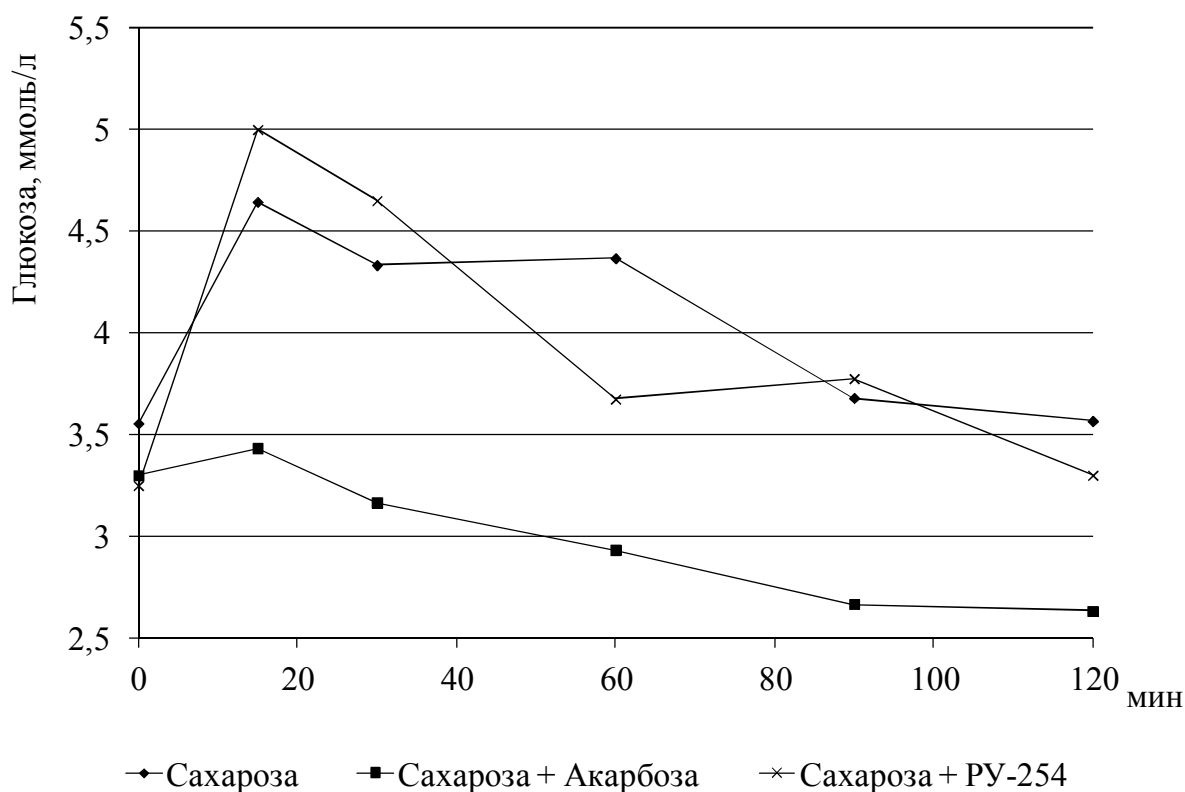
В ходе эксперимента были получены данные, свидетельствующие о том, что при введении акарбозы (5 мг/кг) одновременно с крахмалом (3 г/кг), обнаружены статистически значимые изменения в течение первого часа эксперимента в содержании глюкозы у опытных животных по сравнению с крысами контрольной группы, получавшими только полисахарид. При уровне глюкозы, практически равном ее исходному содержанию (90–120 мин эксперимента), достоверные различия между показателями животных контрольной и опытной групп отсутствовали. У крыс, получавших диабенол

(25 мг/кг) в комплексе с крахмалом, достоверных изменений относительно контрольных данных отмечено не было, несмотря на наметившуюся к 30-й минуте эксперимента, тенденцию к уменьшению уровня глюкозы в крови этих животных (рис. 6.5.).

При введении сахарозы (3 г/кг) животным контрольной группы достоверное увеличение глюкозы наблюдалось с 15-й по 60-ю минуту эксперимента. Прирост углевода в крови крыс составил в среднем за этот промежуток времени 25,2 % ( $p < 0,05$ ) от исходного ее содержания. Акарбоза достоверно снижала содержание глюкозы в крови животных через 15, 30 и 60 минут после ее совместного введения с сахарозой. Диабенол не влиял на всасывание сахарозы в кишечнике крыс (рис. 6.6.).



**Рис. 6.5. Влияние акарбозы (5 мг/кг), диабенола (РУ-254 25 мг/кг) при внутрижелудочном введении на уровень глюкозы в крови интактных крыс после пероральной нагрузки крахмалом (3 г/кг)**



**Рис. 6.6. Влияние акарбозы (5 мг/кг), диабенола (РУ-254 25 мг/кг) при внутрижелудочном введении на уровень глюкозы в крови интактных крыс после пероральной нагрузки сахарозой (3 г/кг)**

## 6.7. Заключение

Таким образом, по результатам проведенных исследований можно заключить, что диабенол оказывает панкреотропное и экстрапанкреатическое действие. При этом его влияние на поджелудочную железу связано с усилением секреции инсулина и зависит от присутствия глюкозы в плазме крови. Экстрапанкреатическое воздействие диабенола направлено на потенцирование эффектов инсулина, и, по-видимому, на улучшение работы транспортных систем глюкозы и замедление процессов деградации инсулина, что способствует улучшению утилизации глюкозы периферическими тканями, усилению и пролонгированию действия гипогликемизирующего гормона. Уста-

новлено, что диабенол стабилизирует содержание гликогена и снижает скорость гликогенолиза в инсулинзависимых органах (печень, поперечнополосатые мышцы) и практически не влияло на содержание гликогена и гликогенолиз в инсулиннезависимых тканях почек. То есть, в данном случае, метаболические эффекты диабенола, можно полагать, являются инсулинозависимыми.

Несмотря на то, что диабенол ингибирует *in vitro* ДПП-4, его эффект значительно уступает препаратам сравнения – вилдаглиптину, ситаглиптину и дипротину А и не выявляется при введении внутрь препарата крысам с аллоксановым диабетом. Диабенол практически не влиял на уровень глюкозы в крови животных при нагрузке сахарозой и крахмалом.

Исследования, описанные в главе 6.5, выполнены в Волгоградском государственном медицинском университете при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-25-00139).

**ГЛАВА 7**

**АНТИДИАБЕТОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ  
ДИАБЕНОЛА  
ПРИ СТРЕПТОЗОЦИН-  
НИКОТИНАМИДНОЙ  
ИНТОКСИКАЦИИ КРЫС**

*Г. Л. Снизур, А. А. Спасов,  
Н. И. Чепляева, К. В. Ленская*

---

Морфологический метод существенно дополняет клинко-биохимические данные и позволяет выявить не только грубые некротические и воспалительные изменения ткани поджелудочной железы, но и молекулярные аспекты апоптоза, регенерации и ультраструктурные изменения инсулоцитов в разные сроки развития диабета [Снизур Г. Л., 2010]. В следующей серии исследований были изучены особенности влияния диабенола на морфологию поджелудочной железы крыс.

Эксперименты выполнены на 150 половозрелых нелинейных белых крысах самцах (питомник ФГУ «НИИ ГТП» ФМБА России) массой от 280,0 до 300,0 г (табл. 7.1).

Животные содержались в стандартных условиях вивария кафедры фармакологии ВолгГМУ, на полнорационной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных (мышей и крыс) согласно ГОСТ Р50258 92. Все манипуляции с животными проводили с соблюдением международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997).



### Распределение животных по экспериментальным группам

Группы животных	Время наблюдения, сутки	Количество животных
Интактный контроль	3, 7, 21, 28	50
Стрептозотцин-никотинамид-индуцированный СД	3, 7, 21, 28	50
Стрептозотцин-никотинамид-индуцированный СД+диабенол 25 мг/кг, внутрь	3, 7, 21, 28	50

При проведении эксперимента, у лабораторных животных контролировали массу тела, объем потребляемой жидкости, а также определяли уровень глюкозы в моче, содержание гликозилированного гемоглобина и концентрацию в плазме крови глюкозы, инсулина и С-пептида.

Глюкоза определялась в крови, забираемой из хвостовой вены крыс, ферментативным способом, с использованием наборов «Глюкоза ФКД» (Россия) на спектрофотометре СФ-46 при  $\lambda=450$  нм в 10 мм кювете. Уровень кетоновых тел в моче определяли с использованием диагностических тест-полосок ФАН (Чехия). В эксперимент производился отбор животных с уровнем сахара крови не ниже 15 ммоль/л., то есть крысы с индуцированным сахарным диабетом.

Содержание гликозилированного гемоглобина (HbA1c) имеет прямую корреляцию с уровнем глюкозы в крови и является интегрированным показателем компенсации углеводного обмена на протяжении последних 60–90 дней [Балаболкин М. И., 2005]. Как правило, нормализация уровня HbA1c в крови происходит на 4-6 неделе после достижения нормального уровня глюкозы. Клинические исследования показали, что повышение концентрации HbA1c на 1 % связано с повышением среднего уровня глюкозы плазмы примерно на 2 ммоль/л [Gonen B. A., 1977; Koenig R. J., 1976]. Концентрацию гликозилированного гемоглобина определяли методом катион-обменной

хроматографии низкого давления со стандартными наборами («Фосфорб», Россия).

Определение содержания С-пептида в плазме крови позволяет оценить состояние функциональной активности  $\beta$ -клеток островкового аппарата поджелудочной железы, так как С-пептид и инсулин секретируются в эквимольных количествах. Для определения концентрации С-пептида в плазме крови осуществляли забор проб крови из брюшной аорты крыс после курсового введения лекарственных средств. Концентрацию С-пептида в плазме крови определяли на автоматическом иммуноферментном анализаторе «SUNRISE» фирмы TECAN (Австрия) с использованием наборов DRG Insulin Elisa Kit и DRG C-peptide Elisa Kit.

Стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный диабет моделировали стрептозотоцином («Sigma», США) (интраперитонеально – 65 мг/кг на цитратном буфере рН=4,5) с предварительным (за 15 минут) введением никотинамида (интраперитонеально – 230 мг/кг на 0,9 % растворе хлорида натрия) [Islam S., 2007]. Количественное определение глюкозы в крови проводили на 3, 7, 21, 28 сутки после введения цитотоксина. Наличие глюкозы в моче крыс всех экспериментальных групп оценивали на 7, 21, 28 сутки после введения стрептозотоцина. Определение массы тела и количества потребляемой пищи и воды производили исходно (за 7 суток до введения цитотоксина), а также на 7, 28 сутки после введения стрептозотоцина. На фоне развития стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного диабета осуществляли введение диабенола («ООО След», Россия) (интрагастрально, начиная с 7 суток после моделирования патологии, в течение 28 суток 1 раз в сутки по 25 мг/кг). Забор тканей для патогистологического исследования осуществляли на 3, 7, 21 и 28 сутки эксперимента.

Ткань поджелудочной железы получали путем выделения брыжейки 12-перстной и тонкой кишки с разделением на три фрагмента – кишечный, желудочный и селезеночный. Для визуализации поджелудочной железы брыжейку тонкого кишечника опускали в раствор

«GEWF» (500 мл абсолютного этанола, 170 мл дистиллированной воды, 80 мл 37 % формальдегида, 50 мл ледяной уксусной кислоты) на 30 секунд, затем фиксировали в 10 % растворе нейтрального забуференного формалина (рН 7,4) в течение 24 часов [Newell К. J., 2001]. На ротормом микротоме изготавливали срезы толщиной 5–6 мкм и монтировали их на предметные стекла. Для обзорных целей микропрепараты окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятым гистологическим методикам [Киясов А. П., 2001; Коржевский Д. Э., 2005].

Иммуногистохимическое исследование выполнено в лаборатории патоморфологии и иммуногистохимии Волгоградского медицинского научного центра. Для иммуногистохимического исследования материал фиксировали в течение 24 часов в 10 % растворе нейтрального забуференного формалина (рН 7,4). На ротормом микротоме изготавливали серийные срезы толщиной 5–6 мкм и монтировали их на предметные стекла, обработанные адгезивным покрытием (поли-L-лизин).

Для выявления эндокриноцитов  $\alpha$ - и  $\beta$ -клеток островков Лангерганса использовали первичные антитела к инсулину и глюкагону. Для изучения апоптоза и пролиферативной активности использовали первичные антитела к протеинам: каспаза 3, TRAIL (апоптоз индуцирующий лиганд фактора некроза опухоли), MDM2, Bcl 2, p53, Вах, PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток), Ki-67, NF- $\kappa$ B (ядерный фактор  $\kappa$ B), eNOS (эндотелиальная NO-синтаза) (табл. 7.2).

Иммуногистохимическое исследование проводили в соответствии с протоколами фирм-производителей антител с использованием систем детекции ABC (Novocastra, Великобритания), «UltraVision» (LabVision, Великобритания) и «EnVision» (DakoCytomation, Дания) и хромогеном – диаминобензидином, используя протокол высокотемпературной демаскировки антигенов в миниавтоклаве Pascal (DakoCytomation, Дания) или ферментной демаскировкой антигенов [Kumar G. L., 2009]. Достоверность полученных результатов контро-

лировали с помощью позитивных и негативных контролей антигенов, а также негативных контролей антител.

Таблица 7.2

### Первичные антитела, используемые при проведении ИГХ

Антитела	Клон	Производитель
Инсулин	Клон Ab-6 (INS04 + INS05)	LabVision, Великобритания
Глюкагон	Поликлональные	Novocastra, Великобритания
Каспаза 3	Rb-1197-P0	NeoMarkers, США
TRAIL	27B12	Novocastra, Великобритания
MDM2	1B10	Novocastra, Великобритания
Bcl 2	sc-7382	Santa Cruz Biotechnology, США
p53	Поликлональные	Dako Cytomation, Дания
Вах	Поликлональные	BD Biosciences Pharmingen, США
PCNA	PC10	Novocastra, Великобритания
Ki-67	MIB-1	Dako Cytomation, Дания

Характер иммуногистохимической реакции оценивали визуально, в баллах, с учетом интенсивности окраски (рис. 7.1), или определяли удельное количество позитивно окрашенных клеток стандартизированными методами морфометрии в иммуногистохимии с помощью системы анализа изображений [Петров С. В., 2004; Dabbs D. J. 2010].

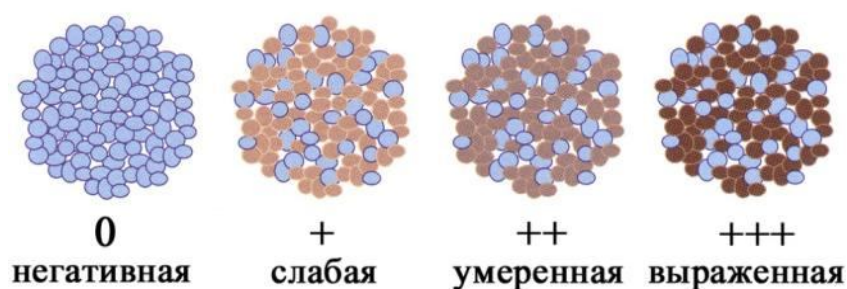


Рис. 7.1. Визуально-аналоговая шкала для оценки интенсивности иммуногистохимической реакции по Allred D. C. et al., (1998)

Для выявления олигонуклеосомальной фрагментации ДНК *in situ* В-эндокриноцитов панкреатических островков выполняли TUNEL-метод (Terminal deoxynucleotidated Transferase – mediated dUTP – biotin Nick – End Labeling - терминальное деоксиуридиновое нуклеотидное мечение «концов» с последующим проявлением меченых биотином диаминобензидином) [Петров С. В., 2004; Манских В. Н. 2004]. Депарафинизированные срезы промывали дистиллированной водой, проводили предварительную подготовку протеиназой К, затем промывали фосфатно-солевым буфером с Tween 20, блокировали пероксидазу инкубацией в 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, промывали фосфатно-солевым буфером с Tween 20. Осуществляли предварительную инкубацию с TdT во влажной камере. Останавливали реакцию промывкой в буферном растворе. Инкубировали со стрептавидин-HRP, промывали в буферном растворе. Визуализацию проводили хромогеном – диаминобензидином, докрашивали гематоксилином. Проводили подсчет TUNEL-позитивных эндокриноцитов от общего количества клеток панкреатических островков (%).

Фотопротоколирование микроскопических изменений производили с использованием комплекса из микроскопа «Axio Scope» (Carl Zeiss, Германия) и цифровой фотокамеры «Power Shot» (Canon, Япония). Морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной программы «Видео ТестМорфо-4» (Россия). Определяли объемную долю (ОД, %) островков по отношению к экзокринной части железы; площадь островков (S, мкм<sup>2</sup>), объемную долю эндокриноцитов α- и β по отношению к островкам (ОД, %), удельное количество β-клеток панкреатических островков по отношению к клеткам островков (%), а также площадь ядер эндокриноцитов В (S, мкм<sup>2</sup>). Определяли индекс апоптоза и пролиферации как отношение каспаза-3, TUNEL-, Ki-67- и PCNA-позитивных эндокриноцитов к общему количеству эндокриноцитов панкреатических островков(%).

Результаты экспериментов обрабатывались методами базисного статистического анализа на ПК с использованием программ «Видео

ТестМорфо-4», Excel Microsoft Office (Microsoft, USA) и STATISTICA 6.0 (Stat Soft Inc., USA). Анализ параметров при нормальном распределении значений проводили с помощью критерия Стьюдента, анализ непараметрических количественных признаков – с помощью критерия Манна-Уитни. Для сравнения качественных признаков использовали критерии  $\chi^2$  и Фишера. Значимыми считали различия, если вероятность ошибки  $p < 0,05$ .

### **7.1. Влияние диабенола на морфофункциональные особенности панкреатических островков при стрептозотоцин-никотинамидном диабете**

В группе крыс, получавших диабенол, в дозе 25 мг/кг (внутри ежедневно), отмечалось снижение содержания HbA1c в крови на 18,5 % по отношению к контрольной группе крыс с моделью стрептозотоцин-индуцированного диабета. В группе крыс, получавших диабенол, уровень С-пептида был выше на 7,7 % по сравнению с контрольной группой стрептозотоцин-индуцированного диабета. Таким образом, полученные данные подтверждают влияние диабенола на процессы секреции инсулина. В экспериментальной группе, получавшей диабенол, регистрировалось снижение потребления воды, по сравнению с группой стрептозотоцин-индуцированного диабета от 6,6 % на 7 сутки – до 25,2 % к концу эксперимента ( $p < 0,05$ ). В группе крыс, получавших диабенол, на 7 сутки эксперимента отмечалось снижение уровня сахара в крови на 10,3 % по отношению к исходным показателям этой группы. На 14-й день наблюдений диабенол уменьшал уровень глюкозы в крови крыс с стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным диабетом на 9,27 % с достоверным усилением величины антидиабетического действия к 21 суткам исследования (-18,6 %) (табл. 7.3).

При исследовании динамики изменения веса животных было выявлено, что к концу эксперимента все животные прибавили в весе, в том числе крысы получавшие диабенол. В ходе проведения эксперимента у крыс со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным диабетом спустя 7 суток после моделирования патологии регистрировалась полидипсия (потребление воды увеличилось в среднем в 4 раза по сравнению с интактными животными;  $p < 0,05$ ). В группе животных на фоне введения диабенола отмечалось уменьшение количества потребляемой воды к 28 суткам наблюдения (в среднем в 2 раза по отношению к исходному уровню (табл. 7.3).

В контрольной группе крыс с моделью стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного диабета на фоне введения диабенола на 7-е сутки наблюдения регистрировалась гипергликемия ( $7,3 \pm 0,18$  ммоль/л), которая сохранялась вплоть до 28 суток исследования ( $6,7 \pm 0,21$  ммоль/л). При этом кетоновые тела в моче крыс всех экспериментальных групп не обнаруживались, а колебания уровня глюкозы в моче были в пределах физиологической нормы (табл. 7.3).

На ранних сроках наблюдения (3-7 сутки эксперимента) при микроскопическом исследовании визуализировались умеренные признаки воспаления в единичных островках Лангерганса. Панкреатические островки имели округлую или неправильную форму и средние размеры  $11224,4 \pm 9179,1$  мкм<sup>2</sup>. Объемная доля по отношению к группе крыс с моделью стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного диабета без фармакологической коррекции незначительно увеличивалась и составляла  $6,5 \pm 1,5$  %, при этом не достигала пределов нормы. Количество эндокриноцитов  $\beta$  достоверно возрастало ( $58,2 \pm 2,3$  %), а занимаемая ими площадь, по сравнению с группой животных с экспериментальным диабетом, увеличивалась незначительно. Ядра В-клеток островков Лангерганса занимали площадь сопоставимую с контрольной группой (рис. 7.2).

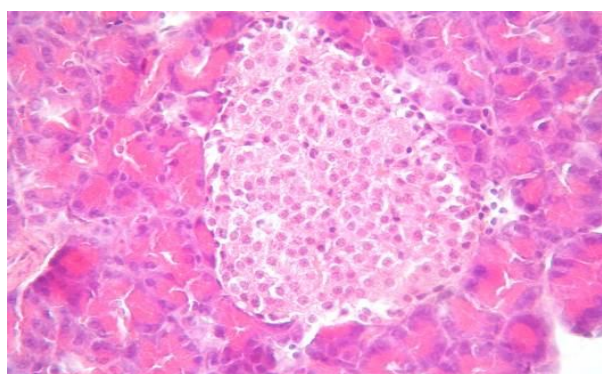
**Динамика клинико-биохимических показателей  
при стрептозотоцин-никотинамид-индуцированном диабете  
на фоне введения секретогенов (диабенол) ( $M \pm m$ )**

Параметр	3 сутки	7 сутки	21 сутки	28 сутки
<b>Интактный контроль</b>				
Масса тела, г	293,1 ± 5,6	287,5 ± 7,2	292,4 ± 5,1	295,9 ± 4,3
Объем потребляемой жидкости, мл	12,0 ± 1,5	13,2 ± 0,9	11,8 ± 1,1	12,3 ± 1,1
HbA1c, %	3,62 ± 0,41	3,59 ± 0,32	3,68 ± 0,21	3,78 ± 0,62
C-пептид, нг/мл	4,54 ± 0,13	4,67 ± 0,13	4,64 ± 0,15	4,65 ± 0,16
Глюкоза крови, ммоль/л	4,0 ± 0,1	3,9 ± 0,2	4,0 ± 0,1	4,1 ± 0,1
Глюкозурия, ммоль/л	-	-	-	-
<b>Стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный диабет</b>				
Масса тела, г	237,5 ± 7,2	245,1 ± 4,2	225,9 ± 4,3	234,9 ± 4,3
Объем потребляемой жидкости, мл	<b>27,2 ± 1,4*</b>	<b>31,4 ± 2,18*</b>	<b>33,2 ± 1,68*</b>	<b>25,0 ± 1,3*</b>
HbA1c, %	4,21 ± 0,2	4,89 ± 0,11	6,22 ± 0,37	<b>10,10 ± 0,40*</b>
C-пептид, нг/мл	<b>3,870,13*</b>	<b>3,65 ± 0,21*</b>	<b>3,21 ± 0,11*</b>	<b>2,94 ± 0,14*</b>
Глюкоза крови, ммоль/л	<b>12,8 ± 0,2*</b>	<b>15,9 ± 0,1*</b>	<b>12,3 ± 0,2*</b>	<b>13,2 ± 0,2*</b>
Глюкозурия, ммоль/л	0,2 ± 0,05	0,1 ± 0,02	0,7 ± 0,10	0,2 ± 0,03
<b>Стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный диабет+секретогены (диабенол – 25 мг/кг, внутрь)</b>				
Масса тела, г	222,4 ± 6,0	224,1 ± 3,5	233,2 ± 2,4	237,8 ± 7,6
Объем потребляемой жидкости, мл	<b>27,1 ± 2,3*</b>	<b>19,4 ± 1,4*</b>	<b>20,1 ± 1,9*</b>	<b>16,3 ± 1,2*</b>
HbA1c, %	6,52 ± 0,2	7,10 ± 0,1	<b>8,23 ± 0,42**</b>	<b>7,81 ± 0,32**</b>
C-пептид, нг/мл	<b>3,65 ± 0,13*</b>	<b>3,72 ± 0,21*</b>	<b>3,55 ± 0,12*</b>	<b>3,17 ± 0,10</b>
Глюкоза крови, ммоль/л	7,3 ± 1,2	6,8 ± 1,6	7,0 ± 1,5	7,6 ± 0,50
Глюкозурия, ммоль/л	0,5 ± 0,09	0,1 ± 0,03	0,6 ± 0,13	0,1 ± 0,02

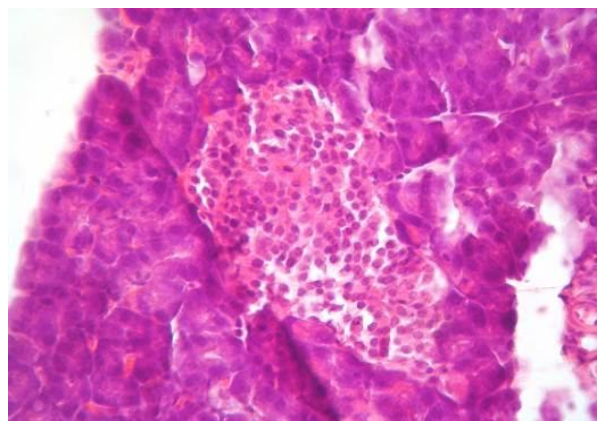
\*Достоверные изменения по отношению к интактной группе ( $p < 0,05$ );

\*\*достоверные изменения по отношению к группе стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного диабета ( $p < 0,05$ ).

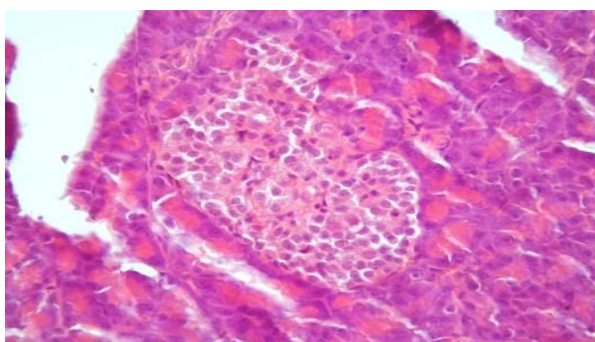




**А**



**Б**

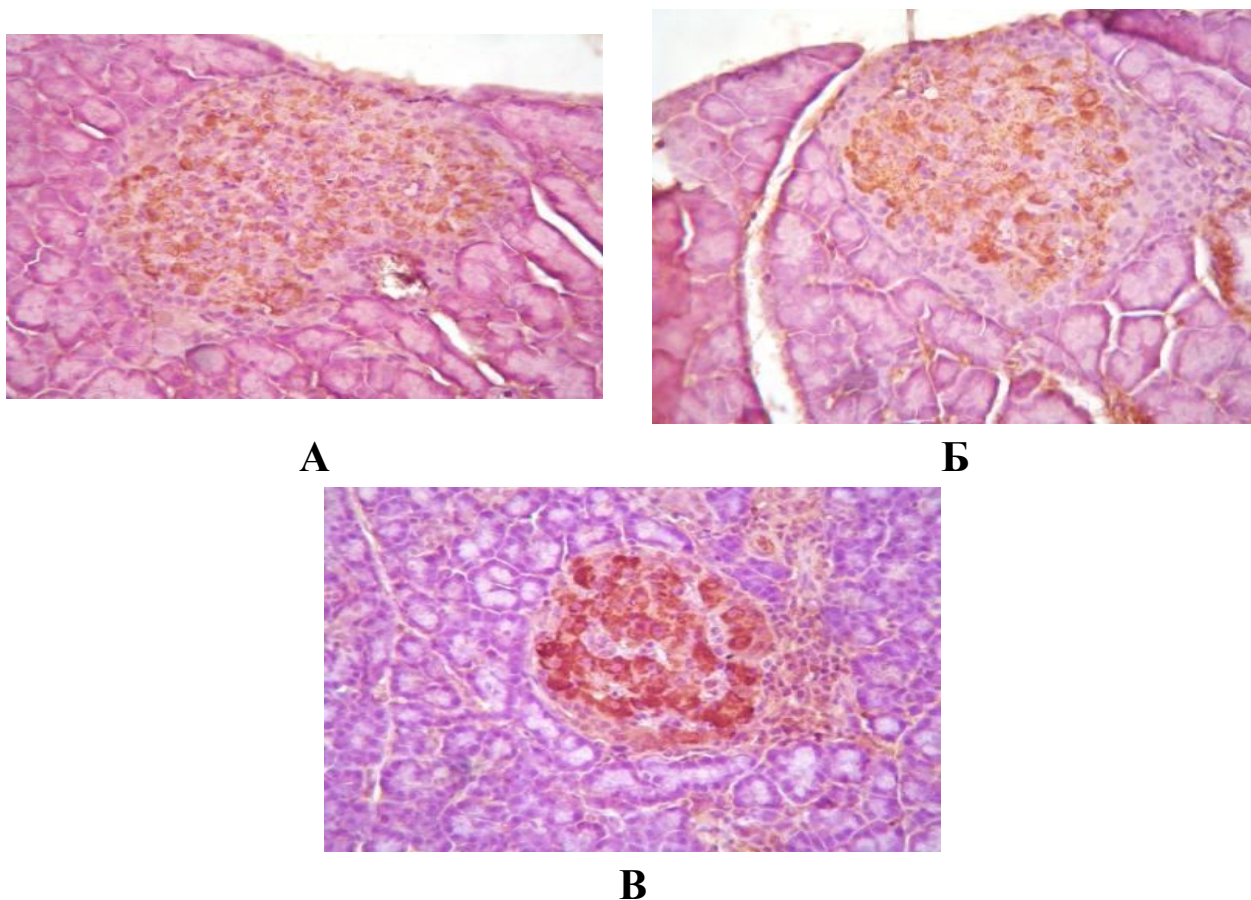


**В**

**Рис. 7.2. Панкреатические островки. А – Интактный контроль. Б – Стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный диабет. В – Стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный диабет + диабе-нол (25 мг/кг), увеличение размеров островков. Окраска гематок-силином и эозином. Начальное увеличение x400**

С 21 по 28 сутки эксперимента гистологические изменения были идентичными и были достоверными преимущественно в селезеночном отделе железы. Признаков воспаления в островковом аппарате не определялось. Панкреатические островки сохраняли округлую, а часть из них неправильную форму и средние размеры  $(9559,6 \pm 11513,8)$  мкм<sup>2</sup>. Объемная доля по отношению к крысам с экспериментальным диабетом незначительно увеличивалась и составляла  $(7,5 \pm 1,5)$  %, при этом не достигала нормы. Количество эндокриноцитов  $\beta$  и занимаемая ими площадь также незначительно увеличивались по

сравнению с группой животных-диабетиков. Иммуногистохимически инсулиноциты располагались в пределах панкреатических островков хаотично, что было обусловлено очаговым склерозом островков. Гранулы инсулина в цитоплазме клеток были распределены неравномерно с разной степенью интенсивности иммунного окрашивания (рис. 7.3.). Ядра  $\beta$ -клеток островков Лангерганса занимали площадь сопоставимую с контрольной группой. Отмечалась очаговая гипертрофия ядер эндокриноцитов (табл. 7.4.).



**Рис. 7.3. Панкреатические островки. Поликлональные антитела к инсулину, визуализация DAB. Начальное увеличение  $\times 400$ . А – Интактный контроль. Б – Стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный диабет. В – Стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный диабет + диабенол**

**Морфометрические показатели панкреатических островков при стрептозотоцин-никотинамид-индуцированном диабете на фоне введения диабенола (21 сутки, селезеночный отдел,  $M \pm m$ )**

Экспериментальные группы	Площадь островков, $\text{мкм}^2$	Од островков, %	Удельное количество $\beta$ -клеток, %	Объемная доля $\beta$ -клеток, %	Площадь ядер $\beta$ -клеток, $\text{мкм}^2$
Интактный контроль	15448,2 $\pm$ 9819,4	11,0 $\pm$ 1,2	63,8 $\pm$ 7,2	74,2 $\pm$ 5,6	26,4 $\pm$ 3,7
Стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный диабет	12801,5 $\pm$ 11252,3	<b>5,1 <math>\pm</math> 2,3*</b>	<b>47,1 <math>\pm</math> 3,5*</b>	<b>55,3 <math>\pm</math> 6,1*</b>	30,5 $\pm$ 6,2
Стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный диабет+диабенол	9559,6 $\pm$ 11513,8	7,5 $\pm$ 1,5	54,3 $\pm$ 9,5	63,1 $\pm$ 4,6	25,4 $\pm$ 6,4

\*Достоверно по сравнению с группой интактного контроля.

Индексы апоптоза и пролиферации изменялись незначительно по сравнению с группой сахарного диабета (табл. 7.5). В отдельных островках регистрировались как единичные каспаза-3, TUNEL-позитивные эндокриноциты, так и эндокриноциты с умеренной ядерной экспрессией антигенов PCNA и Ki-67 (рис. 7.4).

Таким образом, введение диабенола крысам с моделью стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного диабета не препятствует развитию воспалительных и деструктивных изменений островкового аппарата поджелудочной железы и сопровождается мозаичной картиной повреждения и репарации В-эндокриноцитов в различные сроки эксперимента.

Под влиянием диабенола возникает достоверное увеличение среднего количества островков Лангерганса в селезеночном отделе ( $p < 0,05$ ) и достоверное увеличение площади ядер панкреатических

$\beta$ -клеток ( $p < 0,05$ ). Данные тканевые изменения подтверждают возможность увеличения синтетической активности инсулиноцитов под влиянием диабенола).

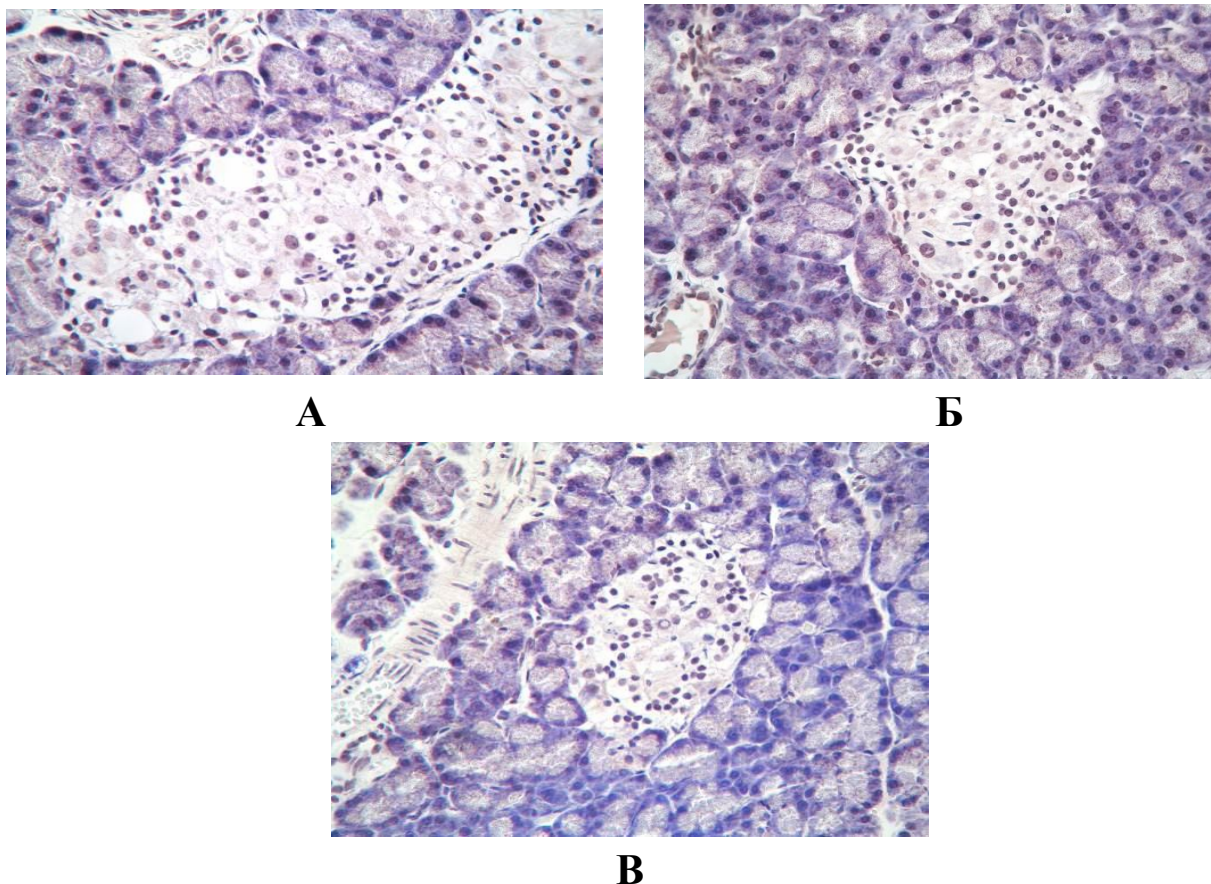
Таблица 7.5

**Динамика пролиферативной активности и индекса апоптоза  
эндокриноцитов панкреатических островков  
при стрептозотоцин-никотинамид-индуцированном СД+диабенол  
(селезеночный отдел,  $M \pm m$ )**

Группы	Длительность эксперимента, сутки	Индекс апоптоза, % каспаза-3 позитивных клеток	Индекс пролиферации, %	
			PCNA-позитивные клетки	Ki-67-позитивные клетки
Интактный контроль	7	3,9 ± 0,1	2,8 ± 1,0	1,2 ± 0,3
	14	4,2 ± 1,0	3,2 ± 0,7	1,4 ± 0,4
	21	4,0 ± 1,1	3,1 ± 1,0	1,6 ± 0,2
	28	3,6 ± 0,9	2,9 ± 1,3	0,9 ± 1,1
Стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный диабет	7	<b>7,7 ± 1,6*</b>	<b>5,3 ± 2,2*</b>	2,0 ± 1,8
	14	<b>8,1 ± 1,9*</b>	<b>9,2 ± 1,6*</b>	<b>2,2 ± 1,4*</b>
	21	7,3 ± 1,6*	10,3 ± 1,5*	2,4 ± 1,5
	28	6,2 ± 2,1	3,5 ± 2,7	1,9 ± 1,2
Стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный диабет+диабенол	7	6,5 ± 1,2	5,1 ± 1,3	2,1 ± 1,2
	14	7,9 ± 2,4	3,7 ± 1,5	2,5 ± 1,7
	21	5,7 ± 2,3	4,0 ± 1,7	1,5 ± 1,0
	28	6,8 ± 2,9	4,9 ± 1,3	2,4 ± 1,6

\*Достоверные изменения по отношению к интактной контрольной группе ( $p < 0,05$ ).





**Рис. 7.4** Панкреатические островки, единичные TUNEL-позитивные эндокриноциты. А – Интактный контроль. Б – Стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный диабет. В – Стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный диабет + диабенол. Окраска гематоксилином и эозином. Начальное увеличение x400

## 7.2. Заключение

Данные проведенных исследований позволяют предположить о присутствии в механизме антидиабетического действия диабенола панкреотропных и экстрапанкреатических эффектов.

В экспериментах по изучению секретогенной активности диабенола в ответ на его внутривенное введение, в обоих случаях наблю-

далось увеличение аутогенного гормона в крови подопытных животных, сочетающееся с сахаропонижающим эффектом препаратов, что является прямым доказательством инсулиотропного эффекта исследуемого соединения, основанного на стимулировании функционально способных  $\beta$ -клеток островков Лангерганса. Данную гипотезу подтверждают морфологические исследования, а именно увеличение объема клеток островкового аппарата поджелудочной железы, уменьшение количества гранул секрета, что указывает на повышение функциональной активности данных клеточных элементов.

Исследования, описанные в данной главе, выполнены в Волгоградском государственном медицинском университете при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-25-00139).

## ГЛАВА 8

# МУЛЬТИТАРГЕТНАЯ ТЕРАПИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-го ТИПА

*А. А. Спасов, М. В. Чепурнова,  
Н. И. Чепляева, Г. Л. Снигур*

---

СД 2 типа представляет собой группу гетерогенных нарушений углеводного обмена, основой которых являются два дефекта: инсулинорезистентность и нарушение функции  $\beta$ -клеток. У большинства больных СД 2 типа ухудшение тканевой чувствительности к инсулину представляет собой первичный дефект, а неспособность  $\beta$ -клеток поддерживать адекватный инсулиносекреторный эффект и гипергликемия развивается вторично, это наиболее характерно как для больных с метаболическим синдромом, так и для больных с нормальной массой тела. Но у некоторых больных СД 2 типа первичный эффект может возникать на уровне  $\beta$ -клеток и манифестировать в виде нарушения секреции инсулина, инсулинорезистентность в данном случае развивается сочетано с, или вслед за нарушением секреции инсулина. Больные такого типа встречаются гораздо реже и в основном представлены лицами с нормальной массой тела [Аметов А.С., 2014].

Следует отметить, что за последние 20 лет цели лечения СД претерпели значительные изменения. Если до недавнего времени целью терапии было лишь устранение симптомов гипергликемии, то в настоящее время адекватная рациональная фармакологическая коррекция данной патологии направлена на протекцию  $\beta$ -клеток поджелудочной железы от истощения, поддержание оптимального баланса глюкозы, предотвращение развития макро- и микрососудистых ос-

ложнений [Дедов И.И., 2010; Lerario A.C., 2010]. В большинстве случаев для адекватной компенсации СД недостаточно монотерапии, так, согласно результатам многоцентровых исследований UKPDS, лечение только пероральными сахароснижающими препаратами было эффективно лишь только у 50 % больных через 3 года и у 25 % – через 9 лет от начала лечения [Кононенко И.В., 2007]. Если не достигнуты цели гликемического контроля, то лечение дополняют препаратами других групп (препараты сульфонилмочевины, тиазолидиндионы или инсулин). При комбинированной терапии назначают препараты разнонаправленного действия, чаще всего это сочетание секретогенов и препаратов периферического действия. В клинической практике используют препараты с фиксированной комбинацией: глибенкламид и метформин (глюкованс, глибомет), гликлазид и метформин (глимекомб), вилдаглиптин и метформин (галвус мет), ситаглиптин и метформин (янумет) [Аметов А.С., 2014].

Для эффективной терапии СД желательно наличие у препарата одновременного воздействия на несколько мишеней. При комбинированной терапии несколькими препаратами возможно взаимодействие этих препаратов между собой и возникновение нежелательных побочных эффектов. В связи с этим активно развивается поиск новых веществ, так называемых мультитаргетных соединений, воздействующих на несколько мишеней одновременно, которые могут иметь значительные преимущества по сравнению с монотаргетными препаратами.

Таким образом, современный уровень научных исследований этиологии и патогенеза СД позволяет находить новые мишени для антидиабетических соединений и создавать новые высокоэффективные классы препаратов для пероральной сахароснижающей терапии либо новые комбинации антидиабетических средств для комбинированной терапии данной патологии.



## 8.1. Научные подходы к комбинированной терапии сахарного диабета типа 2

На протяжении последних десятилетий заболеваемость СД типа 2 неуклонно увеличивается, и в настоящее время СД признан неинфекционной эпидемией [Петров В.И., 2010]. СД 2 типа – хроническое, прогрессирующее заболевание, в основе патогенеза которого лежат такие эндокринные дефекты, как инсулинорезистентность периферических тканей (мышечной, жировой и печени), нарушение секреции инсулина  $\beta$ -клетками поджелудочной железы, избыточная продукция глюкозы печенью, снижение продукции инкретинов. На стадии нарушенной толерантности к глюкозе снижается первая фаза секреции инсулина, что приводит к постпрандиальной гипергликемии и впоследствии к гиперинсулинемии. Вместе с прогрессирующим снижением секреции инсулина нарастает инсулинорезистентность, а также увеличивается выброс глюкозы печенью, и, как следствие, повышается уровень глюкозы плазмы натощак [Колуэлл Д.А., 2007]. Нарушение действия инсулина в печени характеризуется отсутствием его ингибирующего влияния на процессы глюконеогенеза, снижением синтеза гликогена в печени, активацией процессов гликогенолиза, что приводит к повышению продукции глюкозы печенью. Кроме того, неспособность инсулина подавлять окисление липидов приводит к высвобождению большого количества свободных жирных кислот, что вызывает ингибирование процессов транспорта и фосфорилирования глюкозы и снижение окисления глюкозы и синтеза гликогена в мышцах [Стаценко М.Е., 2010]. Пока  $\beta$ -клетки поджелудочной железы способны компенсировать инсулинорезистентность повышением продукции достаточного количества инсулина, нормогликемия поддерживается. Однако при истощении резервов  $\beta$ -клеток прекращается компенсаторная гиперинсулинемия, возникает гипергликемия натощак и непосредственно манифестация СД [Аметов А.С., 2008].

Утилизация поступающей в организм глюкозы происходит за счет тесно взаимосвязанных процессов: стимуляции выработки инсулина; подавления продукции эндогенной глюкозы в печени за счет повышения уровня инсулина в крови и опосредуемой инсулином стимуляции захвата глюкозы периферическими тканями [Alice Y.Y., 2005].

Основным патологическим механизмом повышения скорости базальной продукции глюкозы в печени является усиление глюконеогенеза [Кроненберг Г.М., 2010]. Избыточная продукция глюкозы печенью тесно коррелирует с увеличением уровня глюкозы крови натощак. Поэтому препараты, уменьшающие скорость базальной продукции глюкозы в печени, особенно эффективно снижают уровень глюкозы в крови.

При СД 2 типа значительно снижается способность эндогенного инсулина стимулировать захват глюкозы мышцами [Virally M., 2007], чем и обусловлено чрезмерное повышение уровня глюкозы в плазме крови после еды. Поэтому применение препаратов, повышающих чувствительность мышц к инсулину, должно способствовать менее выраженному повышению уровня глюкозы в крови после употребления в пищу углеводов. У всех больных с СД типа 2 наблюдается нарушение секреции инсулина, что обуславливает применение препаратов, увеличивающих секрецию инсулина.

Инсулинорезистентность может быть реализована как на рецепторном, так и на пострецепторном уровне [Алишева Е.К., 2002]. Это патологическое состояние может развиваться вследствие снижения числа рецепторов к инсулину, снижения тирозинкиназной активности инсулиновых рецепторов, дефекта инсулинстимулированного транспорта глюкозы в результате снижения транслокации GLUT-1, GLUT-2, GLUT-4, дефекта внутриклеточных ферментов, вовлеченных в действие инсулина [Аметов А.С., 2008].

СД типа 2 является гетерогенным заболеванием, в связи с этим достижение компенсации углеводного обмена возможно лишь при

рациональном воздействии на все известные звенья его патогенеза: при уменьшении секреции инсулина необходимо применять секретогены инсулина [производные сульфонилмочевины (ПСМ), несульфонилмочевинные стимуляторы секреции инсулина – прандиальные регуляторы гликемии (меглитиниды)], при увеличении инсулинорезистентности – использовать сенситайзеры инсулина (глитазоны или тиазолидиндионы), при увеличении высвобождения глюкозы печенью – ингибиторы скорости продукции глюкозы печенью (бигуаниды), ингибиторы  $\alpha$ -глюкозидазы [Вајрај N., 2005]. Субкалорийная диета и физические нагрузки играют важную роль в успешной терапии СД типа 2. Однако большинству пациентов для достижения компенсации заболевания необходимо назначение пероральных сахароснижающих препаратов (ПССП) [Демидова Т.Ю., 2012]. Продолжающаяся в течение дня гипергликемия и патологически повышенные колебания прандиальной гликемии могут быть нормализованы, если восстановить раннюю фазу секреции инсулина с помощью лекарственных препаратов [Chitre M.M., 2006].

Традиционно тактика лечения СД типа 2 предполагает постепенный переход от диетотерапии и изменения образа жизни к медикаментозной монотерапии. По мере прогрессирования ухудшения показателей углеводного обмена происходит замена менее эффективных средств на более эффективные, и лишь при неуспехе применения высших доз наиболее эффективных средств, переходят к комбинации двух и более препаратов, воздействующих на разные звенья патогенеза СД типа 2. Отсутствие адекватного гликемического контроля в течение ряда лет приводит к истощению инсулярного аппарата за счет снижения массы  $\beta$ -клеток вследствие «окислительного стресса», развивающегося при самоокислении глюкозы (феномен «глюкозотоксичности»). На данном этапе отмечается неэффективность пероральной сахароснижающей терапии, что является сигналом к началу инсулинотерапии [Недосугова Л.В., 2006]. Критерии назначения инсулинотерапии при СД 2 типа – отсутствие

компенсации сахарного диабета при диетотерапии в сочетании с ингибиторами глюкозидаз (глюкобай), бигуанидами, тиазолидиндионами или ПСМ, а также, так называемая, вторичная резистентность к пероральным препаратам.

Монотерапия одним из ПССП эффективна непродолжительное время, обычно в первые годы заболевания, а в дальнейшем возникает необходимость назначения комбинаций из двух и более препаратов [Бирюкова Е.В., 2006]. Так, по данным проведенного клинического исследования [Kimmel B., 2005], через 3 года от начала лечения только у 50% больных на фоне терапии диетой и монотерапии ПССП достигается уровень HbA1c менее 7 %. Более того, так как СД типа 2 является прогрессирующим заболеванием, даже пациенты с оптимальным начальным ответом на монотерапию, в конечном итоге нуждаются в комбинированном лечении. Рациональное использование комбинированной терапии ПССП может задерживать необходимость назначения многократных инъекций инсулина, облегчать поддержание целевого уровня HbA1c и предотвращать развитие сосудистых осложнений СД типа 2 [Brain S.C., 2009]. Поскольку у большинства пациентов с СД типа 2 нарушена секреция инсулина и увеличена инсулинорезистентность, наиболее рациональным является назначение препаратов разного типа действия [Krentz A.J., 2005]. Обычно это сочетание секретогенов и препаратов, влияющих на утилизацию глюкозы периферическими тканями. Единственным исключением из этого правила является сочетание тиазолидиндионов и метформина [Смирнова О.М., 2006]. Применение комбинированной терапии на ранних этапах заболевания можно считать вполне оправданным, поскольку при этом отмечается значительная эффективность с практическим достижением нормогликемии и целевых параметров метаболизма, снижается риск развития гипогликемии, предотвращается неконтролируемая гиперинсулинемия и появляется возможность воздействия на основные звенья патогенеза СД типа 2.

Комбинированная терапия основана большей частью на добавлении сенситайзеров инсулина к производным сульфонилмочевины. Препараты сульфонилмочевины на протяжении уже длительного времени занимают основное место в лечении СД типа 2. Действие препаратов этой группы связано с усилением секреции инсулина и повышением уровня циркулирующего инсулина, однако с течением времени они теряют способность поддерживать гликемический контроль и функцию  $\beta$ -клеток, так как пик действия любого препарата сульфонилмочевины и повышение постабсорбционной гипергликемии не совпадают по времени. В результате недостаточно снижается уровень глюкозы в крови в течение длительного времени, и развивается гипогликемия в последующие после приема пищи часы [Балаболкин М.И., 2000]. Учитывая все вышесказанное, целесообразно использовать производные сульфонилмочевины в комбинации с инсулинсенситайзерами, бигуанидами.

Метформин оказывает антигипергликемическое действие, в присутствии инсулина ингибирует глюконеогенез в печени, снижает гликогенолиз, усиливает периферическую утилизацию глюкозы. Под действием метформина не только повышается аффинность инсулиновых рецепторов и изменяется их конформация, но и стимулируются рецепторные и пострецепторные пути передачи инсулинового сигнала (усиливает киназную активность и фосфорилирование инсулиновых рецепторов, в том числе  $\beta$ -субъединицы) [De Souza Silva F.M., 2009]. Усиливаются эффекты инсулина: транскрипция, трансляция, синтез ключевых ферментов, ответственных за транслокацию GLUT-4 из интрацеллюлярного депо на плазматическую мембрану, вследствие чего увеличивается поглощение глюкозы печеночными, мышечными и жировыми клетками [Zhang L., 2007].

Наиболее часто применяемым на практике вариантом комбинированной терапии является сочетание производных сульфонилмочевины и метформина [SpadaA., 2008]. В клинической практике широко применяется препарат глибOMET фирмы «Берлин-Хеми». ГлибOMET –

фиксированная комбинация 2,5 мг глибенкламида и 400 мг метформина гидрохлорида. Проводилось изучение эффективности глибомета [Анцифиров М.Б., 2006; Смирнова О.М., 2005] при лечении 15 больных СД типа 2. Через 12 недель лечения достоверно снижался уровень HbA1c на 1,5 %. Комбинация бигуанидов и производных сульфонилмочевины представляется рациональной, поскольку влияет на оба звена патогенеза СД типа 2: стимулирует секрецию инсулина и повышает чувствительность тканей к инсулину [Bailey C.J., 2005]. Проводилось исследование [Marre M., 2002] эффективности глюкованса в группах больных, у которых не был достигнут адекватный гликемический контроль на фоне монотерапии глибенкламидом и метформином. Через 16 недель лечения показатели HbA1c и уровня глюкозы плазмы натощак в группе больных, принимавших глюкованс (соотношение метформин + глибенкламид 500 мг / 2,5 мг), снизились на 1,2 % и 2,62 ммоль/л, соответственно, при соотношении метформин + глибенкламид 500 мг / 5 мг – на 0,91 % и 2,43 ммоль/л, в группе больных, принимавших метформин, эти показатели снизились лишь на 0,19 % и 0,57 ммоль/л, а в группе больных, принимавших глибенкламид, – на 0,33% и 0,73 ммоль/л, соответственно. Сочетание производных сульфонилмочевины и метформина обеспечивает благоприятный контроль гликемии, что предполагает сравнение этой комбинации препаратов с другими существующими альтернативами. Согласно данным многоцентрового исследования [Hanefeld M., 2004], в группе больных СД типа 2, получавших комбинацию производных сульфонилмочевины и пиоглитазона в течение 52 недель, уровень HbA1c снизился на 1,2 %, а у больных, получавших производные сульфонилмочевины с метформином, – на 1,36 %; кроме того, уровень глюкозы крови уменьшился на 2,2 и 2,3 ммоль/л, соответственно. Одним из удачных примеров эффективности комбинированной терапии являются результаты исследования [Sieradzki J., 2003], в котором добавлением гликлазида МВ к метформину удалось значительно улучшить гликемический контроль. В проведенном клиниче-

ском исследовании [Vajrai N., 2005] высокую эффективность показала фиксированная комбинация гликлазида (80 мг) и метформина (500 мг). У наблюдавшихся больных до лечения уровень глюкозы плазмы натощак составлял 179,6 мг/дл, спустя 6 недель применения вышеуказанной комбинации (глизид-М) – 111,4 мг/дл. Исходный уровень HbA1c составлял 8,26 %, под влиянием глизида-М этот показатель значительно снизился на 3,4 %, что указывает на тенденцию достижения оптимального контроля гликемии. Помимо этого было выявлено существенное улучшение липидного профиля после лечения с глизидом-М, отмечалось статистически значимое увеличение уровня липопротеидов высокой плотности с 43,6 до 48,14 мг/дл и значительное снижение уровня триглицеридов с 365 до 148,9 мг/дл.

Ингибиторы ДПП-4, в основе механизма которых лежит стимуляция инкретинового эффекта, рекомендуются преимущественно для лечения начальных стадий СД типа 2, когда способность  $\beta$ -клеток секретировать инсулин мало нарушена. В отличие от глитазонов и препаратов сульфонилмочевины ингибиторы ДПП-4 не повышают массу тела больных и не приводят к резкому снижению уровня глюкозы крови. Ситаглиптин допущен для монотерапии, а также используется в комбинации с метформином или одним из глитазонов; вилдаглиптин – в комбинации с препаратами сульфонилмочевины. Проводилось сравнение 4 вариантов 24-недельного лечения [Vain S.C., 2009]: вилдаглиптин 100 мг в день; пиоглитазон 30 мг в день; вилдаглиптин 50 мг + пиоглитазон 15 мг в день; вилдаглиптин 100 мг в день + пиоглитазон 30 мг в день. Исходный уровень HbA1c составлял в среднем от 8,6 до 8,8 %. Под влиянием вилдаглиптина уровень HbA1c снизился на 1,1 %, пиоглитазона – на 1,4 %, комбинации низких доз этих препаратов – на 1,7 %, высоких доз – на 1,9 %. Комбинация вилдаглиптина и пиоглитазона была достоверно эффективнее монотерапии. Вилдаглиптин в комбинации с метформином дополнительно снижал HbA1c примерно на 1 %.

Проводились экспериментальные исследования [Takasaki K., 2004] по изучению эффекта комбинированного назначения ингибитора ДПП-4 под шифром «K579» и глибенкламида у интактных крыс при проведении перорального теста толерантности к глюкозе. В результате было выявлено, что K579 значительно снижает подъем уровня глюкозы в крови у крыс, получавших глибенкламид, не вызывая при этом выраженной гипогликемии. Это указывает на возможность использования ингибиторов ДПП-4 в комбинации с глибенкламидом для коррекции постпрандиальной гипергликемии у пациентов с СД типа 2.

Тиазолидиндионы снижают инсулинорезистентность периферических тканей за счет связывания с рецепторами, активирующими пролиферацию пероксисом (PPAR $\gamma$ ) на ядерной мембране, что приводит к стимуляции синтеза в клетке инсулинчувствительных белков (ферментов), участвующих в метаболизме глюкозы. Эти препараты не вызывают риска осложнения в виде гипогликемии, улучшают липидный спектр, однако отмечается нарастание отеков и снижение гемоглобина. Отмеченная прибавка в весе обусловлена увеличением мышечной массы. Использование первого представителя этой группы препаратов – троглитазона, выявило токсическое воздействие на печень, однако современные препараты, пиоглитазон и розиглитазон, гепатотоксичностью не обладают. Тем не менее, длительное применение тиазолидиндионов в качестве монотерапии, требует контроля гемоглобина, функции печени [Недосугова Л.В., 2006]. Указанные недостатки этой группы препаратов обуславливают их применение в составе комбинированной терапии. Согласно клиническим исследованиям [Inzucchi S.E., 1998], комбинированная терапия троглитазоном и метформинем аддитивно снижает уровень глюкозы натощак и ограничивает постпрандиальную гликемию у пациентов с СД типа 2, так как метформин, главным образом, снижает продукцию эндогенной глюкозы, а троглитазон увеличивает периферическую утилизацию глюкозы. Это подтверждается и результатами эксперимен-



тального исследования [Suzuki M., 2002], в ходе которого изучалась эффективность комбинации метформина и пиоглитазона у крыс с СД и генетически модифицированных крыс с ожирением. При внутрижелудочном комбинированном введении метформина (300 мг/кг) и пиоглитазона (1 мг/кг) уровень глюкозы в крови крыс снижался на 38 % по сравнению с контрольными показателями. Пиоглитазон и метформин производят выраженный индивидуальный гипогликемический эффект, но при этом не обнаруживается взаимодействия между препаратами. Кроме того, совместное назначение с метформинном значительно снижало вызванную пиоглитазоном прибавку в весе у экспериментальных крыс.

Использование ингибиторов  $\alpha$ -глюкозидазы в комбинации с производными сульфонилмочевины, метформином также приводит к улучшению контроля гликемии [VandeLaar F.A., 2008]. Ингибиторы  $\alpha$ -глюкозидазы в тонком кишечнике, такие как акарбоза и миглитол, конкурентно подавляют способность ряда ферментов (мальтаза, изомальтаза, сахараза и глюкоамилаза), действующих в области щеточной каемки тонкой кишки, расщеплять олиго- и дисахариды до моносахаридов, благодаря чему снижают постпрандиальную гипергликемию и потребность в инсулине [Padwal R., 2005]. Акарбоза в качестве монотерапии является значительно менее эффективной по сравнению с производными сульфонилмочевины, однако при длительном применении приводит к достоверному снижению веса, инсулинорезистентности и базальной гликемии. Ограничением для использования акарбозы в качестве монотерапии является метеоризм и диарея, лимитирующие увеличение дозы, а также снижение ее эффективности по мере продолжительности лечения за счет адаптации желудочно-кишечного тракта к ингибирующему действию препарата на кишечные  $\alpha$ -глюкозидазы. Клинические испытания [VandeLaar F.A., 2005] показали, что по выраженности гипогликемического эффекта акарбоза уступает препаратам сульфонилмочевины и метформину. При монотера-

пиакарбозой уровень глюкозы плазмы натощак снижается на 1,4–1,7 ммоль/л, а уровень HbA1c – на 0,7–1 %. В большей степени препарат уменьшает уровень постпрандиальной гликемии (на 2,2–2,8 ммоль/л). Акарбоза наиболее эффективна при недавно выявленном СД типа 2 с незначительным повышением уровня глюкозы плазмы натощак или у больных, которые уже принимают препараты сульфонилмочевины или метформин, но уровень глюкозы плазмы натощак у них необходимо снизить еще. При подключении миглитола – ингибитора  $\alpha$ -глюкозидазы второй генерации, к метформину, также суммируется гипогликемическое действие препаратов [VanGaal V., 2001].

На основании вышеприведенных данных можно заключить, что для СД типа 2 характерно прогрессивное естественное течение. Обычно лечение СД типа 2 начинают с монотерапии метформином или препаратами сульфонилмочевины, но, практически, на всех стадиях болезни для достижения компенсации углеводного обмена трудно обойтись монотерапией [Дедов И.И., 2009]. Поэтому по мере прогрессирования ухудшений показателей углеводного обмена, переходят к комбинированной терапии, а в случае ее неэффективности – к назначению инсулина. Для достижения адекватного гликемического контроля целесообразным является интенсивное терапевтическое воздействие в более ранние сроки развития заболевания одновременно на оба звена патогенеза СД типа 2 (инсулиновую резистентность и дефект  $\beta$ -клеток островков поджелудочной железы). Комбинированная терапия проводится препаратами с учетом их синергетического действия и молекулярных механизмов влияния на углеводный обмен. Поэтому применение комбинированных препаратов в терапии СД типа 2 является оптимальным и перспективным направлением для контроля этого заболевания.

## **8.2. Антидиабетическая активность комбинаций диабенола и метформина, диабетенола и глибенкламида**

Монотерапия одним из пероральных сахароснижающих препаратов (ПССП) эффективна непродолжительное время, обычно в первые годы заболевания, а в дальнейшем возникает необходимость назначения комбинаций из двух и более препаратов [Дедов И.И., Шестакова М.В., 2009]. Так, согласно результатам UKPDS, монотерапия ПССП была эффективна только у 50 % больных через 3 года и лишь у 25 % через 9 лет от начала лечения [Кононенко И.В., Смирнова О.М., 2007]. Поэтому использование комбинированных лекарственных средств с разными механизмами действия в лечении СД типа 2 является оптимальным для достижения адекватного гликемического контроля. Таким образом, создание и применение новых комбинированных гипогликемических препаратов остается приоритетным направлением в диабетологии.

*Материалы и методы исследования.* Эксперименты проводили на 240 половозрелых нелинейных белых крысах обоего пола массой 250–350 г, содержащихся в условиях вивария (температура 22–24 °С, относительная влажность воздуха 40–50 %) с естественным световым режимом, на стандартной диете (ГОСТ Р 50258-92).

Проведение экспериментов одобрено решением этической комиссии ВолгГМУ (протокол заседания № 89-2009 от 4.02.09) и выполнено согласно методическим руководствам и нормативным документам (ГОСТ З 51000.3-96 и 51000.4-96; правила и Международные рекомендации Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997); правила лабораторной практики (GLP) в Российской Федерации, утвержденные приказом Минздрава РФ от 19 июня 2003 г. № 267).

Проведено изучение фармакологических свойств композиций диабенола (субстанция «ООО След», Россия) с глибенкламидом (субстанция «HYDERABAD-500082», Индия), метформинном (субстанция «ХарманФайнокем», Индия), росиглитазоном («Гедеон Рихтер», Венгрия).

Гипогликемическую и антидиабетическую активность указанных композиций изучали на 60 интактных крысах и 80 крысах со стрептозотоцин-индуцированным и стрептозотоцин никотинамидным диабетом при однократном внутрижелудочном введении веществ. Метформин вводили в дозе 100 мг/кг (Kakemi M., Sasaki H., 1982), глибенкламид в дозах 2,5 и 5 мг/кг (Trivedi N.A., Mazumdar B., 2004), диабенол в дозах: 25; 12,5; 10; 1 мг/кг и комбинации диабенола с указанными препаратами в соответствующих дозах. Содержание глюкозы определялось в крови, забираемой из хвостовой вены крыс, через 2, 4, 6, 8 часов после введения препаратов.

Величину гипогликемического действия оценивали исходя из степени снижения суммарной площади под кривой остаточного содержания глюкозы в крови, рассчитанной по правилу трапеций [Воронкова М. П., 2009].

Экспериментальные формы сахарного диабета моделировали: стрептозотоцин-индуцированный-стрептозотоцином 45 мг/кг, в/в [Баранов В. Г., 1983]; стрептозотоцин-никотинамидный СД – стрептозотоцином 65 мг/кг, в/брюшинно с предварительным (за 15 мин) введением никотинамида 230 мг/кг, в/брюшинно [Islam M. S., 2007].

Изучение механизма антидиабетогенного действия активных композиций на основе диабенола, влияния их на метаболические процессы, исследование гемореологических и антиатерогенных свойств проводили при курсовом введении комбинаций. Экспериментальные группы (n = 10) формировались после моделирования стрептозотоцин-никотинамидного диабета из животных с концентрацией глюкозы в плазме крови выше 6,5 ммоль/л в соответствии с вводимым препаратом. Изучаемые субстанции диабенола в дозе 25 мг/кг,

метформина в дозе 100 мг/кг, глибенкламида в дозе 5 мг/кг и их комбинации в указанных дозах вводили внутривенно, начиная с 7-го дня после моделирования патологии, в течение 28 дней 1 раз в сутки. Контрольным животным (n = 10) вводили растворитель в аналогичных объемах по указанной схеме. Ежедневно фиксировали объем потребляемой воды и массу тела каждой крысы. Уровень глюкозы в крови и моче определяли глюкозооксидазным методом («Глюкоза ФКД», Россия) натощак на 7, 14, 21, 28-е сутки.

Изучение эффективности исследуемых комбинаций на толерантность к сахарной нагрузке проводили на модели глюкозотолерантного теста (глюкоза в дозе 3 г/кг, перорально) [Баранов В. Г., 1983] с оценкой результатов по А.В. Древаль (2005) на 14 и 28-е сутки.

На 28-й день введения исследуемых препаратов у опытных и контрольных групп животных проводился забор органов (поджелудочной железы, печени) и крови из брюшной аорты под наркозом хлоралгидратом (400 мг/кг). Гликозилированный гемоглобин определяли методом катионно-обменной хроматографии низкого давления («Фосфосорб», Россия); концентрацию С-пептида в плазме крови иммуноферментативным способом (DRG, Германия).

Скорость гликолиза и гликогенолиза в печени рассчитывали по методике, описанной Севериным С.Е. и Соловьевой Г.А. (1989), оценивая ее по образованию конечного продукта – молочной кислоты. Содержание молочной кислоты определяли с параоксидифенилом по методу Меньшикова В.В. (1987), содержание гликогена в печени – по методу VanderVies J. (1954), количество общего белка в гомогенате печени – биуретовым методом [Дарбре А., 1989; Ткачук В. А., 2004].

Морфологическое исследование поджелудочной железы крыс проводили по общепринятым гистологическим методикам. Визуализацию инсулоцитов островков Лангерганса выполняли при иммуногистохимической реакции с моноклональными антителами к инсулину (клон Ab-6 (INS04 + INS05); фирмы LabVision, Великобритания)

с помощью непрямого иммунопероксидазного метода, без предварительной демаскировки антигенов. Достоверность полученных результатов контролировали с помощью позитивных и негативных контролей антигенов, а также негативных контролей антител.

Морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной программы «ВидеоТестМорфо-4» (Россия). Определяли процентное соотношение площади, занимаемой  $\beta$ -инсулоцитами к общей площади островка, которая составляла 100%, объемную долю (ОД, %) островков по отношению к экзокринной части железы, площадь островков ( $\text{мкм}^2$ ), а так же размеры ядер инсулоцитов ( $\text{мкм}^2$ ) и их количество (% от общего количества клеток панкреатических островков).

Влияние изучаемых комбинаций на реологические свойства крови определяли по следующим показателям: вязкость крови [Добровольский Н. А., 1989], индекс агрегации эритроцитов [Dintenfass L., 1989] и осмотическую резистентность эритроцитов [Osaka T., 2001].

Изучение влияния комбинаций на агрегацию тромбоцитов проводили по методу Born G. (1962), Габбасов З.А. (1989) с использованием индуктора агрегации АДФ («Reanal», Венгрия) в конечной концентрации 5  $\text{мкМ}$ . Хронометрически на гемокоагулометре «SOLAR» определяли ПТВ, ТВ, ФГ, АПТВ с использованием стандартных наборов и методик [Баркаган З. С., 1999].

Концентрации  $\text{ХС}_{\text{общ}}$  и ТГ определяли в плазме крови, а  $\text{ХС}$  ЛПВП в супернатанте после преципитации ЛП, содержащих ЛПОНП и ЛПНП, с использованием энзиматического колориметрического метода с помощью стандартных наборов «Витал Диагностик» (Россия), и вычисляли значение концентрации  $\text{ХС}$  ЛПНП (Friedewald W.T., 1972) и индекс атерогенности (ИАТ) [Климов А.Н., 1999]. Эксперименты по изучению острой токсичности выполнялись в соответствии с методическими рекомендациями проведения доклинических (токсикологических) исследований [Хабриев Р.У. и соавт., 2005].

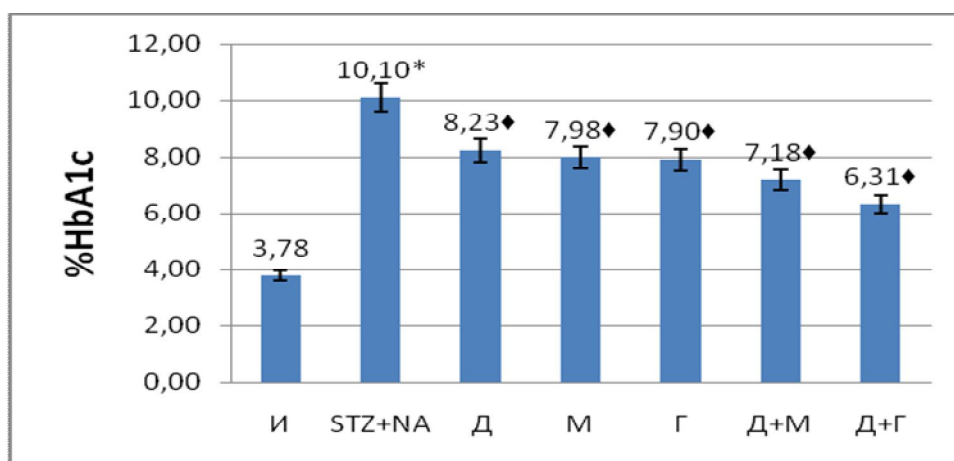
Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «Statistica 6.0» (*StatSoft*, США) и Microsoft Excel 2007 (*MSOffice 2007*, США). Расчет базовых статистических показателей, характеризующих вариационные ряды (среднее арифметическое значение  $M$ , стандартная ошибка средней арифметической  $m$ ), проводился с использованием парного  $t$ -критерия Стьюдента, критерия Манна-Уитни.

На первом этапе работы было проведено изучение гипогликемических свойств диабенола в комбинациях с метформином, глибенкламидом, росиглитазоном у интактных животных и животных с экспериментальным сахарным диабетом. Согласно результатам проведенных исследований, у интактных животных, при введении комбинации диабенола (25 мг/кг) с метформином (100 мг/кг), отмечалось увеличение гипогликемического эффекта. Так, комбинация снижала суммарную площадь под кривой остаточного содержания глюкозы в крови на 28,9 % ( $p < 0,05$ ) по отношению к контрольной группе крыс, что на 16,8 % и на 18,2 % меньше соответствующих значений, полученных у крыс, которым вводили препараты метформин и диабенол отдельно.

При изучении уровня антидиабетической активности комбинации диабенола и метформина использовали две модели экспериментальной патологии: стрептозотоцин-индуцированный сахарный диабет и стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный диабет. Наиболее эффективной оказалась комбинация диабенол-метформин, соответственно, у крыс со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным диабетом. У животных, после введения комбинации, суммарная площадь под кривой остаточного содержания глюкозы в крови достоверно сокращалась на 23,5 % по сравнению со значениями, полученными для контрольной группы крыс, и была на 16,7 % и на 20,1 % меньше таковой для диабенола и метформина, соответственно (рис. 8.1, табл. 8.1).

Вероятно, усиление сахароснижающего эффекта при введении комбинации может быть обусловлено различными механизмами дей-

ствия ее составляющих. Экспериментальные данные [Спасов А.А., Дудченко Г. П. и др., 1999] свидетельствуют о том, что механизм гипогликемического действия диабенола связан с его влиянием на процессы секреции инсулина. По имеющимся литературным данным [Matthaei S., Hamann A., et al., 1999; Kirpichnicov D., et al., 2002; Fisman E.Z., Tenenbaum A., 2009] основным механизмом действия метформина является снижение продукции глюкозы печенью.



**Рис. 8.1.** Влияние диабенола (25 мг/кг), метформина (100 мг/кг), глибенкламида (5 мг/кг) и их комбинаций на содержание HbA1c в крови крыс с стрептозотоцин-никотинамидным диабетом ( $M \pm m$ ): И – интактные, STZ+NA – стрептозотоцин-никотинамидный диабет, Д – диабенол, М – метформин, Г – глибенкламид; вертикальные штрихи соответствуют стандартной ошибке средней величины. \*Данные достоверны по отношению к контрольной группе интактных крыс; ♦данные достоверны по отношению к контрольной группе крыс с СД, t-критерий Стьюдента ( $p \leq 0,05$ )



**Влияние диабенола (25 мг/кг), метформина (100 мг/кг), глибенкламида (5 мг/кг) и их комбинаций на морфометрические показатели эндокринной части поджелудочной железы ( $M \pm m$ )**

Группы	Количество в-клеток, %	S в-клеток, %
Интактные	63,8 ± 7,2	74,2 ± 5,6
Стрептозотоцин-никотинамидный диабет	<b>47,1 ± 3,5*</b>	<b>55,3 ± 6,1*</b>
Диабенол	54,3 ± 9,5	63,1 ± 4,6
Метформин	<b>69,3 ± 4,2^</b>	68,3 ± 6,8
Глибенкламид	51,7 ± 7,4	59,8 ± 3,2
Диабенол+метформин	<b>65,0 ± 8,2^</b>	64,9 ± 8,7
Диабенол+глибенкламид	<b>77,3 ± 4,1^</b>	<b>81,6 ± 9,8^</b>

\*Достоверно по сравнению с группой интактного контроля;

^достоверно по сравнению с группой экспериментального диабета.

При изучении гипогликемической активности комбинации диабенола (25 мг/кг) с глибенкламидом (5 мг/кг) было выявлено усиление сахароснижающего эффекта входящих в ее состав компонентов. У интактных крыс, получавших комбинацию, регистрировалось достоверное снижение суммарной площади под кривой остаточного содержания глюкозы в крови на 35,9 % по сравнению со значениями, полученными в контрольной группе животных, что меньше таковых для глибенкламида и диабенола на 9,9 % и 27,7 % соответственно. У животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным диабетом, эффективность комбинации диабенола (12,5 мг/кг) с глибенкламидом (2,5 мг/кг) существенно превалировала по сравнению с эффективностью отдельных составляющих ее препаратов, о чем свидетельствует статистически значимое уменьшение суммарной площади под кривой остаточного содержания глюкозы в крови на 40,2 %, по сравнению с контрольными показателями и сокращение на 30 % и на 19,5 % относительно таковой для диабенола и глибенкла-

мида соответственно. Поэтому вполне вероятно полагать, что преобладание антидиабетической активности комбинации диабенола с глибенкламидом над активностью отдельно взятых препаратов, может быть связано с усилением секретогенного эффекта препаратов при их комбинированном введении.

При исследовании эффективности комбинации диабенол-метформин и комбинации диабенол-глибенкламид у животных со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным диабетом при курсовом введении наблюдалось снижение содержания глюкозы в плазме крови во всех экспериментальных группах. Было установлено, что комбинация диабенол-метформин, при применении в течение 28 дней, усиливает сахароснижающий эффект отдельных ее составляющих, что подтверждается сокращением суммарной площади под кривой остаточного содержания глюкозы в крови на 36,6% ( $p < 0,05$ ), которая на 26,6 % и на 26,9 % меньше таковой для метформина и диабенола соответственно. При курсовом введении комбинации диабенола в дозе 25 мг/кг с глибенкламидом в дозе 5 мг/кг крысам с патологией, также отмечалось увеличение гипогликемического действия составляющих комбинации. Это доказывается достоверным снижением суммарной площади под кривой остаточного содержания глюкозы в крови на 35,4 %, при этом полученные значения меньше таковых для глибенкламида и диабенола на 26,1 % и на 19 % соответственно.

Как известно, *показатель гликозилированного гемоглобина* имеет прямую зависимость от уровня глюкозы в крови и позволяет судить о компенсации углеводного обмена [Holman R.R., et al., 2008; Duckworth W., et al., 2009]. По результатам исследования было выявлено, что комбинация диабенол-метформин в большей степени нормализует углеводный обмен в ходе курсового введения, по сравнению с отдельно взятыми препаратами, о чем свидетельствует снижение содержания гликозилированного гемоглобина в крови животных на 29% ( $p < 0,05$ ) по отношению к контрольной группе крыс с СД.

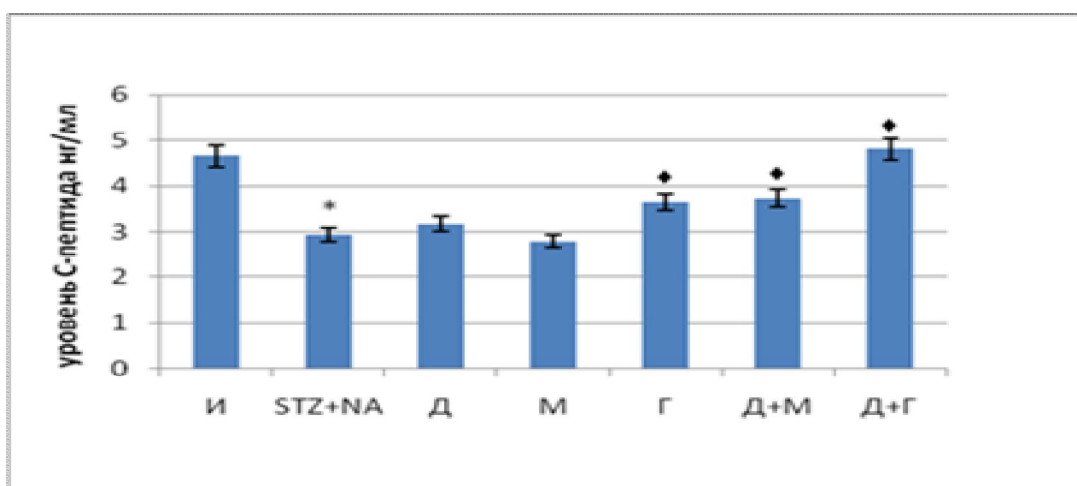
Под влиянием диабенола у крыс с диабетом к 28-му дню введения уровень HbA1c достоверно снижался на 18,5 % относительно контрольных значений. Метформин эффективнее диабенола уменьшал показатель HbA1c на 21 % ( $p \leq 0,05$ ) у крыс с патологией. Отмечалось усиление процессов регуляции, не исключено, что препараты могут влиять на реакцию Мейлорда. К концу курсового введения глибенкламида в крови животных с СД регистрировалось снижение уровня HbA1c на 21,8 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольными данными, что сопоставимо с эффективностью метформина. Применение комбинации диабенол-глибенкламид приводило к снижению содержания гликозилированного гемоглобина на 37,5 % ( $p < 0,05$ ), превосходя при этом активность отдельно взятых препаратов. Учитывая, что у крыс в эксперименте более выраженное снижение содержания HbA1c регистрируется одновременно с более интенсивным снижением количества сахара в крови после введения изучаемых комбинаций, и так как эти два процесса находятся в прямой зависимости друг от друга, то можно предположить, что применение комбинаций способствует нормализации углеводного обмена в большей степени, в отличие от отдельно взятых препаратов.

В ходе изучения механизма антидиабетического действия комбинаций диабенол-метформин и диабенол-глибенкламид были проведены эксперименты по изучению секретогенной активности указанных комбинаций. В группе животных, получавших только метформин (100 мг/кг), отмечалось незначительное уменьшение уровня С-пептида. Полученные данные согласуются с литературными о том, что положительное влияние метформина на углеводный обмен не сопровождается стимуляцией секреции инсулина [Foretz M., et al., 2010; Hundal R.S., et al., 2000; Zhou G., Myers R., et al., 2001]. В ранее проведенных исследованиях было установлено, что диабенол усиливает секрецию инсулина. Так, введение диабенола увеличивало концентрацию инсулина в портальной вене животных по сравнению с базальным уровнем [Дудченко Г. П., 2001]. Секретогенный эффект диа-

бенола подтвердили и в данной работе, у крыс с СД, получавших диабенол (25 мг/кг), к концу курсового введения уровень С-пептида повысился на 7,7 % по сравнению с контрольными показателями у животных с СД. В тоже время, комбинация диабенол-метформин эффективнее диабенола увеличивала уровень С-пептида в крови, превосходя его по активности на 17,7 %. Выявленное увеличение количества С-пептида в крови опытных животных, сочетающееся с сахароснижающим эффектом комбинации диабенола с метформином, вероятно, может явиться прямым доказательством инсулиотропного действия диабенола, основанного на стимулировании функционально способных  $\beta$ -клеток поджелудочной железы.

Было установлено, что глибенкламид при 4-недельном введении эффективнее диабенола влияет на содержание С-пептида в крови животных с СД, увеличивая уровень этого показателя на 23,7 % ( $p < 0,05$ ) относительно значений, полученных в контрольной группе крыс с СД. Комбинация же диабенол-глибенкламид восстанавливала содержание С-пептида до значений, полученных у интактных крыс, что было в 1,6 раза выше, чем у крыс с СД (рис. 8.2.).

Поэтому, вполне вероятно полагать, что более выраженное увеличение уровня С-пептида в крови животных с СД под воздействием комбинации связано с усилением секретогенного эффектов диабенола и глибенкламида. Так, секретогенный эффект диабенола достоверно увеличивается на 34 % при использовании его в комбинации с глибенкламидом. Согласно литературным данным, глибенкламид обладает наивысшей аффинностью к рецепторам  $\beta$ -клеток по сравнению с другими препаратами сульфонилмочевины и более эффективно стимулирует секрецию инсулина [Holstein A., et al., 2001; Patane G., Piro S., et al., 2000; Wang Q., et al., 2008].



**Рис. 8.2. Влияние диабенола (25 мг/кг), метформина (100 мг/кг), глибенкламида (5 мг/кг) и их комбинаций на содержание С-пептида в крови крыс со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным диабетом ( $M \pm m$ ). И – интактные, STZ+NA – стрептозотоцин-никотинамидный диабет, Д – диабенол, М – метформин, Г – глибенкламид; вертикальные штрихи соответствуют стандартной ошибке средней величины. \*Данные достоверны по отношению к контрольной группе интактных крыс; ◆данные достоверны по отношению к контрольной группе крыс с СД, t-критерий Стьюдента ( $p \leq 0,05$ )**

Показатели утилизации глюкозы, при применении комбинации диабенол-глибенкламид, уступали значениям активности диабенола в ходе проведения *перорального глюкозотолерантного теста*. Так, было зарегистрировано сокращение площади под кривой «концентрация глюкозы-время» на 37,7 % в группе крыс, получавших комбинацию, и на 53,1 % у животных с диабенолом по сравнению с контролем. При проведении ПГТТ было установлено, что комбинация диабенол-метформин, по выраженности действия на элиминацию глюкозы из периферического кровотока, превосходит диабенол и метформин. Комбинация снижала площадь под кривой «глюкоза-время» на 56 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем-диабетом, что

больше аналогичного показателя, выявленного после применения диабенола (-53,1 %) и превышает этот же показатель в группе, получавшей метформин (-43,1 %). Вероятно, это связано с повышением чувствительности периферических тканей к действию инсулина под влиянием метформина и стимулирующим эффектом диабенола на секрецию инсулина.

Наиболее значимая коррекция патогистологических изменений у крыс с СД наблюдалась после применения в течение 4 недель комбинации диабенол-глибенкламид. Указанная комбинация достоверно увеличивала количество  $\beta$ -эндокриноцитов в 1,6 раза относительно контрольных показателей, превосходя по активности диабенол и глибенкламид, способствовала умеренно выраженной гипертрофии ядер  $\beta$ -клеток, что может свидетельствовать о повышении их функциональной способности.

В ходе эксперимента у крыс с патологией были выявлены характерные для сахарного диабета метаболические нарушения: уменьшение содержания гликогена в печени на 34,3 % ( $p < 0,05$ ), достоверное снижение скорости гликолиза на 32,3 % и повышение скорости гликогенолиза на 36,8 % относительно аналогичных показателей в печени интактных крыс. Полученные данные согласуются с литературными [Кендыш И.Н., 1985; WuC., OkaD.A., 2005] о том, что при диабете, в чувствительных к инсулину тканях, блокируется гликолиз, синтез гликогена и возрастает глюконеогенез, гликогенолиз. Экспериментально было выявлено, что под действием диабенола (25 мг/кг) у крыс с СД достоверно повышалось содержание гликогена в печени в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ), усиливался гликолиз на 44,5 % и снижалась интенсивность гликогенолиза на 38,9% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с аналогичными показателями у контрольных животных. Повышение уровня аланина в крови на 35,7 % ( $p < 0,05$ ) у крыс с СД на фоне применения диабенола, вероятно, может свидетельствовать об ингибировании глюконеогенеза в печени, так как аланин, пируват, лактат являются предшественниками глюкозы в процессе глюконео-

генеза [Ткачук В. А., 2004]. При введении метформина (100 мг/кг) отмечалось увеличение содержания гликогена в печени в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ) и повышение скорости гликолиза на 13,4 %, снижение скорости гликогенолиза на 45,5 % ( $p < 0,05$ ) относительно контрольных значений. Кроме того, у животных, получавших метформин, регистрировалось повышение молочной кислоты на 34,4 % и аланина на 31,3 % по сравнению с контрольной группой крыс с СД, что объяснимо способностью метформина подавлять глюконеогенез из таких предшественников глюкозы, как лактат, пируват, глицерол, аланин вследствие торможения поступления перечисленных субстратов глюконеогенеза в гепатоциты и ингибирования его ключевых ферментов – пируваткарбоксилазы, фруктозо-1,6-бифосфатазы и глюкозо-6-фосфатазы [Patane G., et al., 2001]. По данным [Zhou G. et al., 2001], метформин ингибирует скорость образования глюкозы печенью и стимулирует ее поглощение мышцами, селективно изменяя активность цАМФ-киназы в указанных тканях. Комбинация диабенол-метформин эффективнее отдельно взятых препаратов увеличивала содержание гликогена в печени в 2,7 раза ( $p < 0,05$ ) и блокировала скорость гликогенолиза на 53,5% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями у контрольных крыс с СД, также на фоне введения комбинации отмечалось более выраженное повышение уровня аланина в крови (на 43,0 %), на основании чего можно предполагать, что комбинация диабенола с метформином в большей степени нормализует метаболические нарушения у крыс с СД в отличие от отдельных препаратов.

Увеличение содержания гликогена в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) в печени крыс с СД, получавших курсовое введение глибенкламида (5 мг/кг), может быть связано с периферическим действием глибенкламида, которое объясняется увеличением количества рецепторов к инсулину и повышением их аффинности [Балаболкин М. И., 2005], в свою очередь, это сопровождается снижением скорости образования глюкозы печенью, о чем свидетельствует повышение уровня аланина в крови на 38,6% ( $p < 0,05$ ) под влиянием глибенкламида. На фоне введения

комбинации диабенол-глибенкламид в печени больных СД животных наблюдалось усиление интенсивности гликолиза в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ) более выраженное, чем при введении диабенола (+44,5 %) и глибенкламида (+26,5 %). Возможно, данный эффект связан с панкреатическим действием глибенкламида и экспериментально выявленным внепанкреатическим влиянием диабенола (табл. 8.2) В условиях инсулинорезистентности диабенол улучшал утилизацию глюкозы периферическими тканями на моделях ожирения и экзогенной гиперинсулинемии [Дудченко Г. П., 2001].

Таблица 8.2

**Влияние диабенола (25 мг/кг), метформина (100 мг/кг), глибенкламида (5 мг/кг) и их комбинаций на метаболические нарушения при стрептозотоцик-никотинамид-индуцированном диабете ( $M \pm m$ )**

Экспериментальные группы	Гликоген, мг/г ткани	Гликолиз, мкмоль/л/мин/мг белка	Гликогенолиз, мкмоль/л/мин/мг белка	Лактат, мг, %	Аланин, ммоль/л
Интактные	11,56±2,28	16,15±1,45	59,36±3,84	12,82±1,07	75,69±2,62
Стрептозотоцик-никотинамидный диабет	7,60±1,27*	10,94±1,03*	81,19±6,09*	15,70±2,71*	52,72±2,53*
Диабенол	13,61±3,02 <sup>♦</sup>	15,81±1,73	49,6±3,92 <sup>♦</sup>	15,76±0,79	71,56±4,36 <sup>♦</sup>
Метформин	13,56±5,48 <sup>♦</sup>	12,41±1,17	44,26±3,87 <sup>♦</sup>	21,11±1,16 <sup>♦</sup>	69,27±3,34 <sup>♦</sup>
Диабенол+ Метформин	20,33±2,33 <sup>♦</sup>	10,65±1,04	37,76±3,44 <sup>♦</sup>	9,33±2,4 <sup>♦</sup>	75,38±3,43 <sup>♦</sup>
Глибенкламид	15,9±4,53 <sup>♦</sup>	13,85±1,3	62,38±3,96	11,0±1,45 <sup>♦</sup>	73,08±1,57 <sup>♦</sup>
Диабенол+ Глибенкламид	15,93±3,35 <sup>♦</sup>	20,21±1,92 <sup>♦</sup>	53,10±3,57 <sup>♦</sup>	9,66±2,13 <sup>♦</sup>	60,94±2,8 <sup>♦</sup>

\* Достоверно по сравнению с группой интактного контроля;

<sup>♦</sup> достоверно по сравнению с группой экспериментального диабета.



Важно при создании новых препаратов изучать их влияние на реологические свойства и тромбогенный потенциал крови, а также исследовать их антиатерогенную активность.

Так, было установлено, что комбинация диабенол-метформин уменьшает вязкость крови, несколько превосходя по активности диабенол и метформин, особенно на высоких скоростях сдвига. О снижении выраженности основных проявлений гиперагрегации тромбоцитов, после курсового введения комбинации диабенола с метформинном, свидетельствует достоверное уменьшение величины степени агрегации на 44,7 %, уступающей эффективности диабенола (-60,6 %). При этом отмечена тенденция нормализации коагуляционного гемостаза при применении комбинации. Уменьшение уровня агрегации тромбоцитов может свидетельствовать о снижении их функциональной активности, что препятствует развитию сосудистых осложнений при СД [Балаболкин М. И. и др., 2005]. В ранее проведенных исследованиях [Спасов А.А., Дудченко Г.П., 1997; Спасов А.А., Турчаева А.Ф., 1995; Спасов А.А., Кучерявенко А. Ф., 2009] диабенол, в условиях выраженных гемореологических расстройств при СД, улучшал такие показатели как вязкость крови, агрегацию и деформируемость эритроцитов, агрегацию тромбоцитов. К тому же, входящий в состав комбинации метформин положительно влияет на систему свертывания крови, повышая фибринолитическую активность, достоверно уменьшая активность ингибитора активации плазминогена и концентрацию фибриногена, а также снижая агрегационную активность тромбоцитов [Чазова И.Е. и др., 2003]. Также метформин уменьшает деформируемость эритроцитов и их агрегацию, вязкость, улучшает фильтрационную способность и флюидность эритроцитарной мембраны [Muller S. et al., 1997].

Таким образом, эффекты, выявленные при применении комбинации диабенола с метформинном, могут способствовать снижению вероятности возникновения изменений в микроциркуляторном русле и отдаленных сосудистых последствий СД.

Как правило, при СД 2 типа нарушения углеводного обмена сочетаются с выраженными изменениями липидного обмена [Балаболкин М.И. и др., 2005]. В данном исследовании было выявлено выраженное снижение содержания  $ХС_{общ}$  в плазме крыс с СД на 36,9 % ( $p < 0,05$ ) после введения комбинации диабенол-метформин, при этом действие комбинации превосходило эффект компонентов в отдельности (диабенол снижал уровень  $ХС_{общ}$  на 13%, метформин - на 26,5 %). По исследованиям С.А. Бутровой, (2001) установлено, что метформин оказывает гиполлипидемическое действие у лиц с метаболическим синдромом как при нарушении углеводного обмена, так и при нормальной толерантности к глюкозе. Считается, что под действием метформина снижается активность ключевых ферментов синтеза холестерина: оксиметил-глутарил-КоА и оксиметил-глутарил-КоА-синтетазы [Шубина А. Т. и др., 2001]. Кроме того, на фоне применения метформина замедляется интестинальная абсорбция липидов и несколько повышается липолиз. Регистрируемая, при курсовом применении комбинации диабенол с метформином, нормализация липидного спектра крови животноных уменьшает риск изменений морфологической структуры сосудов и возникновения микро- и макроангиопатий, способствует ингибированию липотоксичности. Антиагрегантный эффект в отличие от диабенола, достоверно снижая степень агрегации тромбоцитов в 2,7 раза относительно контрольных показателей у крыс с СД. Так же, указанная комбинация в большей степени нормализовала липидный обмен, чем её компоненты, что подтверждалось достоверным снижением содержания  $ХС_{общ}$  на 21,5 %, увеличением  $ХС_{ЛПВП}$  на 36,4 % и эффективным снижением ИА у больных животных на 59,3 % ( $p < 0,05$ ) относительно диабетического контроля.

### 8.3. Заключение

На основании проведенных исследований было установлено, что при однократном введении комбинаций диабенола (25 мг/кг) с метформином (100 мг/кг) и диабенола (25 мг/кг) с глибенкламидом

(5 мг/кг) отмечалось усиление гипогликемического действия как у интактных крыс, так и у крыс со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным диабетом. При курсовом введении комбинаций диабенола (25 мг/кг) с метформином (100 мг/кг) и диабенола (25 мг/кг) с глибенкламидом (5 мг/кг) крысам со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным диабетом также наблюдалось усиление антидиабетического эффекта. При этом следует отметить, что комбинация диабенол-глибенкламид восстанавливала содержание С-пептида до уровня, полученного у интактных крыс, и более выражено повышала количество  $\beta$ -эндокриноцитов поджелудочной железы, а комбинация диабенол-метформин оказывала значительное влияние на метаболические процессы, контролируемые инсулином, восстанавливая содержание гликогена в печени и блокируя гликогенолиз у крыс с СД.

Исследования, описанные в данной главе, выполнены в Волгоградском государственном медицинском университете при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-25-00139).

# ГЛАВА 9

## ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ И ПУТИ ЕГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

*А. А. Спасов, Н. И. Чепляева, Г. Л. Снизгур*

---

Повышение концентрации глюкозы в плазме и инсулинзависимых тканях, является одним из основных факторов увеличивающих генерацию свободных радикалов, что приводит к образованию и накоплению цитотоксичных соединений, усиливающих процессы некроза и апоптоза, и снижению уровня естественных антиоксидантов. Следует отметить, что снижение уровня глюкозы до оптимального уровня не обеспечивает полной нормализации свободнорадикальных процессов [Панкратова М.А., 2006]. Это объясняет так называемый феномен «гипергликемической памяти», связанный с развитием поздних диабетических осложнений даже при достижении стабильных значений глюкозы крови. В многоцентровых рандомизированных клинических испытаниях продемонстрировано, что только после 6,5 лет интенсивной терапии сахарного диабета (СД) типа 1 заметно снижается риск развития ретинопатии [Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy: The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group, 2000]. «Гипергликемическая память» связана с процессами неферментативного гликозилирования белков и липидов. Есть мнение, что свободные радикалы активируют сериновое фосфорилирование каркасного белка IRS – субстратаинсулинового рецептора и нарушают действие инсулиново-

го рецептора [Ткачук В.А., Воротников А.В., 2014]. В то же время доказано, что свободные радикалы поддерживают инсулиновую сигнализацию и повышают чувствительность к инсулину в адипоцитах [Mahadev K., et al., 2001]. Это противоречие позволило предположить наличие, так называемого, «редокс-парадокса» в инсулиновой системе передачи сигнала [Goldstein B.J., et al., 2005].

Дикарбонильный интермедиант, продукт гликирования белков, метилглиоксаль модифицирует белки митохондриальной цепи переноса электрона, что приводит к гиперпродукции супероксид-аниона, повреждению ДНК и апоптозу клетки. Необходимо отметить, что усиление генерации свободных радикалов гликированными митохондриальными протеинами в дальнейшем уже не зависит от уровня глюкозы [Ceriello A., 2009]. Клетки поджелудочной железы чувствительны к токсическому действию свободных радикалов, что связано со сниженной активностью основных ферментов антиоксидантной системы цитоплазматической и митохондриальной супероксиддисмутаза (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГП) [Robertson R.P., 2007]. Таким образом, гипергликемия увеличивает свободнорадикальные процессы, приводящие к апоптозу и некрозу в островках Лангерганса, а неспособность к инсулиносекреторной функции более усугубляет течение диабета и окислительных процессов, и, таким образом, возникает порочный круг.

## **9.1. Источники свободных радикалов при сахарном диабете**

Условно можно выделить три основных источника свободных радикалов при сахарном диабете (СД): неферментативные, ферментативные и митохондриальные.

**Неферментативные источники.** Непосредственно при аутоокислении глюкозы генерируется гидроксильный радикал [Bonfont-Rousselot D., 2000].

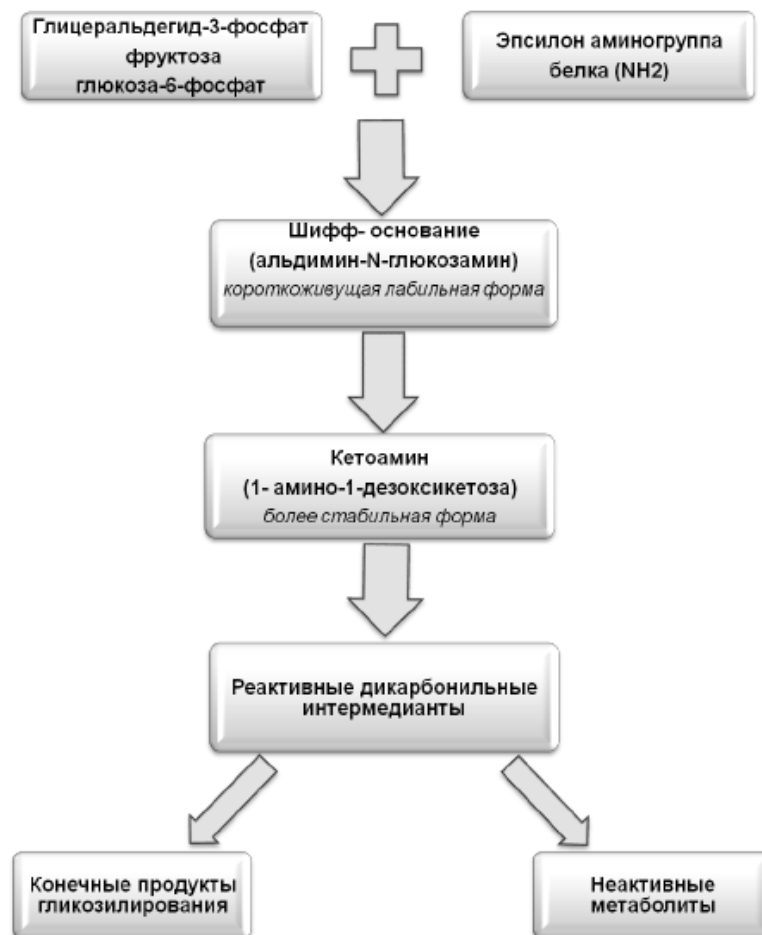
При СД повышается метаболизм глюкозы через полиоловый (сорбитоловый) путь с увеличением продукции супероксид-аниона. Под влиянием альдозоредуктазы глюкоза превращается в сорбитол, который окисляется во фруктозу, при участии сорбитолдегидрогеназы. Для функционирования альдозоредуктазы необходим НАДФН. Усиление полиолового пути приводит к истощению запасов НАДФН и, как следствие, снижению активности глутатионредуктазы и восстановленного глутатиона, основных факторов защиты от повреждающего действия свободных радикалов [Bonfont-Rousselot D., 2000; Pitocco D., 2013].

Гликирование обусловлено способностью глюкозы образовывать с аминокетонами белков/ДНК интермедианты, которые являются исходным материалом для образования необратимых в химических реакциях конечных продуктов гликозилирования (КПГ) [Дедов И.И., 2003]. Гликирование белков и образование КПГ – сложная цепь метаболических процессов, сопровождающаяся продукцией реактивных интермедиантов в ходе всех этапов. На первом этапе гликирования (рис. 9.1) образуется альмидина N-гликозиламин, лабильное и обратимое соединение.

При условии сохранения повышенного уровня глюкозы образуется вещество амадори (1-амино, 1-деоксикетоза), стабильная форма, которая окисляется в реактивные дикарбонильные интермедианты. Дикарбонильные соединения включают такие продукты как 3-диоксиглюкозон, глиоксаль, метилглиоксаль [Rahbar S., 2003].

3-Диоксиглюкозон формируется при неокислительной перестройке и гликолизе продукта амадори, быстро реагирует с аминокетонами белков с образованием имидазолна, пирралина и карбоксиметиллизина. Метилглиоксаль продуцируется неферментативным путем при спонтанном разложении триозофосфатов, аутоокислении карбоксигидратов, а также несколькими минорными метаболическими путями (реакция Мейлорда). Метилглиоксаль связывается с остатками лизина белков с образованием карбоксиэтиллизина, ди-

меров митилглиоксаль-лизин, имидазолиновых сшивок. Образование глиоксаля происходит при окислительном распаде оснований Шиффа, возможно при реакции пероксинитрита с глюкозой. Продукция глиоксаля сопровождается формированием множества КПГ, в том числе карбоксиметиллизина, глиоксаль-лизин димера [Rahbar S., 2003; Turk Z., 2010].



**Рис. 9.1. Гликирование белков**

Повреждающее действие КПГ связано с тем, что внутриклеточные модифицированные белки теряют функциональную активность, гликирование протеинов межклеточного матрикса приводит к аномальному связыванию с интегринами других клеток, КПГ при связы-

вании со специфическими рецепторами активируют рецептор-опосредованную продукцию свободных радикалов [Rahbar S., 2003].

Карбоксиметиллизин и карбоксиэтиллизин связываются с ионами меди /железа с формированием гликохелатов. Данные комплексы вступают в реакцию с перекисью водорода с образованием гидроксильного радикала [Rahbar S., 2003; Turk Z., 2010].

В физиологических условиях только небольшое количество дикарбонильных интермедиантов превращается в КПП, так как они метаболизируются и инактивируются глутатионзависимой глиоксалевой системой. Глиоксалевая система также включает НАДФН-зависимую оксоальдегидредуктазу и альдозоредуктазу. Фруктозоамин-3-киназа фосфорилирует остатки фруктозолизина, катализирует реакцию обратной перестройки Амадори, что приводит к декомпенсации на ранней стадии диабета. Нарушение детоксикации дикарбонильных интермедиантов с участием глиоксалевой системы приводит к формированию осложнений при СД [Rahbar S., 2003].

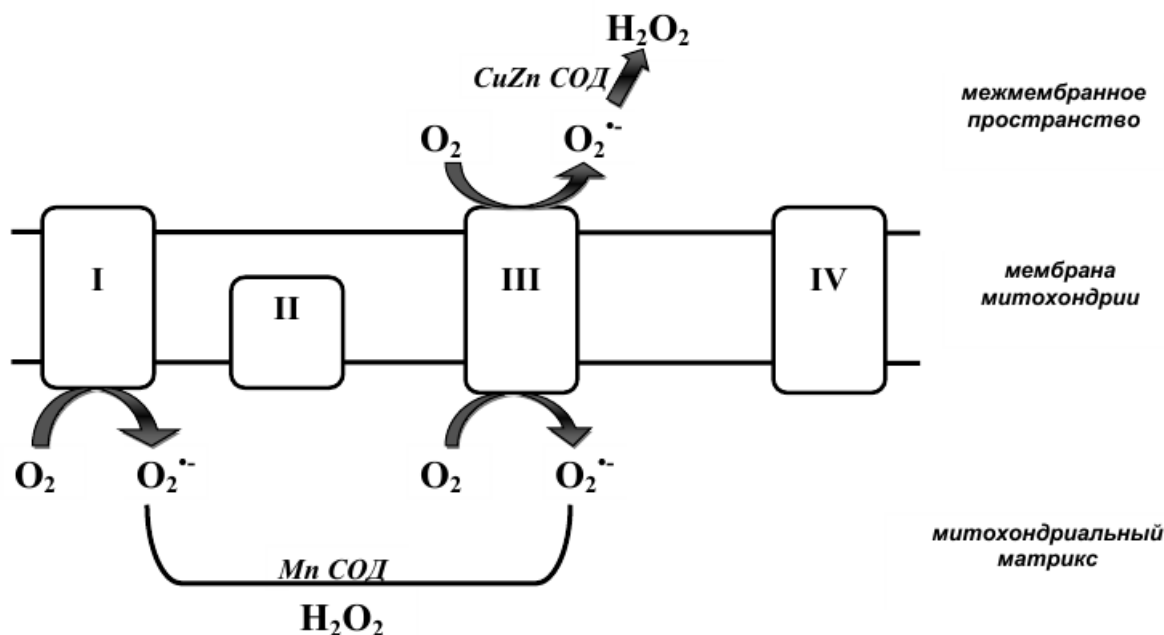
**Митохондриальные источники.** Четыре основных пути которые приводят к гиперпродукции супероксид-аниона в митохондриальной дыхательной цепи: формирование КПП, активация протеинкиназы С, гексаминозный шунт, повышение полилового метаболизма глюкозы [Bonnefont-Rousselot D., 2000; Дедов И.И., 2003].

Процесс окислительного фосфорилирования и переноса электронов от НАДН к ФАДН<sub>2</sub> через четыре комплекса встроенных в митохондриальную мембрану сопровождается генерацией супероксид-аниона, который в физиологических условиях инактивируется антиоксидантной системой (рис. 9.2) [Тодоров И.Н., 2007].

В цепи переноса электронов выделяют две области, где генерируются активные формы кислорода, комплекс I (НАДН-дегидрогеназа) и комплекс III (убихинол-цитохром с-редуктаза). В ходе экспериментов установлено, что комплекс I продуцирует супероксид-анион внутримитохондриально, а комплекс III в митохондриальный матрикс и цитоплазму клетки, это важно, так как супероксид-анион



не диффундирует через мембрану [Lamson D.W., 2002; Szeto H.H., 2006]. Повышение при гипергликемии скорости гликолиза приводит к излишней продукции пирувата (главного источника ацетил КоА – донора электронов и протонов в митохондриальную дыхательную цепь) и вызывает усиление продукции супероксид-аниона в цепи переноса электронов [Johansen J.S., 2005].



**Рис. 9.2. Генерация супероксид-аниона в митохондриальной дыхательной цепи**

**Ферментативные источники.** Согласно, Guzik повышенная продукция супероксид-аниона эндотелием сосудов при сахарном диабете связана именно с активностью НАДФН оксидазы [Guzik T.J., et al., 2002]. НАДФН оксидаза состоит из мембрансвязанных субъединиц  $gp\ 91^{phox}$  (Nox 2)/ Nox 1/ Nox 4 и  $p\ 22^{phox}$  и трех каталитических субъединиц  $p\ 47^{phox}$ ,  $p\ 67^{phox}$ ,  $p\ 40^{phox}$  [Guzik T.J., 2002; Gorin Y., 2013]. Изоформы НАДФН оксидазы отличаются по тканевой локализации, так Nox 2 преимущественно представлена в эндотелии и адвентиции, Nox 1 и/или Nox 4 в мышечных клетках сосудов, что учитывается при

поиске и создании новых антиоксидантных препаратов [Gorin Y., 2013]. р 22<sup>phox</sup> субъединица представлена во всех изоформах фермента и необходима для его нормального функционирования. После фосфорилирования р 47<sup>phox</sup> связывается с остальными компонентами комплекса, мигрирует к мембране и связывается с цитохромом и осуществляет транспорт электронов от НАДФН с кислороду с формированием супероксид-аниона [Pongnimitprasert N., 2009; Guzik T.J., 2002]. НАДФН оксидазу при СД активируют следующие факторы: КПГ, окисленные ЛПНП, неэстерифицированные жирные кислоты, инсулин, ангиотензин II, эндотелин-1. [Pongnimitprasert N., 2009; Blocka K., 2009].

Супероксид-анион способен отдавать неспаренный электрон NO с образованием сильного окислителя и цитотоксина пероксинитрита [Johansen J.S., 2005]. Пероксинитрит взаимодействует с сульфгидрильными группами белка, инициирует перекисное окисление липидов (ПОЛ), нитрирует аминокислоты (нитротирозин), вызывает поломки в молекулах ДНК. Нарушения структуры ДНК активируют ядерный фермент поли-(АДФ-рибозо)-полимеразу которая при репарации замещает дефектное основание хвостом из поли-АДФ-рибозы [Pacher P, 2005]. Этот процесс происходит с расходом НАД и АТФ, что при огромном количестве мутаций, вызванных пероксинитритом, ведет к истощению клеточного пула НАД и некрозу клетки. Кроме того, пероксинитрит окисляет кофактор NO синтазы тетрагидробиоптерин, при дефиците которого фермент начинает синтезировать супероксид-анион, а не NO. Гипергликемия через активацию NF-κB повышает экспрессию индуцированной NO синтазы. Доказано участие индуцированной NO синтазы в ускорении апоптоза β-клеток островка поджелудочной железы [Johansen J.S., 2005]. Снижение концентрации NO приводит к нарушению регуляции тонуса сосудов и эндотелиальной дисфункции [Johansen J.S., 2005; Pitocco D, 2013].

## 9.2. Роль свободных радикалов в прогрессировании дисфункции $\beta$ -клеток и инсулинорезистентности

В клетках поджелудочной железы, продуцирующих инсулин, содержание антиоксидантных ферментов в среднем ниже, чем в печени, мышцах, почках, сердце, мозге и других органах [Чистяков Д.А., 2000]. Активность цитоплазматической Cu/Zn-зависимой, митохондриальной Mn-зависимой СОД и каталазы в 4 раза ниже, чем в ткани в печени, поэтому,  $\beta$ -клетки чувствительны к повреждающему действию свободных радикалов [Robertson R.P., 2004]. Гипергликемия усиливает продукцию свободных радикалов, что приводит к снижению экспрессии генов и синтеза инсулина и апоптозу. В экспериментах продемонстрировано, что экспозиция линии  $\beta$ -клеток и изолированных островков поджелудочной железы с активными формами кислорода приводит к супрессии активности промотера гена инсулина и снижению экспрессии мРНК. Также заметно уменьшается ДНК-связывающая способность транскрипционных факторов PDX-1 и/или MafA с промотором гена инсулина. PDX-1 играет центральную роль в процессах дифференцировки  $\beta$ -клеток и поджелудочной железы, а MafA является специфичным для  $\beta$ -клеток транскрипционным фактором и активатором транскрипции гена инсулина [Ceriello A., 2009]. Снижение активности PDX-1 связано с усилением его ядерно-цитоплазматической транслокации при участии c-JunN-концевой киназы (JNK) под действием свободных радикалов. Кроме того, активные формы кислорода и активация JNK индуцируют ядерную транслокацию Foxo-1 и как следствие транслокацию PDX-1 и снижение ДНК-связывающей способности [Kawahito S, 2009].

Активация JNK под влиянием свободных радикалов выполняет важную роль не только в развитии дисфункции  $\beta$ -клеток, но и в формировании инсулинорезистентности печени, мышц и жировой ткани. Гиперэкспрессия JNK повышает фосфорилирование серина в IRS-1

(субстрат инсулинового рецептора), что приводит к подавлению сигнального пути инсулина [Kaneto H., 2010].

NF- $\kappa$ B одна из главных внутриклеточных мишеней при гипергликемии и окислительном стрессе. NF- $\kappa$ B активируется экзогенными и эндогенными стимулами, включая гипергликемию, повышенный уровень свободных жирных кислот, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и другими провоспалительными цитокинами, p38 MAPK, при повреждении ДНК, УФ-лучами и др. NF- $\kappa$ B играет ключевую роль в реакции воспаления, иммунном ответе и апоптозе [Evans J.L., 2002]. В покоящихся клетках NF- $\kappa$ B находится в цитоплазме в виде неактивного гетеродимера, состоящего из субъединиц p50 и p65 и ингибиторного белка I $\kappa$ B. При стимуляции активируется каскад сериновых протеаз включая NIK (NF- $\kappa$ B индуцирующая киназа) и NAK (NF- $\kappa$ B активирующая киназа), который фосфорилирует I $\kappa$ B киназу. I $\kappa$ B киназа гетеротримерный комплекс, состоящий из двух каталитических субъединиц IKK1, IKK2 и регуляторной субъединицы IKK $\gamma$ . Важным этапом в регуляции активации NF- $\kappa$ B является фосфорилирование I $\kappa$ B киназой. Высвободившийся NF- $\kappa$ B гетеродимер транслоцируется в ядро связывается с ДНК и регулирует экспрессию генов, в том числе фактора роста (VEGF), провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) и др. [Surh Y-J., 2005].

Однако только замена в сайте IKK2 полностью предотвращает активацию данной киназы. IKK2, NIK и NAK являются универсальными молекулярными мишенями для создания новых антиоксидантных препаратов [Evans J.L., 2002].

В ответ на гипергликемию активируется не только NF- $\kappa$ B, но и ряд стресс-активируемых факторов из суперсемейства MAP серин/треониновых протеинкиназ, таких как p38 MAPK и JNK [Evans J.L., 2002; Wright C.J., 2008]. Активированные JNK/SAPK киназы связываются и фосфорилируют транскрипционный фактор c-Jun, который является одним из компонентов комплекса AP-1 транскрипционных факторов. Данные процессы усиливают экс-

прессию генов с AP-1 распознающими сайтами [Kaneto H, 2010; Evans J.L., 2002].

КПП принимают непосредственное участие в экспрессии генов, ответственных за образование различных белков, принимающих участие в развитии окислительного стресса и формировании поздних осложнений сахарного диабета. Расшифрован механизм экспрессии генов под влиянием КПП. Вначале указанные соединения связываются со специфическими КПП-рецепторами, локализованными на моноцитах, макрофагах, эндотелиальных и других клетках, которые опосредуют трансдукцию этого сигнала посредством увеличения образования свободных радикалов кислорода. Рецептор КПП представитель семейства иммуноглобулинов, основными лигандами которого являются КПП,  $\beta$ -амилоид, белки семейства S100 кальгранулина – S100A12 и S100b, протеин HMGB-1, галектин-3, амфотерин [Ahmed N., 2009]. Все лиганды комплементарно связываются V типом доменов иммуноглобулина. Взаимодействие КПП с рецептором изменяет экспрессию молекул адгезии, провоспалительных цитокинов, синтез коллагена в фибробластах, миграцию, пролиферацию и экспрессию матрикса в гладкомышечных клетках сосудов, хемотаксис и экспрессию провоспалительных/протромботических молекул в мононуклеарных фагоцитах, пролиферацию и продукцию IL-2 в лимфоцитах [Thomas M.C., 2005]. Сигнальные каскады, активируемые при лиганд-рецепторном взаимодействии, включают такие пути как p21 ras, erk1/2 (p44/p42) MAP киназы, p38 и JNK/SAPKMAP киназы, про-ГТФазы, фосфоинозитол-3 киназу, JNK/STAT и как следствие активируется NF-kB [Ramasamy R., 2005].

Рациональная пероральная сахароснижающая терапия СД 2 типа и адекватный контроль уровня глюкозы ограничивают свободнорадикальные процессы и снижают риск сосудистых осложнений [Шестакова М.В., 2011]. Кроме того, у некоторых препаратов выявлено антиоксидантное действие, так, Nodaи соав. в экспериментах *in vitro* продемонстрировали наличие свойств скавенджера супероксид-

аниона, гидроксильного радикала у гликлазида [Noda Y., 2000; Sikora A., 2006]. В исследованиях *invivo* показано наличие некоторых антиоксидантных эффектов у метформина, данный препарат повышает сниженный уровень глутатиона у диабетических животных, уменьшает образование метилглиоксаля у больных сахарным диабетом типа 2. Антиоксидантные свойства обнаружены и у группы инсулинсенситайзеров, например, розиглитазон снижает НАДН – индуцированную продукцию свободных радикалов и повышает активность каталазы [Ceolotto G., 2007; Iida K.T., 2003; Kinoshita H., 2006]. Троглитазон, который имеет комбинированную химическую структуру тиазолидиндиона и  $\alpha$ -токоферолподобный участок (хромаффинное кольцо), согласно экспериментальным данным уменьшает ПОЛ при галактозиндуцированном катарактогенезе, ингибирует медь-индуцированное окисление ЛПНП [Ruhe R.C., 2001]. Исследован спектр антиоксидантного действия пероральных сахароснижающих препаратов и нового гипогликемического препарата диабенола. В экспериментах *in vitro* диабенол дозозависимо ингибировал образование супероксид-аниона, гидроксильного и пероксильного радикалов, но не оказывал значимого влияния на процесс генерации липидных гидроперекисей, росиглитазон малеат активен только в отношении супероксид-аниона. Метформин и глибенкламид не влияют на свободнорадикальные процессы в модельных системах *in vitro* [Чепляева Н.И., 2011].

Предупреждение гликирования белков является одним из значимых направлений терапии осложнений СД, которое позволит ограничить карбонильный стресс. Ингибиторы гликозилирования – группа лекарственных веществ, способных препятствовать образованию реактивных дикарбонильных интермедиантов и КПП, применяемых в качестве средств для профилактики осложнений диабета.

Первым веществом, которое ингибировало гликирование белков в экспериментальных исследованиях, был аминоксантидин. Аминоксантидин – гидразиноподобная молекула, нуклеофильный компонент,

ловушка для карбонильных интермедиантов (метилглиоксаль, глиоксаль, 3-дезоксиглюкоза), тормозит образование карбоксиметиллизина, поперечных сшивок в белке. Аминогуанидин также является ингибитором NO синтазы. Однако у аминогуанидина было обнаружено большое количество побочных эффектов пернициозная анемия, канцерогенность в высоких дозах, высокая частота возникновения опухолей почек и поджелудочной железы, что заставило прекратить клинические испытания данного препарата [Thomas M.C., 2005; Rahbar S., 2003].

Синтезировано большое количество веществ со свойствами ингибиторов гликирования: диаминофеназин, ALT-946, OPB-9195. OPB-9195 – производное тиазолидинов, применяемое как гипогликемическое вещество, также является ловушкой для карбонильных интермедиантов и снижает концентрацию плазменных и тканевых депозитов КПГ. При экспериментальном диабете OPB-9195 предотвращает прогрессирование гломерулосклероза [Thomas M.C., 2005].

Свойства ингибиторов КПГ обнаружены у витаминов группы В и их производных. Тиамин тормозит основные метаболические процессы, формирующие патологические изменения клеточных структур и сосудистой стенки, образование КПГ из метилглиоксаля, активность протеинкиназы С и нуклеарного фактора NF-κB. Получен жирорастворимый аналог тиамина – бенфотиамин, у которого способность проникать внутрь клеток намного выше. Бенфотиамин оказывает влияние на метаболические процессы в клетках за счет превращения в физиологически активное соединение тиамина дифосфат [Строков И.А., 2006; Thomas M.C., 2005].

Пиридоксамин – скавенджер реактивных карбонильных продуктов глюкозы и окисленных липидов, снижает уровень КПГ, нормализует почечную дисфункцию при экспериментальном сахарном диабете [Rahbar S., 2003]

Rahbar и др. провели поиск новых ингибиторов гликирования среди ароматических соединений, производных арилуреидо-, арил-

карбоксамидофеноксиизобутиловых кислот. Данной группой исследователей выявлено, что LR-20, LR-74, LR-90 и LR-102 ингибирует образование интермедиантов на этапах после форм Амадори. LR-90 в экспериментах *in vivo* снижал количество конечных продуктов гликирования в сыворотке, предотвращал прогрессирование гломерулосклероза и отложения депозитов КПГ в почках [Rahbar S., 2003].

Способность блокировать гликирования выявлена у метформина, пиоглитазона и пентоксифиллина в экспериментах *in vitro* [Строков И.А., 2006]. Метформин оказывает эффект на поздние процессы гликирования (пост-Амадори), является ловушкой для метилглиоксала и карбониллов [Rahbar S., 2000; Строков И.А., 2006; Weiswenger P., 2003]. Ингибирующая активность обнаружена у Д-пенициламина, ацетилсалициловой кислоты, ибупрофена, индометацина, диклофенака. Некоторые субстанции, выделенные из растений, ресвератол (3, 4, 5-тригидроксикверцетин), куркумин, фитоэстрогены, полученные из винограда обладают способностью ингибировать гликирование белков [Rahbar S., 2003].

Таким образом, назначение веществ, которые выступают в качестве элиминаторов метаболитов гликирования и ПОЛ, позволяет предотвратить модификацию структуры белков, липидов и ограничить продукцию свободных радикалов.

Компенсация сахарного диабета приводит лишь к ослаблению, но не полному устранению признаков окислительного стресса. Пациенты с сахарным диабетом 2 типа нуждаются в проведении антиоксидантной терапии независимо от уровня гликемии, при этом доза антиоксидантов должна зависеть от степени выраженности окислительного стресса [Srivatsan R., 2009; Занозина О.В., 2006].

### **9.3. Антиоксиданты в терапии сахарного диабета**

Биологическая активность антиоксидантов зависит от следующих факторов: структуры, физико-химических свойств и патологиче-



ского состояния, сопряженного с генерацией свободных радикалов [Зайцев В.Г., 2003].

Гидрофильные антиоксиданты оказывают свое действие в плазме, межклеточной жидкости, на внеклеточном уровне и представляют первую линию защиты от окислительного стресса. Так как клеточная мембрана состоит из фосфолипидов, вторая линия защиты представлена жирорастворимыми молекулами. Защита от повреждающего действия свободных радикалов внутриклеточных структур осуществляется соединениями, которые могут растворяться как в воде, так и в липофильной среде, поскольку они сначала должны проникнуть через клеточную мембрану, а затем лишь раствориться в цитозоле [Дедов И.И., 2003; Зайцев В.Г., 2003].

Селен является компонентом фермента ГП, остаток селеноцистеина в активном центре фермента окисляет пероксинитрит или пероксильный радикал и превращается в селеновую кислоту, которая восстанавливается в селенол с расходом двух восстановительных эквивалентов глутатиона. Подобно ГП в пероксидазную реакцию могут вступать низкомолекулярные органические селеновые и теллурические компоненты. Селенометионин защищает от разрывов ДНК, индуцированных пероксинитритом, и предотвращает окисление и нитрирование клеточных компонентов [Lu S. C., 2009]. Проведены рандомизированные плацебо-контролируемые исследования по влиянию селена в дозе 200 мкг в день на частоту случаев СД в течение 7,7 лет. В результате получены данные о том, что применение селена не предотвращает развитие СД [Stranges S., 2007].

Витамин Е – основной компонент защиты клеточных и субклеточных мембранных фосфолипидов от свободнорадикального окисления. Связываясь с липоперекисями, он превращается в хроматоксильный радикал, который может инициировать ПОЛ [Дедов И.И., 2003]. Регенерация витамина Е осуществляется двумя путями: взаимодействием феноксильных радикалов или восстановлением аскорбиновой кислотой. Витамин Е предупреждает образование конечных

продуктов ПОЛ, стабилизирует плазматические мембраны клеток и лизосом, способствуя тем самым сохранению их целостности и функциональной активности. Однако витамин Е не влияет на процессы продукции радикалов митохондриальной дыхательной цепью [Guerrero-Romero F., 2005].

Применение витамина Е в терапии СД способствует защите от окисления ЛПНП, препятствует атерогенезу и формированию поздних осложнений [Wu J.H., 2007]. Согласно Jialal терапия витамином Е пациентов с СД в течение трех месяцев в дозе 1200 ЕД в сутки уменьшала продукцию свободных радикалов и липидных перекисей в циркулирующих моноцитах [Jialal I., 2001]. В контролируемых исследованиях показано, что комбинированное введение витамина Е (1000 МЕ в сутки) и витамина С (1000 мг в сутки) значительно снижало уровень маркера ПОЛ, 8-изопростана [Rizzo M.R., 2008]. У большинства больных СД типа 2 наблюдается дефицит витамина Е; назначение пациентам  $\alpha$ -токоферола ежедневно по 400 МЕ в течение 8 недель способствовало снижению образования продуктов ПОЛ, диеновых конъюгатов и перекисей липидов, повышению активности антиоксидантных ферментов [Чернов Ю.Н., 1999]. В рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании было показано, что приём в течение 8 недель витамина Е (400 МЕ/день) больными СД типа 1 снижал медьиндуцированное окисление ЛПНП [Halliwell B., 2002].

Витамин С в виде ионов аскорбата является одним из важных элементов антиоксидантной системы, который необходим для регенерации токоферола. Витамин С повышает продукцию NO в эндотелиальных клетках и стабилизирует кофактор NO синтазы – тетрагидробиоптерин [Padayatty S.J., 2003]. Однако следует помнить, что антиоксидантное действие аскорбиновой кислоты проявляется при достаточном количестве токоферола и глутатиона, а при их недостатке преобладает прооксидантная активность [Дедов И.И., 2003].

Витамин С снижает скорость образования катаракты и окислительные процессы в хрусталике у больных СД. Содержание витамина С в плазме крови больных диабетом коррелирует с уровнем HbA1c, уровень аскорбиновой кислоты значительно выше при  $HbA1c \leq 7\%$  [Afkhani-Ardekani M., 2007; Yamada H., 2004].

Липоевая кислота является антиоксидантом, который реализует свое антиоксидантное действие в цитозоле и плазматической мембране. Основной формой тиоктовой кислоты, которая взаимодействует со свободными радикалами, является дигидролипоевая кислота. Наличие антиоксидантного эффекта обусловлено присутствием в молекуле двух тиоловых групп и способностью связывать молекулы радикалов и ионов металлов [Evans J.L., 2000]. Основные механизмы действия липоевой кислоты на свободно-радикальные процессы при сахарном диабете следующие: захват и связывание свободных радикалов, регенерация эндогенных антиоксидантов, хелатирование металлов переменной валентности (медь, железо, кобальт, кадмий), восстановление поврежденных ДНК и белков [Biewenga G., 1994].

Липоевая кислота – скавенджер перекиси водорода, синглетного кислорода, гидроксильного радикала, гипохлорной кислоты, тогда как дигидролипоевая кислота инактивирует все перечисленные соединения за исключением синглетного кислорода [Biewenga G.P., 1997]. Липоевая и дигидролипоевая кислоты непосредственно взаимодействуют с хроманоксильным радикалом витамина Е, но только дигидролипоевая кислота восстанавливает дегидроаскорбат, глутатион и коэнзим Q. Способность к регенерации антиоксидантов обусловлена низким окислительно-восстановительным потенциалом [Singh U., 2008]. В процессах формирования конечных продуктов гликозилирования липоевая кислота способна останавливать конверсию продуктов Амадори в реактивные дикарбонильные интермедианты [Muellenbach E.A., 2008]. Packer и Kawabata обнаружили, что нековалентное связывание липоевой кислоты защищает альбумин плазмы от гликозилирования [Kawabata T., 1994].

Кроме того, липоевая кислота проявляет свойства двойного агониста PPAR  $\alpha/\gamma$ , модулирует экспрессию PPAR-регулируемых генов, таким образом, влияет на процессы адипогенеза, метаболизма глюкозы, окислительного стресса. На различных экспериментальных моделях СД 1 и 2 типа у липоевой кислоты выявлена гипогликемическая активность, которая связана с активацией трансмембранного транспорта глюкозы и некоторых этапов сигнального каскада инсулина. Липоевая кислота, оказывая действие подобное инсулину, повышает транслокацию ГЛЮТ-4 и ГЛЮТ-1 в мышечной, жировой ткани. Активация ГЛЮТ-4 возможна в данном случае двумя каскадами передачи внутриклеточного сигнала: фосфоинозитол-3 киназа/ Akt и p38 MAPK [Golbidi S., 2011].

В перекрестном исследовании продемонстрировано, что липоевая кислота (600 мг/день, 3 месяца) значительно снижала концентрацию липидных гидроперекисей в плазме и отношение липидные гидроперекиси/токоферол/холестерин. В исследовании Androne после терапии липоевой кислотой в дозе 600 мг/кг снижался уровень липидных перекисей плазмы у пациентов с диабетической нейропатией [Androne L., 2000]. Развития и формирование диабетической нейропатии представляет собой многостадийный процесс, включающий целый каскад патогенетических механизмов, таких как, активация полиолового пути и снижение активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, гликозилирование белков, нарушение обмена жирных кислот, нарушение нейротрофики и окислительный стресс [Антонова К.В., 2008]. В связи с этим применение липоевой кислоты при данной патологии является обоснованным. Широкомасштабные многоцентровые многолетние исследования подтвердили, что липоевая кислота является наиболее эффективным средством в лечении периферической полинейропатии [Ziegler D., 2006; Ziegler D., 1999; Аметов А.С., 2004].

Флавоноиды – группа, включающая более чем 8000 полифениловых компонентов растений, структурными элементами которых служат два ароматических кольца, соединенные трехуглеродным

мостиком, образующим пирановый или пироновый (при наличии двойных связей) цикл. Механизм многих протективных эффектов флавоноидов до конца не изучен и неясен, однако во многом обусловлен антиоксидантной активностью [Меньшикова Е.Б., 2006 Недосугова Л.В., 2008]. Так, кверцетин является скавенджером активных форм кислорода, хелатором металлов переменной валентности, блокирует ксантиноксидазу. В исследованиях *in vitro* кверцетин блокировал окисление ЛПНП, что связывают с его способностью регенерировать витамин Е. *In vivo* на экспериментальной модели СД типа 1 кверцетин эффективно защищал  $\beta$ -клетки от окислительного стресса индуцированного цитотоксином стрептозотоцином, восстанавливал ферментативную антиоксидантную систему поджелудочной железы [Adewole S.O., 2007]. Один из механизмов действия кверцетина связан с ингибированием NF- $\kappa$ B, посредством блокирования компонентов ИКК комплекса и снижения деградации I $\kappa$ B киназы [Dias A.S., 2005].

Применение классических антиоксидантов для лечения СД ограничивается тем, что они способны связывать свободные радикалы в стехиометрическом соотношении, и для них необходим цикл регенерации [Da Ros R., 2005; Tiwari A.K., 2004].

Поиск новых препаратов для антиоксидантной терапии СД проводят с учетом последних данных о молекулярных, биохимических и генетических механизмах формирования и развития окислительного стресса при данной патологии, что позволит создавать препараты для этиопатогенетической терапии.

На основании данных об антиоксидантной системе поджелудочной железы можно прийти к заключению, что одним из возможных путей защиты  $\beta$ -клеток является активация системы глутатиона и глутатионпероксидазы в поджелудочной железе. Harmon и соавторами была выведена линия животных *scdb/db* мышей с гиперэкспрессией гена ГП, у которых к 20 неделе исследования наблюдалось снижение глюкозы практически до нормы с повышением внутриклеточ-

ного MafA (активатора транскрипции гена инсулина) в отличие от контрольных db/db мышей [Harmon J.S., 2009].

В качестве субстрата для синтеза глутатиона применяется прекурсор цистеина N-ацетил-L-цистеина (НАЦ). Протекторный эффект НАЦ продемонстрирован на культурах линий  $\beta$ -клеток, так соединение восстанавливало глюкозостимулированную секрецию инсулина и снижало уровень АФК [Acharya J.D., 2010]. Применение скавенджера перекиси водорода, НАЦ в комбинации с витаминами E и C у C57BL/KsJ-db/db мышей поддерживало глюкозостимулированную секрецию инсулина и снижало уровень глюкозы, увеличивало массу  $\beta$ -клеток, повышало экспрессию PDX-1, транскрипционного фактора гена инсулина [Kagunakaran U., 2013].

Проводятся исследования по применению в качестве протектора от свободнорадикальных повреждений поджелудочной железы при трансплантации, миметика СОД, АЕОЛ10150. При инкубации соединения с клетками островков снижалась способность NF- $\kappa$ B связываться с ДНК и повышать экспрессию генов некроза и апоптоза, уменьшалась активация ПАРП [Acharya J.D., 2010]. Помимо этого, миметики СОД нормализуют эндотелиальную дисфункцию, признаки диабетической нейропатии у животных со стрептозотоциновым диабетом [Tiwari A.K., 2004].

Nrf 2 является одним из важных транскрипционных факторов защиты клеток от окислительного стресса, индуцирующий экспрессию генов контролируемых ARE (антиоксидант-респонсивный элемент) [Xu X., 2013]. Доказана роль Nrf 2 в защите от окислительного повреждения при гипергликемии кардиомиоцитов, протективное действие Nrf 2 связано с регуляцией экспрессии генов Nqo 1 и Ho 1 [Xu X., 2013]. Важны исследования механизмов молекулярной регуляции свободнорадикальных процессов в клетках поджелудочной железы. Индукция экспрессии антиоксидантных ферментов посредством активации Nrf 2 защищает  $\beta$ -клетки от окислительного повреждения и апоптоза и минимизирует нарушение секреции инсулина

под действием активных форм кислорода [Pia J., 2010]. Jiang продемонстрировал нефропротективный эффект Nrf 2 в биоптатах почек пациентов с СД типа 2 и на модели стрептозотоцин-индуцированной диабетической нефропатии у Nrf 2 -/- мышей [Jiang T., 2010].

#### **9.4. Антидиабетические свойства комбинации диабенола и альфа-липоевой кислоты**

В большинстве случаев для адекватной компенсации сахарного диабета недостаточно монотерапии [Кононенко И. В., 2007]. Кроме того, необходимо учитывать, так называемый, феномен «гипергликемической памяти», который диктует необходимость ранней интенсивной терапии СД для профилактики поздних осложнений СД [Drzewoski J., 2009]. Ключевым фактором в патогенезе осложнений является усиленная продукция свободных радикалов митохондриями, вне зависимости от степени компенсации гипергликемии, и связанная с гликозилированием и окислительной модификацией белков цепи переноса электронов [Ceriello A., 2009]. Гиперпродукция активных форм кислорода (АФК) митохондриями является триггером различных внутриклеточных путей, включая активацию протеинкиназы С, усиление полиолового и гексозаминового путей, повышение формирования конечных продуктов гликозилирования [Ceriello A., 2009; Drzewoski J., 2009].

Описанные особенности свободнорадикальных процессов доказывают необходимость применения антиоксидантных препаратов как одного из важных компонентов в адекватной терапии сахарного диабета и его осложнений. Учитывая приведенные выше данные, актуально провести экспериментальные исследования антидиабетических эффектов комбинации диабетенола и антиоксиданта  $\alpha$ -липоевой кислоты.

Исследования были выполнены на 332 половозрелых нелинейных белых крысах (питомник ФГУ «НИИ ГТП» ФМБА России) обоего пола

массой 270-320 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария, без ограничения доступа к пище и воде. Эксперименты проведены с учетом правил лабораторной практики (GLP) при проведении доклинических исследований в Российской Федерации, разработанных в соответствии с Федеральным законом «О лекарственных средствах» № 86-ФЗ от 22.06.1998. Исследования одобрены комитетом по этической экспертизе испытаний (протокол № 70-2008 от 9 февраля 2008 г.).

Антиоксидантные свойства веществ *in vitro* изучали на модели аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов по методу Ланкина В.З. и соавт. (1975) [Ланкин В.З. и др., 1975] и на модели  $Fe^{2+}$ -индуцированной хемилюминесценции (ХЛ) липидов [Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А., 1995]. Для исследования механизмов антиоксидантной активности *in vitro* использовали модели ХЛ, сопровождающей аутоокисление люминола с генерацией активных форм кислорода [Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А., 1995] и окисления люминола пероксильными радикалами, генерирующимися АБАП [Клебанов Г.И., 2001]. Антирадикальную активность определяли по методу Glavind [Glavind J., 1963].

Гипогликемическая активность диабенола в дозе 50 и 100 мг/кг, липоевой кислоты в дозе 18 мг/кг и их комбинации исследовалась при однократном пероральном введении на интактных животных. Проводили эксперименты по изучению антидиабетической активности диабенола (50 мг/кг), липоевой кислоты (18 мг/кг) и их комбинации на животных со стрептозотоциновым [Баранов В.Г., 1983] и стрептозотонин-никотинамидным [Massiello P., 1999] экспериментальным сахарным диабетом при однократном пероральном введении. Тестируемые препараты: диабенол (50 мг/кг), липоевую кислоту (18 мг/кг) и их комбинацию (50 мг/кг+18 мг/кг) вводили 1 раз в день перорально в течение 28 дней животным со стрептозотонин-никотинамидным сахарным диабетом. Уровень глюкозы определяли на 7, 14, 21, 28 день ферментативным методом, с использованием наборов «Глюкоза ФКД» (Россия). На 14 и 28 день эксперимента про-



водили пероральный тест толерантности к глюкозе. Результаты теста оценивали по методу А.В. Древаль (1985) [Древаль А.В., 1985; Древаль А.В., 2006].

На 28 день после курсового введения препаратов у наркотизированных животных (хлоралгидрат, 400 мг/кг) осуществляли забор крови и органов для изучения параметров углеводного обмена, антиоксидантного статуса, реологических свойств крови, липидного профиля и морфологических исследований.

Оценивали следующие биохимические параметры: гликоген в печени; скорость гликолиза и гликогенолиза по конечному продукту лактату; лактат крови [Северин С.Е., Соловьева Г.А., 1989]; аланин методом тонкослойной хроматографии на пластинах «Силуфол» с последующей обработкой изображения с помощью программы «ImageJ» [Досон Р., 1991; Майстренко В.Н., 2008]. Количественное определение С-пептида в плазме крови проводили иммуноферментным методом с помощью наборов C-Peptide Elisa (DRG, Германия). Оценивали следующие параметры ПОЛ и ферментативной антиоксидантной системы: уровень малонового диальдегида (МДА) [Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., 1988], активность супероксиддисмутазы (СОД) [Костюка В.А. и др., 1990], глутатионпероксидазы (ГП) [Морин В.М., 1986] в гомогенатах поджелудочной железы, печени, почек. Измерение *вязкости крови* проводили на анализаторе крови реологическом АКР-2 (Россия). Вязкость крови определяли при скоростях сдвига 300, 200, 100, 50 и 20 с<sup>-1</sup> [Добровольский Н.А., 1998]. Влияние веществ на *агрегацию тромбоцитов* оценивали на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов (модель 220 LA) («Биола», Москва) по методу Born [Born G., 1962] в модификации Габбасова [Габбасов З. А., 1989]. Хронометрически, на гемокоагулометре «SOLAR» (Белоруссия) с использованием тест-наборов производства «Технология – стандарт» (Россия) и «Ренам» (Россия), были определены тромбиновое, протромбиновое время, активированное парциальное тромбoplastиновое время, содержание фибриногена с исполь-

зованием классических методик, основанных на автоматическом определении клоттингового времени (времени свертывания) [Баркаган З.С., Момот А.П., 1999]. Общий холестерин, триглицериды и ЛПВП определяли энзиматическим методом с помощью наборов «Витал Диагностик», рассчитывали индекс атерогенности (ИАТ).

Фиксацию ткани поджелудочной железы осуществляли в 10 % растворе забуференного нейтрального формалина (рН 7,0) в течение 24 часов. По общепринятым гистологическим методикам изготавливали парафиновые срезы с последующей окраской гематоксилином и эозином. Визуализацию инсулоцитов островков Лангерганса проводили при иммуногистохимической реакции с моноклональными антителами к инсулину (клон Ab-6 (INS04 + INS05); фирмы Lab Vision, Великобритания) с помощью непрямого иммунопероксидазного метода, без предварительной демаскировки антигенов. Морфометрический анализ проводили на базе компьютерной программы «ВидеоТестМорфо-4» (Россия). Определяли процентное соотношение площади, занимаемой  $\beta$ -инсулоцитами к общей площади островка, которая составляла 100 %, объемную долю (ОД, %) островков по отношению к экзокринной части железы, площадь островков ( $\text{мкм}^2$ ), а также размеры ядер инсулоцитов ( $\text{мкм}^2$ ) и их количество (% от общего количества клеток панкреатических островков).

Стрептозотоциновую интоксикацию (СИ) моделировали однократным внутривенным введением раствора стрептозотоцина (ICN Biomedicals Inc., USA) в 1 моль/л цитратном буфере рН 4,5 в дозе 50 мг/кг [Srinivasan K., Ramarao P., 2007]. Исследуемые препараты вводили перорально за 1 час до введения стрептозотоцина и на 2 сутки после введения утром и вечером. Оценивали потребление животными воды и корма, их вес, регистрировали выживаемость крыс, определяли уровень глюкозы в плазме крови с помощью набора «Глюкоза-ФКД» (Россия). Для исследований на 3 сутки у наркотизированных животных (хлоралгидрат, 400 мг/кг) забирали кровь из брюшной аорты и ткань поджелудочной железы. Оценивали следующие пара-

метры антиоксидантной системы (активность СОД, каталазы [Королюк М.А., 1988], ГП) в поджелудочной железе, уровень МДА в плазме и гомогенатах тканей, общую антиоксидантную активность плазмы (ОААП) [ReR., 1999].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием парного t-критерия Стьюдента, критерия Манна-Уитни и ANOVA (Newman-Keuls test) с использованием табличного редактора Microsoft Excel и пакета прикладных программ «Statistika 6.0» [Гланц С., 1998] с предварительной проверкой выборки на нормальность распределения.

В экспериментах по изучению механизмов антиоксидантного действия пероральных сахароснижающих препаратов выявлено, что диабенол оказался активным в отношении супероксид-аниона, гидроксильного и пероксильного радикалов. На модели ХЛ с генерацией активных форм кислорода ИК<sub>50</sub> для диабенола составила  $2,05 \cdot 10^{-5}$  М/л, а на модели ХЛ, сопровождающейся окислением люминола пероксильными радикалами данный показатель был выше (ИК<sub>50</sub> =  $3,8 \cdot 10^{-5}$  М/л,  $R^2=0,97$ ). Возможно, антиоксидантная активность диабенола связана с наличием избыточной электронной плотности в бензимидазольном кольце. Розиглитазон уступал в 2,5 раза диабенолу по эффекту на модели ХЛ с аутоокислением люминола (ИК<sub>50</sub> =  $5,3 \cdot 10^{-5}$  М/л,  $R^2=0,98$ ) и практически не влиял на кинетику реакции ХЛ с генерацией пероксильных радикалов. Метформин оказался практически неактивным в отношении супероксид-аниона, гидроксильного и пероксильного радикалов. Для глибенкламида в концентрации  $10^{-4}$  М/л величина ингибирования ХЛ с аутоокислением люминола не превышала 40 %, а при снижении концентрации эффект исчезал, данный препарат не оказывал влияния на кинетику ХЛ с окислением люминола пероксильными радикалами. При тестировании на данной модели комбинации диабенола и розиглитазона эффект был выше и превосходил в 1,4 раза диабенол и в 3,5 раза розиглитазон. ИК<sub>50</sub> для комбинации препаратов составила  $1,5 \cdot 10^{-5}$  М/л.

Диабенол в комбинации с метформином в данной модельной тест-системе снижал антиоксидантное действие диабенола в 1,7 раза ( $IK_{50}=3,3 \cdot 10^{-5}$  М/л,  $R^2=0,98$ ). Сочетанное введение диабенола и липоевой кислоты в модельную систему с генерацией активных форм кислорода приводило к снижению прооксидантной активности последней, процент ингибирования ХЛ составил 46,28% ( $p \leq 0,05$ ).

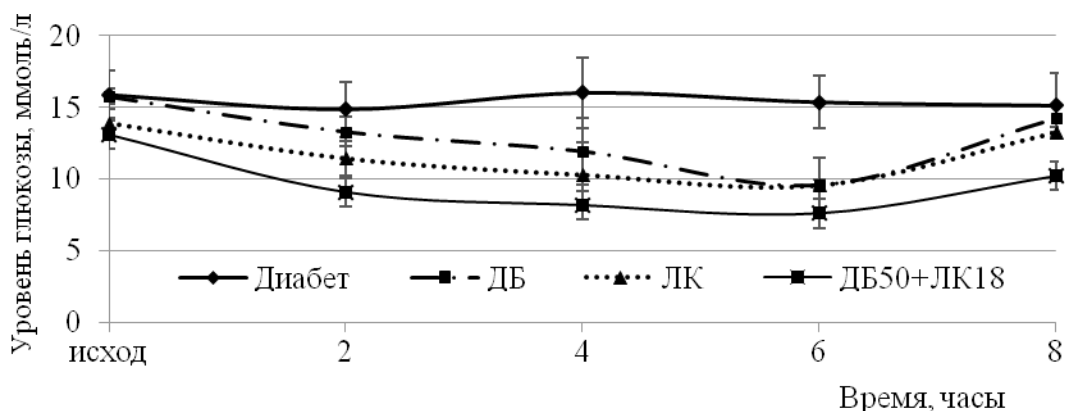
Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что диабенол в условиях *in vitro* является скавенджером супероксид-аниона, гидроксильного и пероксильного радикалов, розиглитазон активен только в отношении супероксид-аниона, гликлазид проявил выраженное антирадикальное действие на модели со свободным радикаломДФПГ, антиоксидантные свойства у метформина и глибенкламида в модельных системах *in vitro* отсутствуют. Следует учитывать, что концентрации, в которых данные препараты оказывают влияние на свободнорадикальные процессы, сложно создать в условиях проводимой фармакотерапии СД.

Были проведены исследования гипогликемической активности диабенола в комбинации с липоевой кислотой в соотношениях 2,8:1 и 5,6:1. Как видно из представленных данных ЛК в дозе 18 мг/кг при однократном пероральном введении не оказывает гипогликемическое действие. После комбинированного введения диабенола в дозе 50 мг/кг с липоевой кислотой развитие эффекта наблюдалось к 6–8 часу эксперимента. Между 12 и 16 часом наблюдений активность комбинации несколько снизилась и составила 14,79–16,73 % однако к 20 часу уровень глюкозы был ниже на 29,57 % по отношению к исходному.

Усиление сахаропонижающего действия диабенола в дозе 100 мг/кг в комбинации с липоевой кислотой, отмечалось ко 2-му часу исследования, уровень глюкозы достоверно снизился на 38,78 % ( $p \leq 0,05$ ), затем гипогликемическая активность препаратов увеличивалась, предельно низкие цифры глюкозы фиксировались к 12 часу наблюдения и составили  $1,63 \pm 0,13$  ммоль/л (-62,42 %,  $p \leq 0,05$ ). Далее

отмечалось ослабление эффективности изучаемой комбинации, так между 16-м и 20-м часом эксперимента содержание глюкозы уменьшилось на 53,81–55,31 %.

При изучении антидиабетического действия диабенола в дозе 50 мг/кг на животных со стрептозотоциновым диабетом выявлено, что уровень глюкозы снижался через 2 часа после перорального введения соединения на 15,47%, по сравнению с исходными показателями, достигая максимума активности к 6 часу наблюдений (-38,92%) (рис. 9.3). Далее начиналось постепенное уменьшение эффекта, и к 8 часу уровень глюкозы в крови был снижен на 9,52% по отношению к исходным значениям.



**Рис. 9.3. Влияние диабенола (ДБ) в дозе 50 мг/кг, липоевой кислоты (ЛК) в дозе 18 мг/кг и их комбинации на уровень глюкозы (ммоль/л) крыс со стрептозотоциновым диабетом при однократном пероральном введении ( $M \pm m$ )**

Концентрация глюкозы, ко второму часу после введения липоевой кислоты в дозе 18 мг/кг, уменьшалась на 17,59 %, по сравнению с исходными данными, препарат был наиболее эффективен к 6 часу наблюдений (-30,99 %), а через 8 часов уровень сахара в крови не превышал исходные значения. Наиболее выраженное гипогликемическое действие наблюдалось в комбинации диабенола с липоевой кислотой, которая по величине активности превосходила каждый пре-

парат в отдельности, что подтверждалось достоверным снижением площади под кривой «концентрация глюкозы-время» в 1,8 раза по сравнению с крысами с сахарным диабетом.

Для комбинации диабенола и липоевая кислота в соотношении 2,8:1 была определена острая токсичность на мышах при пероральном введении. Летальность имела выраженный дозозависимый характер, показатель ЛД<sub>50</sub> составил 1 г/кг ( $R^2=0.92$ ).

После курсового ведения крысам с сахарным диабетом диабенола в дозе 50 мг/кг, уровень гликемии достоверно снизился к 14-му дню исследования на 18,16 %, к 21-му дню – 41,40 % ( $p \leq 0,05$ ), а к 28-му дню – 44,78 % ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к контрольной группе. У крыс, получавших липоевую кислоту, содержание глюкозы в плазме крови было ниже на 35,81% ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с диабетическим животным на 14 сутки и ее уровень практически не изменялся до конца наблюдения ( $4,51 \pm 0,26$  ммоль/л). Уже после недельного введения комбинации диабенола и липоевой кислоты регистрировали снижение гипергликемии на 29,62% ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к группе крыс с экспериментальным диабетом, а к 14-му дню уровень глюкозы был сопоставим с данными показателями в группе интактного контроля ( $4,30 \pm 0,22$  ммоль/л). Кроме того у крыс с сахарным диабетом отмечалось увеличение потребления воды в 1,6 раза по сравнению с интактными животными. Следует отметить, что после комбинированного введения диабенола и липоевой кислоты, потребление воды уменьшилось в 1,7 раза по сравнению с диабетической группой. Во всех исследуемых группах не отмечено отрицательной динамики веса животных. Диабенол, липоевая кислота и их комбинация после перорального введения способствовали снижению скорости нарастания глюкозы в крови животных с экспериментальным диабетом при проведении перорального теста толерантности, при этом гипогликемическое действие диабенола в комбинации с ЛК превышало по эффективности соединения в отдельности во всех временных интервалах. Антидиабетическое действие диабенола, липоевой кислоты и их комбинации в пе-

роральном тесте толерантности к глюкозе подтверждалось достоверным уменьшением площади под кривой, при этом максимальный сахароснижающий эффект для комбинации составил 49,76 % ( $p \leq 0,05$ ), тогда как для диабенола и липоевой кислоты 38,18 % ( $p \leq 0,05$ ) и 39,57 % ( $p \leq 0,05$ ), соответственно.

Таким образом, в ходе исследований выявлено, что липоевая кислота не оказывала гипогликемического действия на интактных животных, однако при комбинированном применении с диабенолом пролонгировала его действие, эффективность изучаемых комбинаций увеличивалась с повышением дозы диабенола. Курсовое комбинированное применение диабенола с липоевой кислотой приводило к более ранней компенсации экспериментального диабета, уровень глюкозы в крови к 14 дню сопоставим со значениями интактного контроля и антидиабетическая активность превосходила таковые для каждого компонента взятого в отдельности. В ходе проведенного исследования наблюдались следующие нарушения *углеводного обмена* при стрептозотоцин-никотинамидином сахарном диабете (табл. 9.1).

У крыс, со стрептозотоцин-никотинамидным сахарным диабетом, на 28 день эксперимента, по сравнению с интактными животными, наблюдалось уменьшение содержания гликогена в печени в 5 раз, снижение уровня аланина крови на 20,46 % ( $p \leq 0,05$ ), торможение гликолиза на 42,52 % ( $p \leq 0,05$ ) и увеличением скорости гликогенолиза в 2 раза.

В группе крыс, получавших диабенол в комбинации с липоевой кислотой, скорость гликолиза практически не менялась, скорость гликогенолиза снижалась на 52,09 % ( $p \leq 0,05$ ), однако уровень гликогена в печени был в 3,9 раза выше, чем у диабетических животных. Полученные результаты, возможно, связаны с тем, что изучаемая комбинация увеличивает запасы глюкозы в печени, увеличивая активность ферментов синтеза гликогена. При курсовом введении диабенола в комбинации с липоевой кислотой повышалась концентрация аланина в крови на 44,52 % ( $p \leq 0,05$ ), что может косвенно свидетельствовать о торможении глюконеогенеза. Уровень С-пептида при

применении диабенола в комбинации с липоевой кислотой снижался на 26,22 % ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к экспериментальной патологии.

Таблица 9.1

**Влияние соединений и их комбинации на параметры углеводного обмена и уровень С-пептида у крыс со стрептозотоцин-никотинамидным СД (курсовое введение, 28 дней), ( $M \pm m$ )**

Показатели	Группы животных				
	Интактные животные	ЭД	ЭД+ДБ	ЭД+ЛК	ЭД+ЛК+ДБ
Глюкоза, моль/л	5,06±0,14	9,38±2,42*	4,57±0,45**	4,51±0,26**	4,51±0,26**
С-пептида, нг/мл	15,71±0,35	12,65±0,71*	14,76±0,49	11,70±1,47	8,95±0,64**
Лактат, мг%	3,33±1,05	6,64±0,72*	4,59±0,90	6,73±0,93	5,86±0,68
Аланин, мкмоль/л	52,01±3,40	41,37±2,11*	52,71±6,18	49,08±1,01**	59,79±3,73**
Гликоген, мг/г ткани	8,36±0,80	1,72±0,62*	5,65±2,08	5,73±1,73	5,94±0,83**
Скорость гликолиза, мкмоль лактата/г ткани/мин	12,52±1,53	9,28±0,68*	9,41±2,21	14,35±4,68	10,18±1,92
Скорость гликогенолиза, мкмоль лактата/г ткани/мин	43,93±17,60	100,87±13,31*	60,08±8,09**	48,54±12,55**	48,32±8,37**

*Примечание.* ЭД – экспериментальный диабет, ДБ – диабенол 50 мг/кг, ЛК – липоевая кислота 18 мг/кг.

\*Достоверно по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ); \*\*достоверно по отношению к группе с экспериментальным диабетом ( $p < 0,05$ ).

При гистологическом исследовании поджелудочной железы животных со стрептозотоцин-никотинамидным экспериментальным диабетом определились явления умеренного отёка и полнокровия крове-



носных сосудов междольковой соединительной ткани и капилляров панкреатических островков. Отмечался очаговый склероз панкреатических островков с достоверным снижением количества  $\beta$ -эндокриноцитов ( $43,2 \pm 3,3$  % от общего количества клеток островка). При этом также происходило достоверное снижение площади занимаемой инсулоцитами ( $51,2 \pm 5,2$ ). При иммуногистохимической реакции инсулинпозитивно окрашивались клетки, расположенные в центральных и периферических отделах островков с неравномерным накоплением в цитоплазме иммунопозитивного материала. Экспрессия инсулина была умеренной или значительно выраженной. Ядра инсулоцитов имели округлую форму с умеренно выраженной базофилией, ядрышки хорошо визуализировались. Отмечалась умеренная гиперплазия ядер  $\beta$ -эндокриноцитов (табл. 9.2).

Таблица 9.2

**Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг), натриевой соли ЛК (в дозе 18 мг/кг) и их комбинации на морфометрические показатели эндокринной части поджелудочной железы крыс со стрептозотоцинико-никотинамидным экспериментальным диабетом (курсовое введение, 28 дней), ( $M \pm m$ ).**

Группы животных	Количество $\beta$ -клеток, %	Площадь $\beta$ -клеток, %
Интактные животные	$68,2 \pm 5,2$	$76,3 \pm 4,2$
Экспериментальный диабет	$43,2 \pm 3,3^*$	$51,2 \pm 5,2^*$
ЭД+ДБ	$54,3 \pm 9,5$	$63,1 \pm 4,6$
ЭД+ЛК	$51,2 \pm 8,9$	$74,2 \pm 9,6^{**}$
ЭД+ДБ+ЛК	$56,4 \pm 2,1^{**}$	$77,3 \pm 10,2^{**}$

*Примечание.* ЭД – экспериментальный диабет, ДБ – диабенол 50 мг/кг, ЛК – липоевая кислота 18 мг/кг.

\*Достоверно по сравнению с группой интактного контроля;

\*\*достоверно по сравнению с группой экспериментального диабета.

У животных, получавших диабенол в комбинации с липоевой кислотой, в единичных островках определялась умеренная инфильтрация эозинофилами и лимфоцитами в ткани поджелудочной железы крыс получавших комбинацию. Происходило незначительное уменьшение средней площади островков Лангерганса,  $(10692,1 \pm 8228,0)$  мкм<sup>2</sup>, со статистически незначимым увеличением их объемной доли  $(7,9 \pm 1,2 \%)$ . Отмечалось значимое увеличение количества  $\beta$ -клеток и занимаемой ими площади. В поджелудочной железе определялись участки очагового склероза отдельных панкреатических островков,  $\beta$ -эндокриноциты в островках были расположены в центральных отделах. Выраженная цитоплазматическая экспрессия инсулина определялась в большинстве клеток. Отмечалась умеренная гиперплазия ядер инсулоцитов (табл. 9.2).

В проведенных нами исследованиях выявлено, что комбинация диабенола и липоевой кислоты снижала секреторную функцию поджелудочной железы, что, однако, не сопровождалось повышением уровня глюкозы. Полученные данные можно объяснить тем, что изучаемая комбинация не просто уменьшает уровень инсулина, а модулирует его секрецию, восстанавливая раннюю фазу и предупреждая истощение инсулиносекреторного аппарата, часто встречающееся при длительной терапии препаратами из группы производных сульфонилмочевины. Следует отметить, что снижение секреции инсулина не сопровождалось снижением синтеза гормона в островках Лангерганса поджелудочной железы. При морфологическом исследовании наблюдалась выраженная цитоплазматическая экспрессия инсулина в большинстве клеток. Кроме того, следует отметить, что изучаемая комбинация корректировала нарушения углеводного обмена в печени, ингибировала гликогенолиз, а также повышала концентрацию гликогена в печени, нормализовала значения аланина крови у животных с экспериментальным СД при курсовом введении. Полученные данные свидетельствуют о торможении глюконеогенеза из

аланина, основного источника эндогенных углеводов в печени и повышении запаса глюкозы в виде гликогена.

Повышение уровня глюкозы, до относительно невысоких значений, сопровождается активацией процессов перекисного окисления липидов в основных органах-мишенях (поджелудочная железа, почки, печень). На 28 день эксперимента концентрация конечного продукта окисления липидов, МДА в тканях поджелудочной железы животных с экспериментальным диабетом увеличилась в 4,6 раза, в печени – в 7,8 раза, в почках – в 3 раза (табл. 9.3). Кроме того отмечался незначительный подъем уровня МДА в плазме крови диабетических животных на 19,80 %. Следует отметить, что стрептозотоцин-никотинамидный экспериментальный сахарный диабет сопровождается не только активацией перекисного окисления липидов, но и окислительной модификацией белков, которые выполняют не менее важную роль в свободнорадикальном повреждении при сахарном диабете. Так на 28 день исследования уровень карбонильных производных белков повысился на 32,32 % ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению интактными животными. В ответ на повышение интенсивности перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков меняется активность защитной от свободнорадикального повреждения системы. Активность ферментов антиоксидантной системы при стрептозотоцин-никотинамидном экспериментальном диабете изменялась следующим образом: в тканях печени активность СОД и ГП снижалась на 40,23 % ( $p \leq 0,05$ ), и 20,9 % ( $p \leq 0,05$ ), соответственно (табл. 9.3, 9.4).

Курсовое введение животным со стрептозотоцин-никотинамидным диабетом диабенола в комбинации с липоевой кислотой сопровождалось уменьшением МДА в гомогенатах поджелудочной железы в 4 раза, в почках в 2,5 раза, в печени в 1,9 раза по сравнению с крысами без терапии. Ограничение перекисного окисления липидов в различных органах после курсового введения комбинации препаратов приводило к снижению МДА в плазме крови на 44,94 % ( $p \leq 0,05$ ).

Таблица 9.3

**Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг), натриевой соли ЛК (в дозе 18 мг/кг) и их комбинации на содержание малонового диальдегида (МДА) (нмоль на г ткани) в гомогенатах тканей (печень, поджелудочная железа, почки) и плазме крыс со стрептозотоцин-никотинамидным экспериментальным диабетом (курсовое введение, 28 дней) ( $M \pm m$ )**

Группы животных	Гомогенаты тканей			
	Печень	ПЖ	Почки	Плазма
Интактные животные	34,47±9,08	27,73±10,21	49,00±0,37	5,13±0,37
ЭД	162,68±41,10*	217,09±49,26*	144,87±39,59*	6,40±1,04
ЭД+ДБ	145,09±32,99	21,20±13,83**	44,87±5,16**	6,05±0,46
ЭД+ ЛК	44,30±16,40**	89,89±25,82**	71,79±17,35**	3,95±0,80
ЭД + ДБ + ЛК	86,69±20,17**	55,31±16,64**	58,63±24,66**	3,52±0,40**

Таблица 9.4

**Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг) натриевой соли ЛК (в дозе 18 мг/кг) и их комбинации на активность глутатионпероксидазы (ГП) (мМоль/мин на г ткани) в гомогенатах тканей (печень, поджелудочная железа, почки) крыс со стрептозотоцин-никотинамидным экспериментальным диабетом (курсовое введение, 28 день) ( $M \pm m$ )**

Группы животных	Гомогенаты органов		
	Печень	ПЖ	Почки
Интактные животные	142,14±6,26	166,40±15,56	136,63±20,31
Экспериментальный диабет	112,46±10,43*	74,30±28,09*	206,61±15,33*
ЭД+ДБ	115,20±9,93	173,08±34,43**	194,50±9,29**
ЭД+ ЛК	142,38±18,37	53,33±16,98	176,46±11,90
ЭД + ДБ+ ЛК	198,76±14,62**	103,79±7,10	159,40±14,98**

*Примечание.* ПЖ – поджелудочная железа, ЭД – экспериментальный диабет, ДБ – диабенол 50 мг/кг, ЛК – липоевая кислота 18 мг/кг.

\*Достоверно по отношению к контролю, парный критерий Стьюдента ( $p < 0,05$ ),  
\*\*достоверно по отношению к группе с экспериментальным диабетом, парный критерий Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

После курсовой пероральной терапии диабенолом, липоевой кислотой и их комбинацией снижалось формирование карбонильных производных белков, основных продуктов окислительной модификации при экспериментальном диабете. Комбинированная терапия диабенолом и ЛК наиболее эффективно увеличивала активность СОД в почках в 1,7 раза и печени в 2,3 раза по отношению к группе со стрептозотоцин-никотинамидным диабетом. После курсового введения изучаемой комбинации активность ГП в почках снижалась на 26,71% ( $p \leq 0,05$ ), а в печени и поджелудочной железе повышалась на 76,73% ( $p \leq 0,05$ ) и 39,70%, соответственно.

Применение при экспериментальном СД диабенола в комбинации с липоевой кислотой повышает эффективность, проводимой терапии, что сопровождается снижением МДА в гомогенатах органов восстановлением ферментативной антиоксидантной системы в печени, поджелудочной железе, почках.

При экспериментальном сахарном диабете достоверно усиливались процессы агрегации тромбоцитов (табл. 9.5.), о чем свидетельствует повышение индекса агрегации тромбоцитов в 1,6 раза, повышение скорости агрегации в 1,8 раза по отношению к интактному контролю.

Курсовое введение диабенола в дозе 50 мг/кг, ЛК и их комбинации приводило к уменьшению выраженности основных проявлений гиперагрегации тромбоцитов. В группе животных, получавших диабенол в комбинации с липоевой кислотой, отмечался максимальный эффект снижения индекса агрегации тромбоцитов составил 54,46 % ( $p \leq 0,05$ ), а скорости агрегации – 46,43 % ( $p \leq 0,05$ ).

**Влияние диабенола (дозе 50 мг/кг), липоевой кислоты (в дозе 18 мг/кг) и их комбинации при курсовом пероральном введении в течение 28 дней на АДФ-индуцированную (5 мкМ) агрегацию тромбоцитов в крови крыс со стрептозотоцин-никотинамидным экспериментальным диабетом ( $M \pm m$ )**

Группы животных	Параметры агрегации тромбоцитов	
	ИАТ	МН
Интактные животные	28,75±3,43	20,98±3,02
Экспериментальный диабет	45,64±2,32*	38,87±3,26*
ЭД+ДБ	28,94±2,78**	25,97±2,63**
ЭД+ ЛК	26,84±2,44**	26,04±1,27**
ЭД+ ДБ+ЛК	20,79±4,18**	20,82±3,51**

*Примечание.* ИАТ – индекс агрегации тромбоцитов, МН – максимальный наклон агрегатограммы, ЭД – экспериментальный диабет, ДБ – диабенол 50 мг/кг, ЛК – липоевая кислота 18 мг/кг.

\*Данные достоверны по отношению к контрольной группе интактных крыс, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ); \*\* данные достоверны по отношению к контрольной группе крыс, больных сахарным диабетом ( $p < 0,05$ ), критерий Манна-Уитни.

При исследовании изменения показателей коагулограммы у крыс с экспериментальным сахарным диабетом, определили сдвиг в системе коагуляционной системы крови в сторону гиперкоагуляции. При этом наблюдалось достоверное уменьшение ТВ на 39,13 % ( $p \leq 0,05$ ), и тенденция к снижению ПТВ и АПТВ на 9,45 % и 12,65 % соответственно, по сравнению с интактными животными. Также в группе с экспериментальным сахарным диабетом достоверно увеличивалось содержание фибриногена на 24,09 % ( $p \leq 0,05$ ) по отношению к крысам без патологии. Относительная нормализация показателей коагулограммы у крыс при экспериментальном сахарном диабете,

наблюдалась только после курсового введения диабенола в комбинации с липоевой кислотой, регистрировалось снижение содержания фибриногена на 21,87% и повышение ТВ и АПТВ на 24,74 % и 31,53 % соответственно.

Диабенол и липоевая кислота, после курсового введения, снижали реактивность тромбоцитов при экспериментальном СД, однако только после комбинированного введения соединений наблюдался максимальный эффект, что обусловлено различными механизмами антиагрегантного действия соединений. Кроме того после курсовой терапии изучаемой комбинацией отмечалась относительная нормализация гиперкоагуляционного статуса, формирующегося при стрептозотоцин-никотинамидном СД.

При моделировании экспериментального сахарного диабета наблюдались следующие изменения липидного состава: уровень триглицеридов к 28-ому дню исследования повышался в 2,6 раза, а уровень антиатерогенных ЛПВП незначительно снижался по сравнению с интактными животными. Значение интегрального показателя липидного обмена, ИАТ у крыс со стрептозотоцин-никотинамидным диабетом увеличивалось в 1,5 раза по отношению к интактной группе. Наиболее эффективным было курсовое комбинированное введение диабенола и липоевой кислоты, уровень ТГ достоверно уменьшался в 3,8 раза, а ИАТ достигал уровня животных без экспериментальной патологии к 28 дню исследования. Следует отметить достоверное повышение на ЛПВП после терапии изучаемой комбинации как по отношению к животным с экспериментальным диабетом, так и к интактной группе.

После интоксикации стрептозотоцином на 3 день уровень глюкозы увеличился в 3,5 раза по сравнению с интактной группой и достигал значений  $19,98 \pm 0,29$  ммоль/л, наблюдалась незначительная потеря массы тела, увеличивалось потребление воды и суточный диурез. При комбинированном введении изучаемых веществ уровень глюкозы уменьшился на 22,20 % ( $p \leq 0,05$ ), выживаемость составила

83 %. В плазме крови животных с СД на 3 день исследования в 3 раза повысилась активность каталазы, что свидетельствует о значительном разрушении клеток, так как данный фермент является внутриклеточным и быстро теряет активность под действием протеолитических ферментов в крови. Активность СОД, ГП в плазме не менялась, однако уровень общей антиоксидантной активности плазмы крыс с СД на 3 день увеличилась на 28,47 % ( $p \leq 0,05$ ), что объясняется повышением каталазы в плазме и также возможно эндогенных неферментативных антиоксидантов (глутатион, витамин Е, витамин С и др.). Сочетанное введение диабенола и липоевой кислоты приводило к нормализации общей антиоксидантной активности, каталазы в плазме до уровня интактных животных.

Стрептозотоцин после введения активировал свободнорадикальные процессы в поджелудочной железе, возрастала интенсивность процессов перекисного окисления липидов в тканях поджелудочной железы, уровень МДА у крыс с СД в 1,5 раза выше, чем у интактной группы. Изменялась активность ферментов антиоксидантной системы: активность СОД снижалась на 25,55 %, увеличивалась активность ГП на 36,81 % ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с интактными животными.

После комбинированного введения веществ наблюдалось ограничение процессов ПОЛ в ткани поджелудочной железы, уровень МДА уменьшался на 38,99 % ( $p \leq 0,05$ ). Показатели ферментов в данной экспериментальной группе изменялись следующим образом, активность СОД после терапии комбинацией веществ повысилась на 14,00 % по сравнению с группой с патологией, активность ГП снизилась на 31,26 % ( $p \leq 0,05$ ).

При гистологическом исследовании ткани поджелудочной железы крыс со стрептозотоциновой интоксикацией определились явления выраженного отёка и полнокровия кровеносных сосудов междольковой соединительной ткани и капилляров панкреатических островков. Панкреатические островки имели неправильную форму и размеры



в пределах  $12801,5 \pm 11252,3$  мкм<sup>2</sup>. Объемная доля островков по отношению к интактному контролю достоверно снижалась и составляла  $5,1 \pm 2,3$  %. Отмечались явления некроза инсулоцитов с достоверным снижением количества эндокринных клеток ( $47,1 \pm 3,5$  % от общего количества клеток островка) и достоверным снижением занимаемой площади ( $55,3 \pm 6,1$ ). В островках Лангерганса прослеживалась умеренная лейкоцитарная инфильтрация. Ядра инсулоцитов имели округлую форму с умеренно выраженной базофилией, ядрышки хорошо визуализировались. Отмечалась умеренная гиперплазия ядер в-эндокриноцитов.

В ткани поджелудочной железы животных, получавших изучаемую комбинацию, определялась умеренная лейкоцитарная инфильтрация, отек и полнокровие в отдельных островках Лангерганса. Средняя площадь островков составляла  $7122,6 \pm 3821,8$  мкм<sup>2</sup> с статистически значимым увеличением их объёмной доли ( $9,3 \pm 2,3$ %) и количества  $\beta$ -эндокриноцитов ( $65,6 \pm 4,2$  %). Происходило незначительное увеличение их площади по сравнению с группой крыс с экспериментальным диабетом ( $61,7 \pm 5,8$  %). Площадь ядер инсулоцитов соотносилась с показателями интактной группы. В проведенных нами исследованиях диабенол в комбинации с ЛК оказывал профилактическое действие при стрептозотоциновой интоксикации, достоверно увеличивая объемную долю островков, количество  $\beta$ -клеток и ограничивая интенсивность процессов ПОЛ.

Сочетание диабенола и ЛК позволит создать антидиабетический препарат, не только эффективно корректирующий основные дефекты углеводного обмена, но и обладающий антиагрегантной, антиатеросклеротической и антиоксидантной активностью, что также позволит проводить профилактику и лечение ранних и поздних осложнений СД.

## 9.5. Заключение

Гипергликемическое состояние приводит к увеличению продукции таких активных форм кислорода как супероксид-анион, гидроксильный радикал, а также перекиси водорода и запускает внутриклеточный каскад стресс-активируемых сигнальных путей. Развитие окислительного стресса при СД связано с повышением аутоокисления глюкозы, активацией неферментативного гликозилирования белков с образованием конечных продуктов гликирования (КПГ), усилением метаболизма глюкозы полиоловым путем, через гексаминозный шунт, активацией протеинкиназы С. Кроме того, феномен «гипергликемической памяти» способствует продолжительной и достаточно стойкой активации свободнорадикальных процессов, несмотря на нормализацию значений глюкозы.

Описанные особенности процессов ПОЛ доказывают необходимость применения антиоксидантных препаратов как одного из важных компонентов в рациональной терапии сахарного диабета и его осложнений. Для коррекции окислительного стресса при сахарном диабете и его осложнений в клинической практике применяются витамины Е и С в виде монотерапии и в составе витаминных препаратов, липоевая кислота и бенфотиамин. Антиоксидантная терапия при СД должна быть направлена на снижение количества свободных радикалов и повышение функциональной активности факторов защиты. Однако необходимо проводить поиск новых препаратов с учетом биохимических и молекулярных патогенетических особенностей данной патологии. Перспективными группами для создания препаратов, применяемых именно для этиопатогенетической терапии свободнорадикальных процессов, являются ингибиторы гликирования, миметики СОД.

Поддержание баланса прооксидантов и антиоксидантов осуществляется системой редокс-чувствительных клеточных белков, поэтому создание препаратов для регуляции генной сети антиоксидант-

ной системы посредством редокс сенсоров и транскрипционных факторов (например, Nrf 2) является принципиально новым направлением поиска.

В наших исследованиях показано, что соединение диабенол в условиях *in vitro* производит эффект скавенджера супероксид-аниона, гидроксильного и пероксильного радикалов. В сочетании с липоевой кислотой в соотношении 2,8:1 и 5,6:1 при однократном введении внутрь оказывает выраженное гипогликемическое действие на интактных животных. В этих комбинациях диабенол при длительном введении крысам со стрептозотоцин-индуцированным СД оказывает более значимое позитивное влияние на проявления данной патологии, чем в варианте монотерапии диабенолом или липоевой кислотой.

Следует отметить, что диабенол с липоевой кислотой оказывает более выраженное действие на сохранение  $\beta$ -клеток, подавляет процесс ПОЛ в таких органах, как печень, поджелудочная железа, почки. Данные, представленные в этой главе, дают основание утверждать о целесообразности создания комбинированных фиксированных лекарственных форм антидиабетических средств с антиоксидантными не только для регуляции углеводного обмена при диабете, но и для профилактики осложнений при данной патологии.

Исследования, описанные в данной главе, выполнены в Волгоградском государственном медицинском университете при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-25-00139).

## ГЛАВА 10

# АНТИТРОМБОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИАБЕНОЛА

*А. А. Спасов, А. А. Кучерявенко, К. В. Ленская*

---

В настоящее время согласно клиническим рекомендациям зарубежных и российских стандартов лечения СД, схемы назначения лекарственных средств помимо сахароснижающей терапии включают использование для профилактики диабетических ангиопатий антиагрегантных препаратов [Manrique C., 2008; Morel O., 2010]. На сегодняшний день у эндокринологов есть достаточный выбор препаратов, обладающих выраженным гипогликемическим эффектом. Но при этом необходимо, чтобы кроме эффективного снижения гликемии препараты обладали дополнительными свойствами – снижали риск развития осложнений СД. Наличие у препарата антиагрегантных свойств является существенным преимуществом в терапии СД. Из известных гипогликемических препаратов подобное действие описано у производных сульфонилмочевины и бигуанидов, однако, не уточняется, является ли это действие прямым или связано с контролем уровня гликемии.

Исключением является гликлазид, у которого описано прямое антиагрегантное действие [Викс Г., 2002; Siluk D., 2002]. Поэтому, нам представилось интересным провести оценку антитромбогенной активности гипогликемического средства диабенол.

## 10.1. Действие диабенола на агрегацию тромбоцитов

Влияние веществ на агрегацию тромбоцитов *in vitro* изучали согласно методу З.А. Габбасова (1989). Исследования проводили на богатой тромбоцитами плазме кроликов по методу В.А. Люсова (1971). В качестве препарата сравнения была выбрана ацетилсалициловая кислота – средство с доказанной в многоцентровых исследованиях антиагрегантной активностью. Этот препарат является наиболее изученным и широко используемым антиагрегантным средством, которое проявляет способность ингибировать процессы агрегации тромбоцитов *in vitro*, в отличие от не менее широко используемого антиагрегантного средства – клопидогреля, проявляющего свою активность только в целом организме [Ма Т.К., 2010]. Диабенол и препарат сравнения изучали в диапазоне концентраций 1-100 мкМ. Пробы инкубировали в термостатируемых ячейках агрегометра при 37 С<sup>0</sup> в течение 5 минут. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали аденозин-5-дифосфорную кислоту (АДФ) фирмы «Reanal» (Венгрия) в конечной концентрации 5 мкМ.

Также было проведено сравнительное экспериментальное исследование *in vitro* диабенола с производными сульфонилмочевины: гликлазидом (*Servier*, Франция) и глибенкламидом (*Asta Medica AG*, Москва), производным бигуанидов – метформинном (глюкофажем (*Nycomed*, Франция)) и производным тиазолиндиона – росиглитазоном (*Гедеон Рихтер АО*, Венгрия). Для всех соединений были экспериментально определены величины ЭК<sub>25</sub> (эффективные концентрации, подавляющие процесс агрегации тромбоцитов на 25 %) с использованием метода регрессионного анализа в программе Microsoft Excell 2003.

Моделирование и степень внутрисосудистой агрегации тромбоцитов проводили согласно методу J.F. Pinon (1984). Опыты были выполнены на белых беспородных крысах, наркотизированных нембуталом (50 мг/кг внутривенно). Для оценки влияния на внутрисо-

судистую агрегацию кровяных пластинок диабенол вводили перорально в дозе 10, 25 и 50 мг/кг за 1,5 часа до наркоза животных. Индуктор агрегации АДФ (аденозиндифосфорная кислота) вводили внутривенно в дозе 1 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту в дозах 125, 250 и 350 мг/кг.

Для оценки активности соединений определяли  $\Delta\%$  ингибирования функциональной активности тромбоцитов. Расчет  $EC_{50}$  и  $ED_{50}$  (эффективная концентрация или доза, подавляющие процесс агрегации тромбоцитов на 50 %) проводили с использованием метода регрессионного анализа.

Диабенол и препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в опытах *in vitro* проявили дозозависимую антиагрегантную активность, на основании чего была рассчитана их  $EC_{50}$ , которая составила  $2,6 \times 10^{-4}$  и  $7,1 \times 10^{-4}$  М соответственно (табл. 10.1). Исходя их данных показателей, изученное соединение превосходит препарат сравнения по  $EC_{50}$  в 2,7 раза.

Таблица 10.1

**Влияние диабенола и ацетилсалициловой кислоты на АДФ-индуцированную (5мкМ) агрегацию тромбоцитов кролика (опыты *in vitro*,  $M \pm m$ )**

Вещества	Агрегация тромбоцитов ( $\Delta\%$ по отношению к контролю)			$EC_{50}, M$
	100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
Диабенол	$73,9 \pm 1,9^{**}$	$23,4 \pm 1,27^*$	$10,1 \pm 0,95$	$2,6 \times 10^{-4}$
Ацетилсалициловая кислота	$53,4 \pm 4,23^*$	$29,3 \pm 3,4^*$	$3,1 \pm 1,9$	$7,1 \times 10^{-4}$

\*( $p \leq 0,05$ ); \*\*( $p \leq 0,001$ ) – данные статистически значимы по отношению к контролю (критерий Манна-Уитни).

Данные, полученные в результате сравнительного экспериментального исследования различных гипогликемических средств, свидетельствуют о способности всех изученных препаратов в экспериментах *in vitro* оказывать дозозависимое антиагрегантное действие. Однако препараты в концентрации  $1 \times 10^{-4}$ , за исключением диабенола, ингибировали агрегацию тромбоцитов меньше, чем на 50 %. Поэтому, для всех веществ была определена ЭК<sub>25</sub>. Однако эти опыты были выполнены *in vitro*, поэтому встал вопрос о том, будут ли данные препараты и диабенол, в изученных дозах, оказывать антиагрегантный эффект у больных СД. Иными словами, было исследовано, как соотносятся значения максимальных концентраций (С<sub>max</sub>), изученных гипогликемических препаратов, в крови с их ЕС<sub>25</sub>, полученными нами *in vitro* (табл.10.2). Как видно из результатов, представленных в таблице 10.2., С<sub>max</sub> гликлазида в плазме крови составляет 2-8 мг/кг [Гурто Р.В., 2008], что соответствует ЕС<sub>25</sub> данного препарата, полученной нами *in vitro* (7,6 мг/кг). Это свидетельствует о том, что антиагрегантный эффект гликлазида является прямым. То же самое можно сказать и о диабеноле. ЕС<sub>25</sub> данного вещества также сопоставима с его С<sub>max</sub> в плазме крови [Смирнова Л.А., 2004]. При сравнении этих же показателей у глибенкламида [Заборовская З.В., 2004] и росиглитазона [Балаболкин М.И.2006] мы можем предположить, что в клинических условиях прямой антиагрегантный эффект этих препаратов не проявится. Несмотря на то, что в литературе описана способность глибенкламида снижать риск прогрессирования диабетических осложнений [Siluk D., 2002], этот эффект является опосредованным и проявляется, видимо, за счет снижения уровня гликемии. В отношении метформина (глюкофажа) [Bailey C.J., 1996] можно также предположить, что антиагрегантный эффект его также не является прямым, а способность этого средства улучшать тромбогенный потенциал крови скорее всего связан с описанной в литературе фибринолитической активностью [Najeed S.A., 2002]. Таким образом, проведенный нами сравнительный анализ антиагрегантной активно-

сти пероральных гипогликемических средств, свидетельствует о том, что препараты гликлазид и диабенол способны снижать реактивность тромбоцитов вне зависимости от уровня гликемии.

Таблица 10.2

**Максимальные концентрации в плазме крови (C<sub>max</sub>)  
и ЭК<sub>25</sub> диабенола, гликлазида, глибенкламида, глюкофажа  
и росиглитазона (мг/кг)**

Препараты	C <sub>max</sub> *, мг/кг	EC <sub>25</sub> , мг/кг
Диабенол	1,0-3,25	0,7
Гликлазид	2,0-8,0	7,6
Глибенкламид	0,189	12,0
Глюкофаж (метформин)	2,0	6,0
Росиглитазон	0,076	67,0

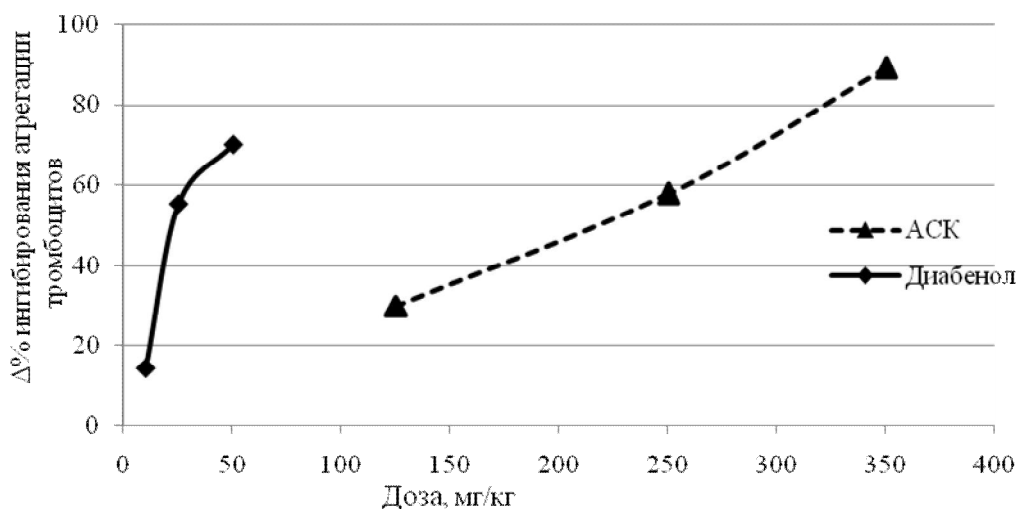
\*C<sub>max</sub> приведены на основании литературных данных

Однако известно, что в организме тромбоциты подвергаются воздействию не только АДФ, а одновременно влиянию нескольких факторов. Это мощные ингибиторы агрегации тромбоцитов – простагландин и NO (окись азота), проагреганты – коллаген сосудистой стенки, фактор активирующий тромбоциты, тромбин, скорость кровотока, активность ПОЛ (перекисное окисления липидов), дислипидемия и др. [Yuhki K., 2010]. Поэтому, чтобы достаточно полно учесть суммарное влияние указанных выше факторов на процесс образования агрегатов кровяных пластинок в сосудистом русле и точнее оценить антиагрегационный эффект исследуемых веществ было проведено исследование антитромбоцитарной активности веществ *in vivo* на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов.

В результате изучения было выявлено дозозависимое антиагрегантное действие диабенола и ацетилсалициловой кислоты (рис.10.1).



ED<sub>50</sub> диабенола при этом составила 25,4 мг/кг, что в 7,5 раза меньше ED<sub>50</sub> ацетилсалициловой кислоты (192 мг/кг).



**Рис. 10.1. Влияние диабенола и ацетилсалициловой кислоты (АСК) на внутрисосудистую агрегацию тромбоцитов крыс, индуцированную АДФ (1мг/кг)**

## **10.2. Антитромботическое действие диабенола на различных моделях артериальных тромбозов**

Одним из важных факторов, определяющих исход осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы при СД, является проблема артериальных тромбозов, которые неразрывно связаны с состоянием системы гемостаза [Hagedom I., 2010]. Так как тромбоциты являются ключевыми факторами развития тромбозов, возникла необходимость изучения антитромбогенного действия диабенола на различных моделях данной патологии.

Модель артериального тромбоза, индуцированного аппликацией хлорида железа. Изучение антитромботической активности гипогликемических средств, проводили на модели артериального

тромбоза у крыс, вызванного поверхностной аппликацией 50 % раствора хлорида железа (III) на сонную артерию [Kurz K.D., 1990]. В качестве препарата сравнения помимо ацетилсалициловой кислоты было также изучено пероральное гипогликемическое средство с антиагрегантной активностью – гликлазид. Все вещества вводились перорально. Диабенол вводился в дозах 18, 25 и 36 мг/кг, гликлазид в дозах 35,5, 50 и 100 мг/кг, ацетилсалициловая кислота в дозах 20, 125 и 350 мг/кг.

Моделирование артериального тромбоза осуществляли спустя 2 часа после введения препаратов. Для исследования использовали ультразвуковой компьютеризированный аппарат «Минимакс-Доплер-К» (Санкт-Петербург). Регистрацию кровотока вели до полной окклюзии сосуда (характеризуется отсутствием пульсации сонной артерии выше участка наложения тромбообразующего агента и характерного артериального звукового сигнала). В зависимости от проявленного антитромботического эффекта определяли ED<sub>50</sub> (доза, в которой изученные соединения увеличивают время окклюзии сосуда тромбом по отношению к контролю на 50%).

Модель артериального тромбоза, индуцированного электрическим током, была воспроизведена согласно методу Guglielmi G. (1991) на нелинейных крысах самцах массой 400–450 г. Условия моделирования тромбоза соответствуют вышеописанным. Индукция тромбоза сонной артерии проводилась постоянным электрическим током напряжением 12 В, сила тока соответствовала 50 мА. Диабенол был изучен в дозах 9, 18 и 36 мг/кг, ацетилсалициловая кислота в дозах 20, 60 и 125 мг/кг и гликлазид в дозах 18, 35,5 и 71 мг/кг.

Модель генерализованного адреналин-коллагенового тромбоза на мышах. Исследования выполнены на белых беспородных мышах обоего пола массой около 20–25 г. Модель клеточного тромбоза была поставлена в соответствии с методикой [Di Minno G, 1993]. В качестве тромботического агента использовали смесь растворов коллагена в дозе 0,5 мг/кг и адреналина в дозе 0,06 мг/кг. Диабенол изучали

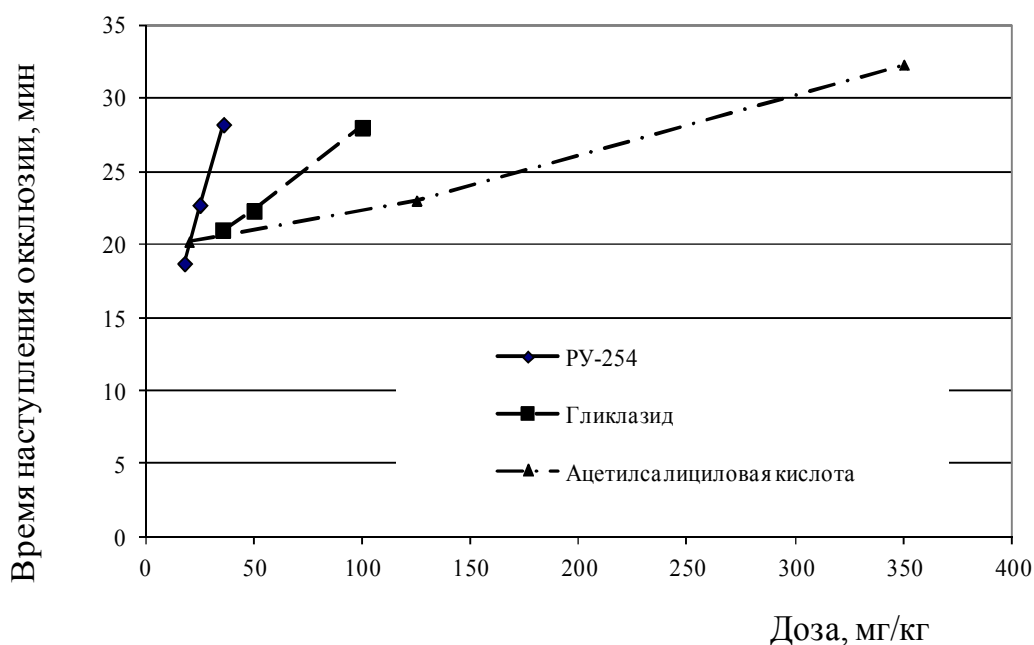
в изоэквивалентной дозе 20 мг/кг ацетилсалициловой кислоты. Соединения вводили перорально за 2 часа до моделирования тромбоза. В качестве критерия эффективности исследуемых соединений фиксировалось количество выживших животных по сравнению с контрольной группой и наличие тромбов в сосудах легких. За выжившими животными наблюдали в течение суток. Умершие и выжившие мыши (для эфтаназии применялся эфирный наркоз) подвергались вскрытию для гистологической оценки легких. У животных контрольной группы также проводили гистологическую оценку печени, сердца, почек, головного мозга. Гистологические препараты документировали цифровой камерой Olympus (Japan, 4.0 мегапикселей) на базе микроскопа Micros (Austria) с использованием объектива x10, x40 и окуляра x10. При морфологическом исследовании оценивали наличие признаков тромбообразования в стенке артериальных сосудов мышечного типа.

Статистическая обработка экспериментов по влиянию соединений на моделях артериальных тромбозов проводилась с использованием критерия Манна-Уитни. Расчет результатов исследований по влиянию соединений на выживаемость мышей при моделировании генерализованного тромбоза проводился с помощью точного критерия Фишера. Статистическую обработку данных гистологических исследований проводили с использованием программы «Видео Тест Морфо-4».

Полученные данные обрабатывались методами базисного статистического анализа в программе STATISTICA/w6.0 фирмы StatSoft, Inc., (США) и программным обеспечением Microsoft Excell 2003.

Изучение антитромботической активности диабенола на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией раствора хлорида железа на сонную артерию крысы. В контрольной группе животных среднее время окклюзии сонной артерии составило 17,4 мин, что соответствует значениям, полученным другими авторами [Максименко А.В., 1999; Tanaka T., 2000]. При введении живот-

ным исследуемых веществ, происходило увеличение времени наступления окклюзии. Так, время образования тромба при действии гликлазида в дозе 35,5 мг/кг и диабенола в дозе 36 мг/кг увеличивалось по отношению к контролю на 20,7 % и 62,3 % соответственно. Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота в дозе 20 мг/кг увеличивал время полной окклюзии сосуда на 16,8 %. При изучении дозозависимой антитромбогенной активности данных веществ были определены ED<sub>50</sub> [Спасов А.А., 2011]. Для диабенола и гликлазида они составили 31,1 и 74,5 мг/кг соответственно, а для ацетилсалициловой кислоты этот показатель оказался выше и был равен 114,7 мг/кг (рис. 10.2).



**Рис. 10.2. Влияние диабенола (РУ-254), гликлазида и ацетилсалициловой кислоты на время полной окклюзии сонной артерии на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией хлоридом железа**

Изучение антитромботической активности диабенола на модели артериального тромбоза, индуцированного электрическим током. На данной модели тромбоза среднее время окклюзии сонной артерии

контрольных животных составило 14,6 минут. Введение исследуемых препаратов перорально за два часа до воздействия тромботического агента в различной степени предупреждало время наступления полной окклюзии сонной артерии крыс. В таблице 10.3. представлена дозозависимая антитромботическая активность и ED<sub>50</sub> диабенола и препаратов сравнения.

Таблица 10.3

**Антитромботическая активность диабенола (ED<sub>50</sub>) и препаратов сравнения на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного электрическим током (M±m, n = 5)**

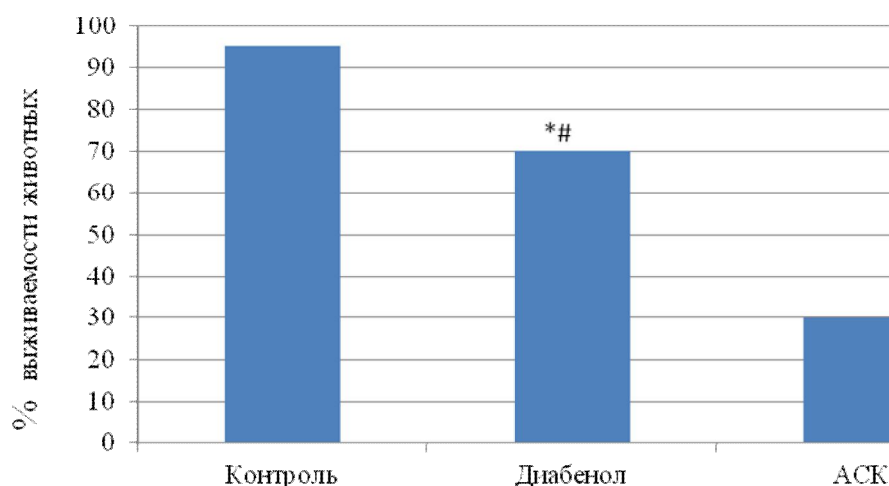
Вещества	Доза, мг/кг	Увеличение времени окклюзии по отношению к контролю, %	ED <sub>50</sub> , мг/кг
Диабенол	36	90±8,98***	16,8
	18	62,6±3,2***	
	9	9,5±2,79	
Ацетилсалициловая кислота	125	95,0±4,32***	61,9
	60	20,3±2,83*	
	20	8,0±5,25	
Гликлазид	71	78,0±4,84**	41,5
	35,5	42,1±1,71***	
	17,8	5,4±2,41	

\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p< 0,001 – данные статистически достоверны относительно контроля, критерий Манна-Уитни.

Таким образом, при сравнительной оценке препаратов оказалось, что наиболее эффективным в предотвращении окклюзии сонной артерии крыс, вызванной анодным током, оказался диабенол, который по значению ED<sub>50</sub> превосходил ацетилсалициловую кислоту и гликлазид в 3,7 и 2,5 раза соответственно.

Влияние диабенола на выживаемость мышей в условиях системного адреналин-коллагенового тромбоза. В группе контрольных животных наблюдалась гибель 95% мышей. Данный показатель соот-

ветствует значениям полученными другими авторами [Мурина М.А., 2002; Furie В., 2006]. При этом у животных наблюдались признаки нарушения дыхательной функции легких. Дыхание носило поверхностный характер и отмечалось увеличение его частоты. Также у мышей наблюдался выраженный экзофтальм, изменение цвета радужной оболочки глаз, парез задних конечностей: мыши не двигались, не отдергивали задние лапы при сильном нажатии, тетанические судороги. В течение 1-3 минут после введения тромботических агентов животные погибали. Результаты проведенных исследований представлены на рис.10.3.



**Рис. 10.3. Влияние диабенола и ацетилсалициловой кислоты (АСК) в эквимольных дозах на гибель белых мышей при системном коллаген-адреналиновом тромбозе. \*Данные статистически значимы по отношению к показателям группы контроля, критерий Фишера; # данные статистически значимы по отношению к показателям группы животных, получавших ацетилсалициловую кислоту, критерий Фишера**

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота оказала слабовыраженное защитное действие на животных с системным тромбозом. В группе мышей, получивших ацетилсалициловую кислоту, выжившие

животные составили 30 %. Диабенол в изученной дозе предотвращал смертность 70 % животных [Кучерявенко А.Ф., 2015]. Согласно литературным данным [Fugie В., 2006] причиной гибели животных с экспериментальной моделью адреналин-колагенового тромбоза является массивная окклюзия микрососудов легких тромбоцитарными агрегатами. Однако, чтобы доказать данный факт, помимо гистологического исследования легких, нами была выполнены гистологические исследования печени, сердца, почек и головного мозга животных. Результаты этих исследований показали, что микрососуды данных органов не были повреждены тромбами, что соответствует данным, полученным другими исследователями [Мурина М.А., 2002].

При микроскопическом исследовании образцов легких контрольных животных было обнаружено преобладание альвеол средних размеров. В большинстве сосудов микроциркуляторного русла были выявлены белые тромбы, которые были адгезированны к сосудистой стенке и находились в просвете сосуда. Также отмечалось расширение тромбированных капилляров межальвеолярных перегородок в 3–6 раз. В отдельных артериолах были обнаружены смешанные тромбы. Помимо наличия белых тромбов в венах отмечалось краевое стояние лейкоцитов.

Морфометрическое исследование срезов легких контрольных животных выявило, что относительная площадь тромбов на данных срезах составила 3,538 % , а средняя площадь тромба на срезах составила 1423, 5 мкм<sup>2</sup> (табл. 10.4).

При гистологическом исследовании легких животных, которые получали препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту, встречались альвеолы средних размеров, а также участки чередования эмфизематозно – расширенных альвеол и альвеол меньших размеров с выраженным полнокровием капилляров межальвеолярных перегородок. В некоторых сосудах микроциркуляторного русла обнаруживались белые и смешанные тромбы, адгезированные к сосудистой стенке. Отмечалось выраженное расширение тромбированных капилляров межаль-

веолярных перегородок. Однако в сравнении с контрольной группой, при применении ацетилсалициловой кислоты отмечалось достоверное снижение относительной площади тромбов на срезе легкого на 33,06 %, и недостоверное снижение средней площади тромбов на срезе на 6 % .

Таблица 10.4

**Влияние диабенола в дозе, эквимолярной дозе ацетилсалициловой кислоты, на изменение некоторых морфометрических параметров тромбов в сосудах легких мышей (M±m)**

Вещества	n	Доза, мг/кг	Относительная площадь тромбов на срезе легкого, %	Средняя площадь тромба на срезе легкого, мкм <sup>2</sup>
Контроль	10		3,538 ± 1,982	1423,5 ± 0,328
Диабенол	5	36	0,838 ± 0,688 **	1257 ± 881,5
Ацетилсалициловая кислота	5	20	1,327 ± 0,952 *	1337,7 ± 888,5

\* $p \leq 0,01$ ; \*\* $p \leq 0,001$  данные статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни; n – число тестируемых животных.

У выживших животных, получавших диабенол, при электронномикроскопическом исследовании обнаружено преобладание нарушения кровообращения по типу полнокровия капилляров межальвеолярных перегородок, а также явления диапедеза эритроцитов в межальвеолярные перегородки. По сравнению с контрольной группой отмечалось достоверное снижение относительной площади тромбов на срезе легкого на 66,9 %, а средней площади тромбов на срезе на 11,7 %. Выявленные изменения морфометрических параметров в целом соответствуют качественным структурным изменениям в сосудах легких и свидетельствуют о более выраженной противотромботической активности диабенола по сравнению с ацетилсалициловой кислотой.



Таким образом, в результате изучения влияния нового гипогликемического средства на процессы тромбообразования, вызванных тромботическими агентами и при повреждении стенки артерий факторами различного генеза, установлена его высокая антитромботическая активность при однократном пероральном введении интактным крысам за 2 часа до моделирования тромбозов. Полученные данные проявления выраженных антитромботических свойств у диабенола подтверждают наличие у него антиагрегантного действия. На это также указывает факт, что данные модели артериальных тромбозов являются тромбоцит-зависимыми, так как в их инициации ключевую роль играют именно тромбоциты.

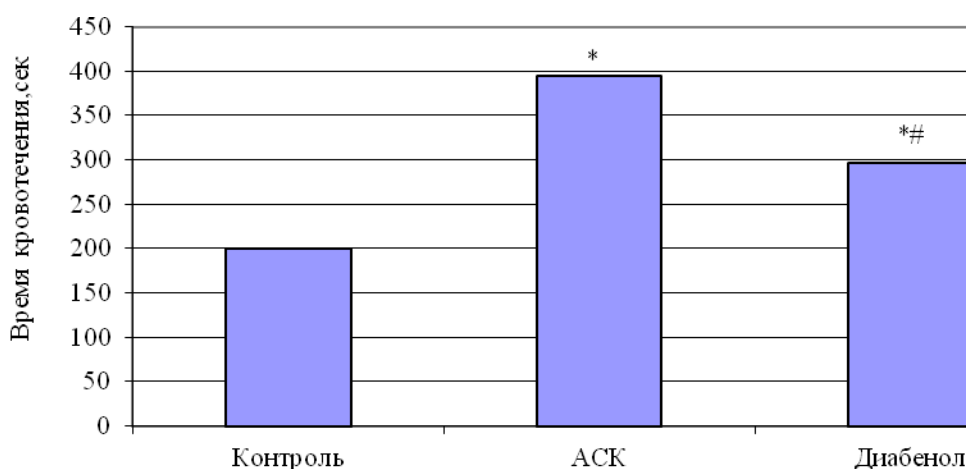
### **10.3. Влияние диабенола на время кровотечения**

Хорошо известно, что антиагрегантная терапия часто сопровождается различными осложнениями, одними из которых являются кровотечения [Kilickiran A.V., 2008; Ueno M., 2011]. Поэтому лечение тромботических состояний требует деликатного баланса между предотвращением новых тромботических случаев и возникновением осложнений. Экспериментальная модель «время кровотечения» позволяет оценить выраженность возникновения данного побочного эффекта у антиагрегантных средств.

Для определения времени свертывания крови была использована модель «время кровотечения на мышах» [Gratacap M., 2009]. Для этого у мыши отсекали 5 мм с кончика хвоста. Хвост помещали в пробирку с физраствором на водяной бане (37 °С) и регистрировали время от момента отсекания кончика хвоста до момента прекращения вытекания крови из сосудов хвоста. По влиянию на данный параметр диабенол и ацетилсалициловая кислота были изучены в дозах равных ED<sub>50</sub>, полученных на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов при пероральном ведении животным за 2 ч до исследования.

Экспериментальные данные по влиянию диабенола и ацетилсалициловой кислоты представлены на рис. 10.4.

Контрольное значение времени кровотечения из хвостовой вены мыши составило  $199,8 \pm 4,96$  секунд, что соответствует данным полученными другими авторами [Ма Н., 2001]. Диабенол пролонгировал данный показатель на 50,8 % по отношению к значениям, полученным в контроле. Время продолжительности кровотечения из хвостовой вены мыши при этом составило  $297 \pm 22,28$  секунд.



**Рис. 10.4. Влияние диабенола и ацетилсалициловой кислоты на время кровотечения у мышей. \* $p < 0,05$  – изменения статистически значимы по отношению к контролю; # изменения статистически значимы по отношению к АСК (ацетилсалициловая кислота)**

Препарат сравнения ацетилсалициловая кислота достоверно пролонгировала время кровотечения на 98,14 %. Время кровотечения при этом составило  $394,8 \pm 17,19$  секунд, что в два раза превосходило данный показатель группы контрольных животных.

Таким образом, диабенол по сравнению с ацетилсалициловой кислотой в меньшей степени пролонгировал время кровотечения, что

позволяет предположить в будущем отсутствие или наличие слабо-выраженных побочных эффектов в виде кровотечений.

#### **10.4. Влияние диабенола на рецепторные механизмы агрегации тромбоцитов**

Специфическая фармакологическая активность проявляется взаимодействием вещества с рецептором или белком-мишенью. Сложность проблемы избирательной фармакологической регуляции активности тромбоцитов заключается в том, что на их мембране экспрессированы рецепторы к различным индукторам агрегации. Основными физиологическими активаторами считаются коллаген (главный белок внеклеточного матрикса) и тромбин, которые относятся к сильным эффекторам, а также АДФ и ТХА<sub>2</sub> (вторичные активаторы, секретруемый тромбоцитами) [Yoshida S., 2008; Yuhki K., 2010]. Активаторы, взаимодействуя с соответствующими мембранными рецепторами тромбоцита, способствуют его переходу в активированное состояние, которое характеризуется изменением формы, адгезией, агрегацией, секрецией содержимого гранул, формированием прокоагулянтной поверхности [Jennings L.K., 2009]. Поэтому нам представилось интересным выяснить, не является ли диабенол конкурентным антагонистом индукторов агрегации тромбоцитов.

Изучение влияния диабенола на агрегацию тромбоцитов, вызванную различными индукторами проводили по вышеописанному методу Born G, в модификации Габбасова В.А. (1989). В качестве индукторов использовали адреналин, тромбин, U46619 (агонист тромбоксановых рецепторов), арахидоновую кислоту, фактор активации тромбоцитов, ристоцетин («Sigma», США), коллаген (НПО «Ренам», Россия).

Влияние диабенола на пуриновые P2Y<sub>1</sub> и P2Y<sub>12</sub>-рецепторы тромбоцитов изучали методом малоуглового светорассивания [Сака-

ев, М.Р., 2000]. Регистрацию проводили на приборе «Лайт-Скан» (НПФ «Люмекс», Россия). Исследования проводились на богатой тромбоцитами плазме кроликов. Активацию тромбоцитарных P2Y<sub>1</sub>-рецепторов проводили в безкальциевой среде, с добавлением 5 мМ ЭДТА (натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты). В качестве индуктора активации данных рецепторов использовали АДФ в концентрации 70 нМ. Эксперименты по оценке влияния соединений на P2Y<sub>12</sub>-рецепторы проводились в среде, содержащей 1 мМ кальция хлорида. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов также использовали АДФ, но в концентрации 200 нМ. Тестируемые вещества изучали в дозе 1 × 10<sup>-6</sup> М и вносили в кювету за 2 минуты до начала исследования.

Эффективность действия диабенола и веществ сравнения на пуриновые рецепторы тромбоцитов оценивали по ингибированию процессов активации и агрегации тромбоцитов. В качестве веществ сравнения использовали Reactive blue 2 (Basilen blue) («Sigma», США) и PPADS («Sigma», США).

В таблице 10.5 представлены значения EC<sub>50</sub> антиагрегантной активности диабенола в отношении изученных индукторов агрегации тромбоцитов. Диабенол дозозависимо ингибировал агрегацию тромбоцитов, вызванную всеми изученными индукторами, за исключением тромбина. Механизм действия коллаген-индуцированной агрегации в концентрации 20 мкг/мл, реализуется через активацию фосфолипазы С по инозитолфосфатному пути. Однако в проведенных исследованиях было показано, что диабенол более выражено блокирует коллаген-индуцированную агрегацию при использовании индуктора в низких дозах.

Согласно литературным данным [Wu С.С., 2005], агрегация тромбоцитов, стимулированная низкими дозами коллагена, вызывает инициацию процесса межтромбоцитарного взаимодействия, главным образом, путем активации фосфолипазы А<sub>2</sub> с последующим высвобождением арахидоновой кислоты и синтезом ТХА<sub>2</sub> (тромбоксана

A<sub>2</sub>), что может указывать на связь механизма антиагрегантного действия данного соединения со снижением образования ТХА<sub>2</sub>. На это также указывает способность диабенола блокировать агрегацию тромбоцитов, индуцированную ФАТ, так как в изученной концентрации процесс стимуляции тромбоцитов происходит по тромбоксан-зависимому пути.

Таблица 10.5

**Влияние диабенола на агрегацию тромбоцитов (EC<sub>50</sub>,М) кролика *in vitro*, вызванную различными индукторами**

Индукторы агрегации тромбоцитов	Концентрация индуктора	EC <sub>50</sub> ,М
		Диабенол
АДФ	5 мкМ	2,6 x 10 <sup>-4</sup>
Адреналин	5 мкМ	2,5 x 10 <sup>-4</sup>
Арахидоновая кислота	50мкМ	8,4 x 10 <sup>-4</sup>
Коллаген	4 мкг/мл	9,0 x10 <sup>-5</sup>
Коллаген	20 мкг/мл	1,8 x 10 <sup>-4</sup>
Тромбин	0,5 ед/мл	Не активно
U46619	3 мкМ	1,2 x 10 <sup>-3</sup>
Фактор активации тромбоцитов	0,01 мкМ	1,85 x 10 <sup>-4</sup>
Ристоцетин	1,2 мкг/мл	2,63 x 10 <sup>-4</sup>

В отношении ингибирования агрегации тромбоцитов, индуцированной агонистом тромбоксановых рецепторов U46619, диабенол проявил очень низкую активность, что указывает на отсутствие у него влияния на рецепторы к ТХА<sub>2</sub>. Также препарат практически не влиял на агрегацию тромбоцитов, стимулированную тромбином, что позволяет предположить отсутствие связи механизма антиагрегантного действия с блокированием Пв/Ша – рецепторов тромбоцитов.

Диабенол в концентрации 10<sup>-6</sup> М не оказывал влияния на активацию тромбоцитов в безкальциевой среде, вызванную P2Y<sub>1</sub> рецепторами тромбоцитов. P2Y<sub>1</sub>антагонистическая активность диабенола со-

ставила всего 2,04 %. Тогда как вещество сравнения – реактив Basilen blue, обладающий неселективным антагонизмом по отношению к P2Y-рецепторам в концентрации  $10^{-6}$ М, продемонстрировал эффект равный 21,5 %.

По влиянию на агрегацию тромбоцитов, вызванную P2Y<sub>12</sub> рецепторами эффект диабенола оказался статистически незначимым относительно вещества сравнения PPADS.

### **10.5. Действие диабенола на баланс простациклина и тромбоксана (ТХА<sub>2</sub>) в организме крыс**

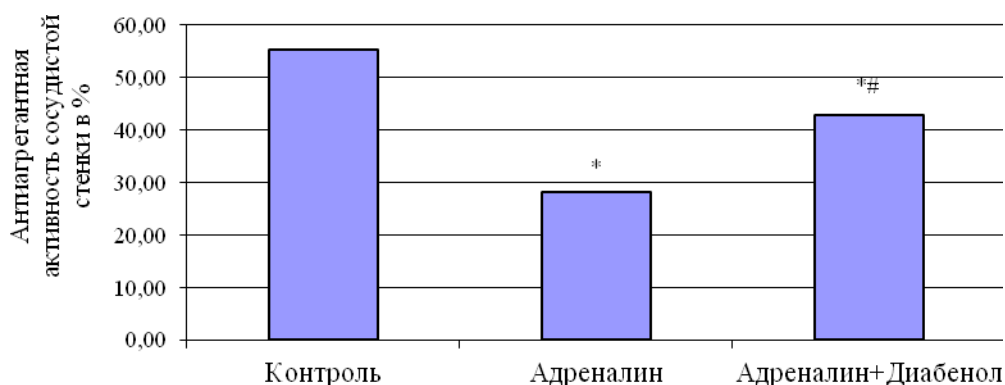
Перспективным направлением в изучении антиагрегантного действия соединений является воздействие на соотношение между продуктами метаболизма арахидоновой кислоты – простациклином и ТХА<sub>2</sub>. Хорошо известно, что стенки сосудов артерий содержат значительно больше простациклина – мощного антиагрегационного фактора, чем другие ткани [Lyu D., 2010]. Однако при СД происходит снижение противотромботического потенциала сосудистой стенки и увеличение продукции ТХА<sub>2</sub>, что обеспечивает гиперагрегацию кровяных пластинок на фоне вазоконстрикции [Moscardó A., 2011]. Доказательством повышения синтеза ТХА<sub>2</sub> является обнаружение значительного количества малонового диальдегида (МДА) в тромбоцитах [Никонов В.В., 2008]. Хорошо известно, что ацетилсалициловая кислота снижает синтез эндотелием простациклина. Поэтому было изучено влияние диабенола на простациклин-генерирующую активность стенки аорты, а также на уровень МДА в тромбоцитах животных при индукции тромбином. Изучение влияния диабенола на уровень ТХА<sub>2</sub> производили в дозе, соответствующей ED<sub>50</sub>, полученной на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов.

Антиагрегационную активность сосудистой стенки оценивали по методу [MacIntyre D.E., 1978]. Метод основан на способности

фрагмента сосудистой стенки, помещенной в обогащенную тромбоцитами плазму, выделять простаглицлин и тормозить агрегацию кровяных пластинок, вызванную различными индукторами. Эксперименты проводили на белых беспородных крысах массой 250-350 г. В первой серии исследований изучали влияние соединения на антиагрегационные свойства сосудистой стенки здоровых животных. Диабенол, в дозе равной  $ED_{50}$ , вводили животным внутривенно за 30 минут до наступления наркоза, после чего извлекали участок брюшной аорты и проводили определение ее антиагрегационной функции.

Во второй серии экспериментов исследовали способность диабенола восстанавливать снижение антиагрегационной способности стенки сосудов, вызываемое адреналином в дозе 0,02 мг/кг при внутривенном введении. Исследуемое вещество вводили через 15 минут после инъекции адреналина, а еще через 15 минут проводили определение антиагрегационной функции сосудистой стенки аорты. Для оценки активности соединений определяли максимальную амплитуду агрегации и  $\Delta\%$  ингибирования функциональной активности тромбоцитов (рис. 10.5)

Исследования по изучению воздействия диабенола на синтез  $TXA_2$  проводили по методу J.V. Smith (1976) на белых нелинейных крысах обоего пола массой 250-300 г. Исследуемые вещества вводились перорально за 2 часа до исследования. В качестве препарата сравнения была выбрана ацетилсалициловая кислота. Для выполнения данного метода агрегацию тромбоцитов индуцировали тромбином в концентрации 25 ед/мл. Определение МДА в процессе агрегации, индуцированной тромбином, проводили с помощью тиобарбитуровой кислоты по методу В.Б. Гаврилова (1987). Измерение проводили на спектрофотометре APPL PD-303 UV (Япония) при длине волны, равной 532 нм. Концентрацию МДА рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции равного  $1,56 \times 10^5$  М.



**Рис. 10.5. Влияние диабенола на антиагрегационную активность сосудистой стенки, сниженную адреналином ( $M \pm m$ ). # изменения статистически значимы по отношению к результатам, полученным после введения адреналина; \*изменения статистически значимы по отношению к контролю**

Было показано, что стенка аорты крыс образует и высвобождает в инкубируемую среду сильный антиагрегационный фактор, по действию подобный простаглицлину. Адреналин, при внутривенном введении, тормозит антиагрегационную активность стенки аорты, что ведет к повышению тромбогенного потенциала крови и увеличивает риск возникновения тромбоза. Диабенол не влиял на образование простаглицлиноподобной субстанции стенкой аорты интактных животных и восстанавливал ее антиагрегационную функцию сниженную адреналином, в чем состоит его преимущество перед известным антиагрегантным средством ацетилсалициловой кислотой (табл. 10.6).

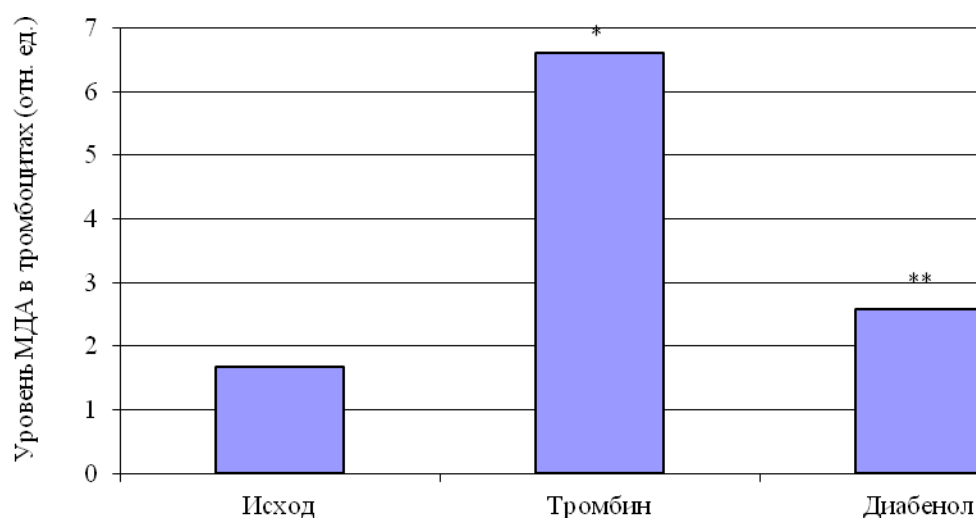
В результате определения влияния диабенола на синтез  $TXA_2$  было показано, что данный препарат достоверно снижал уровень МДА в тромбоцитах крыс, стимулированных тромбином на 61 %. При этом препарат сравнения ацетилсалициловая кислота – на 54,3 % (рис. 10.6).



### Влияние диабенола на антиагрегационную активность сосудистой стенки

Исследуемое соединение	Доза мг/кг	Ингибирование агрегации тромбоцитов (отн. ед., $M \pm m$ )		
		Контроль БТП	БТП + сосудистая стенка	
			в исходном состоянии	через 30 мин после в/в введения вещества
Диабенол	26	$36,66 \pm 3,28$	$16,3 \pm 0,95^*$	$14,9 \pm 1,05^*$

\* $p < 0,05$  – данные статистически значимы по отношению к контролю; БТП – богатая тромбоцитами плазма.



**Рис. 10.6. Влияние диабенола и ацетилсалициловой кислоты (АСК) на изменение уровня малонового диальдегида (МДА) в тромбоцитах крыс в процессе агрегации, индуцированной тромбином (25 ед/мл): исход – содержание МДА в интактных тромбоцитах; тромбин – уровень МДА после стимуляции тромбоцитов тромбином. \* $p < 0,01$  – достоверность относительно исхода; \*\* $p < 0,01$  – достоверность относительно агрегации тромбоцитов, индуцированной тромбином**

## 10.6. Влияние диабенола на уровень кальция в тромбоцитах животных

Биохимические процессы, происходящие при активации, а в дальнейшем при агрегации красных кровяных пластинок, вызванные различными химическими и биологическими стимуляторами, протекают по различным механизмам действия. Однако действие всех этих стимуляторов сводится к одному – к повышению уровня кальция в цитоплазме тромбоцитов [Colomer J., 2010]. Поэтому можно полагать, что ионы  $\text{Ca}^{2+}$  являются ключевым фактором в регуляции функциональной активности тромбоцитов. Изменение концентрации внутриклеточного кальция тромбоцитов является сигналом для активации или ингибирования ферментов, которые, в свою очередь, регулируют метаболизм, сократительную и секреторную активность, адгезию и клеточный рост [Bergmeier W., 2009]. Поэтому было исследовано влияние диабенола на степень агрегации тромбоцитов, индуцированной кальциевым ионофором A25187, а также на уровень внутриклеточного и мембранносвязанного  $\text{Ca}^{2+}$ .

Изучение влияния диабенола на уровень кальция в тромбоцитах проводили на агрегометре по методу Борн, в модификации Габбасова на плазме кроликов. В качестве индуктора агрегации тромбоцитов использовали A 23187 (кальциевый ионофор) в концентрации 3 мкМ.

Определение изменений уровня внутриклеточного кальция проводили согласно методу, описанному Ryu S.K. (2006). Для этого отмытые тромбоциты ( $10^8$ /мл) кролика были проинкубированы с 5 мкМ Fura-2/AM в течение 30 минут при температуре 37 °С в присутствии или отсутствии хлорида кальция (1 mM). В качестве препаратов сравнения были выбраны ацетилсалициловая кислота и антагонист ионов кальция верапамил. В качестве стимулятора выхода интрацеллюлярного кальция из внутриклеточных депо был использован тромбин в концентрации 0,5 ед/мл. Перед проведением данных исследований

изучали хелатирующую способность соединения по отношению к ионам кальция. Для этого сравнивали влияние вещества на уровень кальция в интактных тромбоцитах с влиянием хелатора этих ионов ЭГТА. Оценка действия диабенола и препаратов сравнения на уровень внутриклеточного кальция проводилась в диапазоне концентраций от 100 до 1 мкМ. Интенсивность флуоресценции была измерена на спектрофлуориметре Hitachi MPF-400 (Япония) при длине волны возбуждения 340 nm и 380 nm и длине волны испускания 510 nm в течение 2 минут. Концентрация катионов кальция рассчитывалась с помощью уравнения (Schaeffer and Blaustein, 1989):  $[Ca^{2+}]_i$  (нМ) =  $224 \text{ нМ} \times (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$ ,

где: 224 нМ – константа диссоциации комплекса Fura-2/AM и кальция,

F – интенсивность флуоресценции зонда в пробе (отн.ед.) с тромбином без и с веществами,

F min – собственная флуоресценция зонда, свободного от кальция, измеренная после добавления 10 mM ЭГТА,

F max – флуоресценция зонда, насыщенного кальцием, измеренная после добавления в пробу 10 мкМ 0,1% Triton X-100.

Для диабенола была экспериментально определена величина EC<sub>50</sub> (эффективные концентрации, в которых изученные соединения подавляют процесс высвобождения внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> на 50 %)

Уровень мембраносвязанного кальция в тромбоцитах измеряли с использованием кальций-чувствительного флуоресцентного зонда хлортетрациклина в концентрации 20 мкМ по методу, описанному Casvell и Hutchison (1971). Оценка действия препаратов на уровень мембраносвязанного кальция проводилась в диапазоне концентраций от 100 до 1 мкМ.

Действие диабенола на потенциал-зависимые кальциевые каналы изучали, используя метод гиперкалиевой контрактуры [Golenhofen, 1973]. Эксперименты проводили на изолированных портальных венах, которые выделялись у наркотизированных крыс (нембу-

тал, 50 мг/кг), массой 200–250 г. Изолированную вену помещали в камеру с перфузирующим карбогеном ( $O_2$  – 95 %,  $CO_2$  – 5 %) раствором Кребса–Хенселейта. Сокращения изолированного сосуда измеряли в изометрическом режиме при нагрузке в 1 грамм. Регистрацию сокращения вены производили на быстродействующем самопишущем приборе Unirecord 7050 (*Ugo Basile*, Италия). Активацию потенциал-зависимых кальциевых каналов осуществляли добавлением в камеру с изолированной веной хлорида калия (KCl) в конечной концентрации 60 мМ. Диабенол добавляли в камеру в диапазоне концентраций 1-100 мкМ за 5 минут до создания контрактуры. В качестве препарата сравнения использовали антагонист ионов  $Ca^{2+}$  верапамил. При изучении хелатирующей способности диабенола по отношению к ионам кальция было показано, что в отличие от ЭГТА оно не обладает способностью связывать ионы кальция в интактных тромбоцитах, то есть не является хелатором ионов кальция. Однако диабенол достоверно ингибировал агрегационную активность тромбоцитов, индуцированную кальциевым ионофором A23187 на 77,8 %. Его  $EC_{50}$  при этом составила 48 мкМ.

Влияние диабенола на концентрацию внутриклеточного кальция в тромбоцитах. Прирост флуоресценции Fura-2/AM, индуцированный тромбином, в присутствии внеклеточного  $Ca^{2+}$  отражает суммарный прирост внутриклеточного  $Ca^{2+}$  за счет входа в клетку и мобилизации его из внутренних источников. В то же время увеличение флуоресценции Fura-2/AM, индуцированное тромбином в отсутствие внеклеточного  $Ca^{2+}$ , отражает высвобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. Диабенол дозозависимо уменьшал прирост внутриклеточного  $Ca^{2+}$  по сравнению с контролем и  $EC_{50}$  для него составила 34 мкМ. Препарат сравнения – ацетилсалициловая кислота в дозе 100 мкМ оказалась не эффективной, так как снижала прирост внутриклеточного кальция всего на 1,7 % по сравнению с контролем. Антагонист ионов кальция верапамил в меньшей степени, чем РУ-254 снижал уровень внутриклеточного кальция (табл. 10.7).

**Влияние диабенола и препаратов сравнения на уровень  
внутриклеточного кальция в тромбоцитах, индуцированного  
тромбином в концентрации 0,5 ед/мл в кальциевой среде  
(опыты *in vitro*)**

Названия веществ	Дозы соединений, мкМ	Уровень внутриклеточного кальция, Нм (M±m)
Суспензия тромбоцитов	-	50,61±1,65
Суспензия тромбоциты + тромбин	контроль	259,63±4,81
Суспензия тромбоциты + тромбин + диабенол	100	108,7±8,58**
	10	149,83±5,2**
	1	245,56±5,49
Суспензия тромбоциты + тромбин + ацетилсалициловая кислота	100	262,8±5,1
Суспензия тромбоциты + тромбин + верапамил	100	178,54±7,7*

\* $p < 0,01$ ;

\*\* $p < 0,001$  – изменения статистически значимы относительно контроля.

Однако при проведении этих исследований в отсутствии внешнего  $\text{Ca}^{2+}$  диабенол и препараты сравнения не проявили активности. Полученные данные указывают на то, что новое гипогликемическое средство не влияет на уровень внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в тромбоцитах, но, по-видимому, ингибирует его внеклеточный уровень, который, в свою очередь, способствует выходу цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  из тубулярной системы тромбоцитов. В связи с этим представилось необходимым выяснить, не связано ли действие диабенола с влиянием на потенциал-зависимые кальциевые каналы. На модели гиперкалиевой контрактуры диабенол в концентрации 100 мкМ ингибировал КСl-контрактуру на 6,8 %, тогда как препарат сравнения верапамил – на 95,15 %.

Полученные результаты подтверждают отсутствие зависимости между ингибированием диабенолом накопления внутриклеточного кальция под влиянием тромбина и влиянием на потенциал-зависимые кальциевые каналы.

### **10.7. Влияние диабенола на тромбоцитарно-сосудистый гемостаз при аллоксановом диабете**

Тромбоциты, как важный элемент системы гемостаза, связывая его сосудистый компонент с коагуляционным, играют важную роль в развитии сосудистых осложнений у больных СД [Балаболкин, 2005; Дедов, 2009; Lopes, 2011]. При этом нарушения в системе гемостаза обуславливают ускоренное прогрессирование атеросклероза, что сопровождается риском возникновения тромбозов.

Поэтому была проведена комплексная оценка воздействия производных бензимидазола на показатели агрегации тромбоцитов, эндотелиальной дисфункции и способность предотвращать артериальный тромбоз, вызванный электрическим током в условиях экспериментальной модели аллоксанового диабета.

Экспериментальный СД вызывали свежеприготовленным на 0,01 М ацетатном буфере раствором аллоксана в дозе 150 мг/кг при внутрибрюшинном введении [Chougale A., 2007]. Эксперименты проводили через два месяца на животных с тяжелой формой сахарного диабета, у которых развивалась стойкая гипергликемия с содержанием глюкозы более 15 ммоль/л. Уровень глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом.

Влияние диабенола на агрегацию тромбоцитов крыс *ex vivo* изучали по методу Born G.(1962) в модификации Габбасова З.А. и др (1989). Пробы крови для исследования забирали из брюшного отдела аорты крыс, находящихся под нембуталовым наркозом (50 мг/кг).

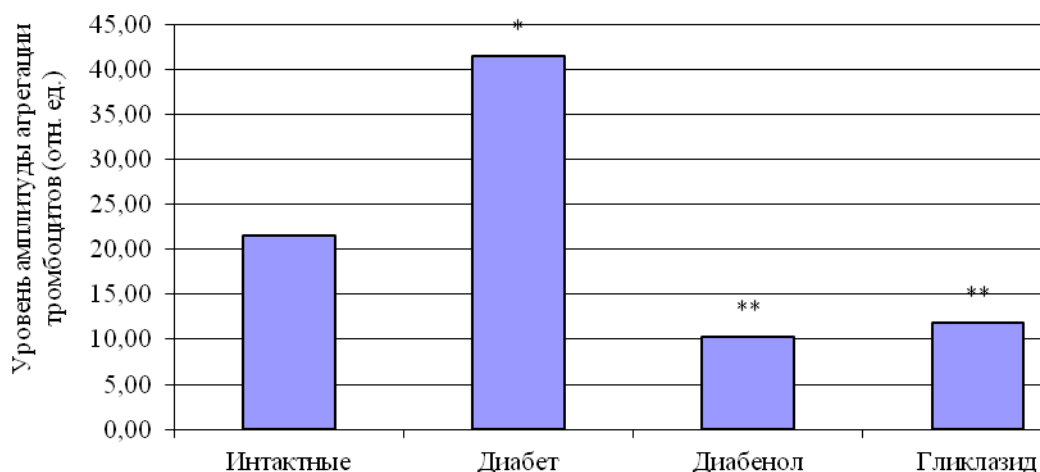
При изучении влияния на агрегацию тромбоцитов пероральное введение диабенола в дозе 25,4 мг/кг (доза, соответствующая ED<sub>50</sub>, полученной на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов) и гликлазида в дозе 10 мг/кг осуществляли в течение 7 дней.

Модель артериального тромбоза, индуцированного электрическим током была поставлена согласно вышеописанному методу. На модели экспериментального тромбоза, индуцированного электрическим током осуществляли пероральное семидневное введение веществ в дозе, равной ЭК<sub>50</sub>, полученной при изучении диабенола на данной модели у интактных животных.

Эксперименты по изучению влияния диабенола на коэффициент эндотелиальной дисфункции выполнены согласно методу М.В. Покровского (2006). Изучение влияния веществ на коэффициент эндотелиальной дисфункции производилось в дозе, соответствующей ED<sub>50</sub>, полученной на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов. Интактным животным исследуемые соединения вводились внутрижелудочно за 2 часа, а животным с экспериментальным диабетом ежедневно в течение 7 дней до начала эксперимента. Функциональные пробы проводились путем болюсного внутривенного введения ацетилхолина (40 мкг/кг) и нитропруссид натрия (30 мкг/кг).

Математическое выражение описанного явления было представлено в виде коэффициента эндотелиальной дисфункции (КЭД), являющимся отношением площади среднего артериального давления на нитропруссид натрия к площади среднего артериального давления на ацетилхолин.

При исследовании образцов крови, взятых у крыс с аллоксановым диабетом наблюдалось увеличение амплитуды агрегации тромбоцитов в 2 раза по сравнению с интактными животными. Диабенол и гликлазид достоверно ингибировали данный показатель на 29,72 % ( $p \leq 0,05$ ) и 26,87 % ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 10.7).



**Рис. 10.7.** Действие диабенола и гликлазида при курсовом введении на агрегацию тромбоцитов крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом *ex vivo* в дозах равных ED<sub>50</sub>, полученных на модели внутрисосудистой агрегации тромбоцитов. \* $p < 0,05$  – данные статистически значимы относительно интактных животных; \*\* $p < 0,05$  – данные статистически значимы относительно животных с экспериментальным диабетом

При сравнительной оценке действия диабенола и гликлазида на процессы тромбообразования у животных с аллоксановым диабетом, вызванные повреждением стенки артерий электрическим током, оказалось, что наиболее эффективным в предотвращении окклюзии сонной артерии крыс оказался диабенол. Полная окклюзия сонной артерии при введении данного вещества наблюдалась на 21 мин, что составляло увеличение времени образования тромба на 78,5 % ( $p < 0,001$ ) по отношению к контролю. Препарат сравнения гликлазид в изученной дозе достоверно увеличивал время наступления полной окклюзии сосуда на 61,2% ( $p < 0,001$ ) по отношению к контролю (табл. 10.8).

При изучении действия диабенола на функциональную активность эндотелия на первом этапе исследования были проведены функциональные пробы с оценкой реакции на эндотелий-зависимое



и эндотелий-независимое снижение среднего артериального давления у интактных животных.

Таблица 10.8

**Антитромботическая активность диабенола и гликлазида при курсовом введении на модели индуцированного электрическим током тромбоза сонной артерии крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом**

Вещества	Доза, мг/кг	Увеличение времени окклюзии по отношению к контролю, %
Диабенол	17	78,5±3,8**
Гликлазид	42	61,2±3,9**

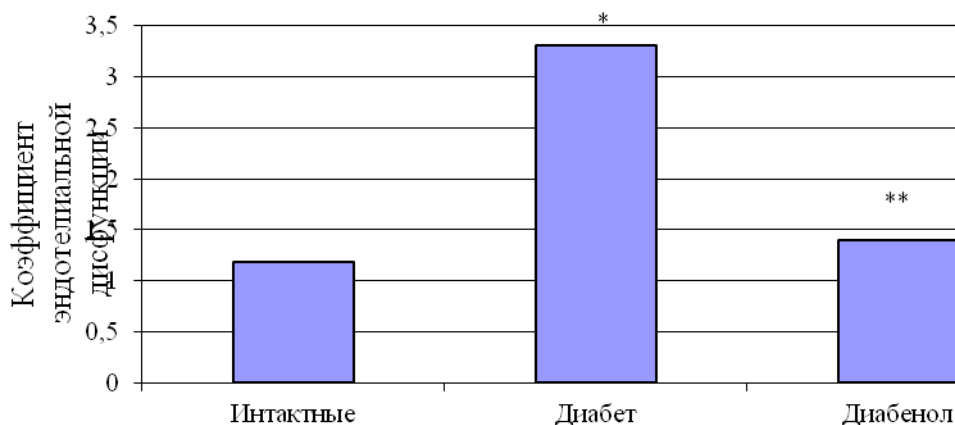
\* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$  – данные статистически значимы по отношению к контролю, критерий Манна-Уитни.

Реакция на введение ацетилхолина и натрия нитропруссиды характеризовалась резким падением артериального давления, которое восстанавливалось через 5 минут. Была проведена оценка влияния диабенола на степень снижения среднего артериального давления, вызванное ацетилхолином и натрием нитропруссидом, и время его восстановления до исходных значений и рассчитана площадь под кривой среднего артериального давления в ответ на введение данных веществ.

В группе контрольных животных площадь под кривой среднего артериального давления в ответ на введение натрия нитропруссиды составила 4,83 отн.ед., а на введение ацетилхолина – 4,05 отн. ед. Для диабенола данный показатель в ответ на введение натрия нитропруссиды составил 3,52 отн.ед., а на введение ацетилхолина – 4,63 отн. ед. соответственно. КЭД был представлен в виде математического выражения, являющимся отношением площади среднего артериального давления на нитропруссид натрия к площади среднего артериального давления на ацетилхолин. У контрольной группы животных КЭД со-

ставил 1,19 (рис. 10.8). КЭД для диабенола недостоверно отличался от данных, полученных в контроле, и составил 1,1 отн. ед, что позволяет сделать вывод об отсутствии у него прямого влияния на функцию сосудистого эндотелия.

На втором этапе было изучено влияние диабенола на эндотелиальную дисфункцию при экспериментальном диабете. КЭД у крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом составил 3,1 отн. ед, что достоверно превышало контрольные значения в 2,6 раза. Данная разница в показателях свидетельствует о существенном нарушении функции эндотелия сосудов у животных с аллоксановой интоксикацией. Диабенол, при курсовом введении крысам с экспериментальным диабетом, изменял показатель эндотелиальной дисфункции относительно контрольных значений, полученных у больных животных на 93,6 % (рис. 10.8). Таким образом, диабенол восстанавливает функциональную активность эндотелия у животных с экспериментальным аллоксановым диабетом.



**Рис. 10.8. Влияние диабенола при курсовом введении на коэффициент эндотелиальной дисфункции крыс с аллоксановым диабетом.\* $p < 0,05$  – данные статистически значимы относительно значений, полученных на интактных животных; \*\* $p < 0,05$  – данные статистически значимы относительно значений, полученных на животных с экспериментальным сахарным диабетом**

## 10.8. Заключение

В результате изучения комплексного влияния антидиабетического соединения диабенол на параметры гемостаза было показано, что данное вещество оказывает выраженное антитромбогенное действие. Важное значение при этом имеет блокирование диабенолом АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, так как при СД АДФ принадлежит одна из главных ролей в инициации процессов агрегации тромбоцитов, которая приводит к повышению поступления внеклеточного  $Ca^{2+}$  путем открытия АДФ-зависимых неселективных кальциевых каналов. Высокая антитромботическая активность диабенола на моделях артериальных тромбозов в норме и при экспериментальном СД, превосходящая препарат сравнения гликлазид, связана с его влиянием на процессы агрегации тромбоцитов. Тем более, что данные модели тромбозов являются тромбоцит-зависимыми.

Согласно полученным экспериментальным данным, возможный механизм антиагрегантного действия диабенола может быть связан со снижением синтеза  $TXA_2$  в тромбоцитах. На это указывает способность данного соединения выражено блокировать агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой и низкими концентрациями коллагена, а также снижать уровень МДА в тромбоцитах крыс.

Кроме того, преимущество антиагрегантного действия диабенола перед известным антиагрегантным средством ацетилсалициловой кислотой состоит в том, что изученный препарат не оказывает влияния на способность сосудистой стенки вырабатывать простагландин, а также в меньшей степени пролонгирует время кровотечения. Таким образом, антидиабетическое средство диабенол проявляет выраженную антитромбогенную активность.

Исследования, описанные в данной главе, выполнены в Волгоградском государственном медицинском университете при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-25-00139).

# ГЛАВА 11

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДИАБЕНОЛА НА ГЕМОРЕОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ

*А. А. Спасов, Л. В. Науменко*

---

Сложность патогенеза диабетических ангиопатий делает необходимым, в целях профилактики и лечения сосудистых осложнений диабета, активное воздействие на различные его звенья. В качестве пусковых механизмов развития диабетических ангиопатий рассматривают генетические дефекты сосудистой стенки и диабетическое нарушение обмена веществ. Дальнейшее развитие сосудистых поражений связывают с нарушением нервно-гуморальной (гормональной) регуляции, гемореологии, оксигенации с гиперпродукцией контринсулярных гормонов и аутоиммунными сдвигами. Выраженные гемореологические нарушения у больных сахарным диабетом отмечаются уже на ранних стадиях диабетической ангиопатии и характеризуются повышением вязкости крови, что в первую очередь связывают с усилением агрегационной способности эритроцитов и тромбоцитов [Галенок В.А., 1987; Ена Я.М., 1991; Новицкий В.В., 1999; Galeone, 1998].

Эксперименты были выполнены на 220 нелинейных крысах и 17 кроликах. Для комплексной оценки состояния реологических свойств крови при воспроизведении синдрома гипервязкости и после его коррекции изучаемыми препаратами, определяли следующие гемореологические параметры: вязкость крови при различных скоростях сдвига, агрегацию эритроцитов и их деформируемость и содержание фибриногена, с которым большинство авторов связы-

вают увеличение агрегации эритроцитов [Левтов В.А., 1982; Галенок В.А.; Meiselman H.J., 1999].

Синдром гипервязкости крови при экспериментальном сахарном диабете вызывали стрептозотоцином («Serva», Германия) в дозе 40 мг/кг вводимым внутривенно [Баранов В.Г., 1983]. В опыт брали животных, у которых развивалась стойкая гипергликемия (не менее 17 ммоль/л). Уровень глюкозы определяли в периферической крови крыс методом визуального экспресс-анализа с помощью набора тест-полосок «Глюкохром Д» (Берингер Мангейм ГмбХ, Германия). В качестве препарата сравнения использовали пентоксифиллин [Ambigus et al., 1990; Krishca M. et al., 1998] и гликлазид.

В первой серии эксперимента исследуемые вещества, растворенные в физиологическом растворе, вводили крысам внутрижелудочно, однократно за час до исследования в дозе 50 мг/кг. Во второй серии эксперимента опыты были выполнены на интактных крысах и животных со стрептозотоциновым диабетом при семидневном введении им исследуемых веществ. Забой животных проводили согласно требованиям, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1989). Забор крови производили из брюшного отдела аорты крыс, находящихся под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг) [Галенок В.А. и др., 1987].

Измерение вязкости крови проводили на капиллярном гемовискозиметре ВК-4 и реологическом анализаторе крови АКР-2 (Россия) при семи скоростях сдвига, моделирующих различную интенсивность кровотока в сосудах [Добровольский Н.А., 1996]. Величина кислотного гемолиза эритроцитов определялась по методу Терскова И.А. и Гительсона И.И. в модификации Воробьева А.И. (1967). Для оценки изменения деформируемости эритроцитов применяли метод О.М. Моисеева (1990). Исследования проводили на отмытых красных клетках крови. Два равных объема которых инкубировали (10 мин, 37 °С): один – с 2 % раствором глутарового альдегида для получения

100 % жестких эритроцитов [Reinhard W., 1987], другой – с физиологическим раствором.

Статистическая обработка результатов проводилась в электронной таблице Excel 5.0 с использованием t-критерия Стьюдента и парного критерия Т. Вилкоксона [Венчиков А. И., 1974] при помощи пакета статистических программ программного обеспечения Microsoft Excel 97.

### **11.1. Влияние диабенола и препарата сравнения пентоксифиллина при однократном введении на реологические свойства крови крыс с синдромом гипервязкости**

При исследовании образцов крови, взятых у животных со стойкой гипергликемией (не менее 17 мМ) наблюдалось повышение вязкости крови при различных скоростях сдвига, увеличение агрегации и снижение деформируемости эритроцитов, а также сдвиг показателей свертывания крови в сторону гиперкоагуляции. Изменение отмеченных параметров реологических свойств крови приводят к формированию синдрома повышенной вязкости у больных сахарным диабетом [Галенок В.А., 1987; Ена Я.М., 1991].

Нарушения вязкостных характеристик крови больных животных представлены в таблице 11.1.

Выраженное повышение показателя вязкости крови отмечалось при низких скоростях сдвига, что свидетельствовало об активации процессов агрегатообразования в веноулярных отделах микроциркуляторного русла. В то время как повышение данного реологического параметра при максимальной скорости сдвига характеризовало прежде всего выраженные нарушения структуры и функции эритроцитарных мембран. Изучаемые вещества снижали вязкость крови больных крыс. Наиболее выраженное влияние оказывали исследуемые соединения при низкосдвиговых скоростях. Так, при скорости  $10 \text{ с}^{-1}$  и  $20 \text{ с}^{-1}$

диабенол снижал вязкость на 22,4 % и 19,8 %, а пентоксифиллин на 18,4 % и 16,3 % соответственно. При увеличении скоростей сдвига корригирующее воздействие исследуемых веществ на данный реологический показатель сохранялось, что свидетельствует об их способности оказывать влияние на агрегационный и деформационный компонент показателя.

Таблица 11.1

**Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг) и пентоксифиллина (в дозе 50 мг/кг) (при внутрижелудочном введении) на вязкость крови крыс при стрептозотоциновом сахарном диабете при различных скоростях сдвига ( $M \pm m$ )**

Исследуемые группы	Скорость сдвига, с <sup>-1</sup>						
	10	20	40	60	80	100	200
Интактные животные	5,9±0,2	5,4±0,1	5,0±0,1	4,9±0,1	4,8±0,1	4,7±0,1	4,5±0,1
Диабет	9,8±0,3 <sup>+</sup>	8,6±0,2 <sup>+</sup>	7,6±0,3 <sup>+</sup>	7,3±0,3 <sup>+</sup>	7,2±0,3 <sup>+</sup>	6,9±0,3 <sup>+</sup>	6,6±0,3 <sup>+</sup>
Диабет + диабенол	7,6±0,3*	6,9±0,3*	6,2±0,3*	6,0±0,2*	5,9±0,2*	5,8±0,2*	5,5±0,2*
Диабет + пентоксифиллин	8,0±0,3*	7,2±0,3*	6,5±0,3*	6,2±0,2*	6,1±0,2*	5,9±0,2*	5,6±0,2*

\*Данные достоверны по отношению к контролю 2 ( $P < 0,05$ ); <sup>+</sup> данные достоверны по отношению к контролю 1 ( $P < 0,05$ ).

Результаты исследования эритроцитарного звена гемореологического профиля представлены в таблице 11.2. В образцах крови животных, с экспериментальным диабетом увеличилась их жесткость (на 36,2 %). Изучаемые вещества при пероральном введении больным крысам улучшали эритроцит-зависимые реологические показатели крови. Оба вещества незначительно улучшали деформируемость эритроцитов при стрептозотоциновом диабете крыс.

Таким образом, в условиях выраженных гемореологических расстройств при сахарном диабете, диабенол оказывал нормализующее действие за счет улучшения пластических свойств мембраны эритро-



цитов, что проявлялось в увеличении деформируемости эритроцитов и снижении высокосдвиговых значений вязкости крови.

Таблица 11.2

**Влияние диабенола (в дозе 50 мг/кг) и пентоксифиллина (в дозе 50 мг/кг) при внутрижелудочном введении на деформируемость эритроцитов крыс при стрептозотоциновом диабете ( $M \pm m$ )**

Вещества	Деформируемость эритроцитов, у.е.
Интakтные животные (контроль 1)	0,44 $\pm$ 0,002
Диабет (контроль 2)	0,69 $\pm$ 0,003 <sup>+</sup>
Диабет + диабенол	0,62 $\pm$ 0,005*
Диабет + пентоксифиллин	0,66 $\pm$ 0,007*

\*Данные достоверны по отношению к контролю 2 ( $p < 0,05$ ); <sup>+</sup> данные достоверны по отношению к контролю (1) ( $p < 0,05$ ).

**11.2. Влияние диабенола и препарата сравнения гликлазида при семидневном внутрижелудочном введении на реологические свойства крови крыс с синдромом гипервязкости**

Исследование вязкости крови на седьмые сутки эксперимента показало, что изучаемое соединение и препарат сравнения достоверно снижали вязкость крови при всех скоростях сдвига (таблица 11.3, 11.4). Так, например, вязкость крови под действием гликлазида при скорости сдвига  $200 \text{ с}^{-1}$  была равна 3,6 сП, а при скорости сдвига  $20 \text{ с}^{-1}$  - 4,9 сП, что относительно контрольных показателей составило 8,4 % и 16,8 % соответственно. Величина вязкости крови при приеме животными диабенола колебалась от 3,5 до 4,4 сП, что превышало активность гликлазида по этому параметру на 2,3 % и 10,1 % соответственно.

**Влияние соединений диабенола и препарата сравнения гликлазида (при семидневном внутрижелудочном введении в дозе 50 мг/кг) на вязкость крови (сП) крыс со стрептозотоциновым диабетом при различных скоростях сдвига, (M±m)**

Вещества	Вязкость крови при различных скоростях сдвига, с.			ИАЭ
	200 с <sup>-1</sup>	100 с <sup>-1</sup>	20 с <sup>-1</sup>	
Контроль	3,93 ± 0,09	4,03 ± 0,09	5,95 ± 0,04	1,51
Диабенол	3,52 ± 0,05*	3,6 ± 0,06*	4,45 ± 0,10*	1,26
Гликлазид	3,7 ± 0,06 *	3,77 ± 0,06	4,95 ± 0,10* *	1,33

\*Данные достоверны (p < 0,05) по отношению к контролю; \* к гликлазиду.

**Влияние диабенола и препарата сравнения гликлазида (при семидневном внутрижелудочном введении в дозе 50 мг/кг) на вязкость крови крыс со стрептозотоциновым диабетом при различных скоростях сдвига (Δ% по отношению к контролю) (M± m)**

Вещества	Вязкость крови при различных скоростях сдвига		
	200 с <sup>-1</sup>	100 с <sup>-1</sup>	20 с <sup>-1</sup>
Диабенол	-10,38 ± 1,84*	-10,74 ± 1,56*	-25,21 ± 1,78*
Гликлазид	-8,47 ± 2,07*	-8,88 ± 1,89*	-23,53 ± 1,98*

\*Данные достоверны по отношению к контролю (p < 0,05).

Данные о влиянии исследуемых соединений на кислотный гемолиз эритроцитов при семидневном введении представлены в таблице 11.5. Препараты диабенол и гликлазид проявили однонаправленное действие на ингибирование кислотного гемолиза эритроцитов. При рассмотрении результатов экспериментов можно заключить, что изучаемые препараты при их семидневном введении улучшают реологические показатели кро-

ви у животных со стрептозотоциновым диабетом. При оценке влияния исследуемых препаратов на вязкость крови при различных скоростях сдвига следует отметить, что у крыс со стрептозотоциновым диабетом выявлено статистически достоверное снижение этой реологической величины при различных скоростях сдвига. Диабенол обладал наибольшей активностью в условиях экспериментальной патологии.

Таблица 11.5

**Влияние диабенола и препарата сравнения гликлазида  
(при семидневном внутрижелудочном введении в дозе 50 мг/кг)  
на кислотный гемолиз эритроцитов крови крыс  
со стрептозотоциновым диабетом ( $M \pm m$ ).**

Вещества	Время наибольшей скорости кислотного гемолиза эритроцитов, $\Delta\%$ по отношению к контролю
Диабенол	$+32,00 \pm 2,11^*$
Гликлазид	$+31,79 \pm 3,42^*$

\*Данные достоверны по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ); \* данные достоверны по отношению к гликлазиду ( $p < 0,05$ ).

**11.3. Действие диабенола на реологические свойства  
и гемостаз крови доноров и больных  
сахарным диабетом (опыты *in vitro*)**

Исследуемое соединение проявило активность в отношении улучшения гемобиологических свойств крови в опытах на интактных и больных стрептозотоциновым диабетом животных, поэтому представилось интересным выяснить, как изменяются реологические и коагуляционные показатели крови здоровых и больных сахарным диабетом людей. Тем более что в ряде работ имеются данные о положительном влиянии известных гипогликемических препаратов, таких, как гликлазид и орамид, на микроциркуляцию: они уменьшают

адгезивно-агрегационные свойства тромбоцитов и эритроцитов, повышают фибринолитическую активность, снижают свертываемость крови [Казей Н.С., 1992; Мельниченко Г.А., 1994; Кахновский И.М., 1993; Briers J., 1995; Древаль А. А., 1998].

Исследовалось воздействие данного соединения и гипогликемических препаратов на гемореологические свойства крови больных сахарным диабетом. Исследования проводились на крови больных инсулиннезависимым сахарным диабетом средней тяжести без сопутствующих заболеваний сердечно-сосудистой системы, ожирения и хронических заболеваний легких, так как указанные патологические состояния сопровождаются выраженными нарушениями реологических свойств крови и кислородо-транспортной функции.

Больные находились в терапевтическом отделении Волгоградской линейной клинической больницы водников. Диагноз сахарного диабета подтвержден клиническими и лабораторными методами исследования. В опыт отбирались образцы крови тех больных сахарным диабетом, состояние которых сопровождалось развитием «синдрома повышенной вязкости крови» с выраженными реологическими нарушениями.

Кровь забирали из кубитальной вены, стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия. Исследуемые вещества растворялись в физиологическом растворе в концентрациях  $1 \times 10^{-4}$  и  $1 \times 10^{-5}$  М. Исследование вязкости крови проводились на капиллярном гемовискозиметре ВК-4 и анализаторе крови реологическом АКР-2. Величина гематокрита определялась по унифицированному методу, описанному Меньшиковым В. В. (1987) с помощью микроцентрифуги МГЦ-8. Достоверных различий при определении гематокрита крови доноров и больных сахарным диабетом обнаружено не было, его величина колебалась в пределах 42-46%. Гемолиз эритроцитов, изучались на двухканальном лазерном анализаторе агрегации (модель 220 LA) научно-производственной фирмы «Биола». Коагулологические параметры исследуемой крови изучались методом тромбоэластографии [Hartert,

1962, 1973; Балуда В.П., 1980] с помощью 4-канального тромбоэластографа-гемокоагулографа ГКГМ-4-02 (Россия). Подробное описание метода рассматривалось выше.

Статистическая обработка результатов проводилась в электронной таблице Excel 5.0 с использованием t-критерия Стьюдента и парного критерия Т. Вилкоксона [Венчиков А. И., 1974] при помощи пакета статистических программ программного обеспечения Microsoft Excel 97.

#### **11.4. Влияние диабенола и препарата сравнения гликлазида на реологические свойства и гемостаз крови больных сахарным диабетом**

В ряде литературных работ имеются данные о специфической активности пероральных гипогликемических препаратов (в частности, гликлазида, орамида) на реологические свойства крови, приводится сравнительная оценка их влияния на параметры микроциркуляции при сахарном диабете [Галенок В.А., 1989; Кахновский Г.В., 1993; Мельниченко Г.А., 1994; Казей И.С., 1992; Briers J., 1989; Древаль А.А., 1998]. В связи с этим в следующей серии экспериментов представилось интересным выяснить, как влияют новые производные бензимидазола, обладающие гипогликемическими свойствами, и известные сахароснижающие препараты гликлазид, орамид, глидифен на реологические показатели крови больных сахарным диабетом в опытах *in vitro*.

Влияние исследуемых соединений на реологические показатели крови больных сахарным диабетом изучались на крови больных сахарным диабетом 2 типа средней и тяжелой степени тяжести, у которых наблюдались нарушения всех звеньев гемостаза – сосудистого, тромбоцитарного, угнетение фибринолитической активности крови. Исходные показатели вязкости крови, агрегации эритроцитов и тромбоцитов, времени наибольшей скорости кислотного гемолиза у боль-

ных сахарным диабетом статистически достоверно превышали реологические показатели донорской крови на 17,7 %, 20,5 %, 51,3 % и 16,1 % соответственно.

Результаты действия исследуемых соединений и препаратов на гемореологические показатели крови больных сахарным диабетом представлены в таблице 11.6. Измерение вязкости крови с помощью капиллярного вискозиметра ВК-4 показало уменьшение вязкости крови при введении всех изучаемых веществ. Выраженный эффект наблюдался у диабенола и гликлазида. Данные вещества в концентрации  $10^{-4}$ М достоверно уменьшали вязкость крови на 20,1 %, 16,4 % соответственно. Снижение вязкости этими препаратами в концентрации  $10^{-5}$ М было недостоверным и составило 14,0 %, 15,3 % соответственно.

Таблица 11.6

**Влияние диабенола и препарата сравнения гликлазида (50 мг/кг) на вязкость, агрегацию и кислотный гемолиз эритроцитов крови больных сахарным диабетом (опыты *in vitro*) ( $M \pm m$ )**

Вещества	Концентрация, М	Вязкость, у.е.	Влияние наибольшей скорости кислотного гемолиза, $\Delta$ % по отношению к контролю
Контроль		5,4753 $\pm$ 0,33	0
Диабенол	1 $10^{-4}$	4,3 7 $\pm$ 0,2*	+37,2 $\pm$ 9,97*
	1 $10^{-5}$	4,7 $\pm$ 0,04	+22,27 $\pm$ 10,68
Гликлазид	1 $10^{-4}$	4,57 $\pm$ 0,15*	+32,06 $\pm$ 9,23*
	1 $10^{-5}$	4,6 3 $\pm$ 0,03	+27,01 $\pm$ 10,03

\*Данные достоверны по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ).

Данные о влиянии изучаемых веществ на вязкость крови при различных скоростях сдвига представлены в таблицах 11.7. и 11.8. Уменьшение вязкости крови при скоростях сдвига от  $20 \text{ с}^{-1}$  до  $200 \text{ с}^{-1}$  колебалось у диабенола и гликлазида от 22–26 % до 24–29 %

в концентрации  $10^{-4}$ М ( $p<0,05$ ) и от 17–20 % до 18–21 % в концентрации  $10^{-5}$ М( $p<0,05$ ).

Таблица 11.7

**Влияние диабенола и препарата сравнения гликлазида в концентрациях  $1\times 10^{-4}$ М и  $1\times 10^{-5}$  М на вязкость крови больных сахарным диабетом при различных скоростях сдвига, сП, ( $M\pm m$ ), (опыты *in vitro*)**

Вещества	Концентрация, М	Вязкость крови при различных скоростях сдвига		
		200 с <sup>-1</sup>	100 с <sup>-1</sup>	20 с <sup>-1</sup>
Контроль		6,15±0,2	6,32± 0,24	8,07±0,56
Диабенол	$1\times 10^{-4}$	4,64±0,29*	4,72±0,29*	6,12±0,40*
	$1\times 10^{-5}$	5,05±0,28*	5,15±0,28*	6,77±0,28
Гликлазид	$1\times 10^{-4}$	4,60±0,32*	4,70±0,32*	6,22±0,40*
	$1\times 10^{-5}$	5,55±0,33*	5,07±0,31*	6,60±0,33
	$1\times 10^{-5}$	5,25±0,38	5,30±0,34*	6,95±0,49

\*Данные достоверны по отношению к контролю ( $p<0,05$ ).

Таблица 11.8

**Влияние диабенола и препарата сравнения гликлазида на вязкость крови больных сахарным диабетом при различных скоростях сдвига ( $\Delta\%$  по отношению к контролю), ( $M\pm m$ ), (опыты *in vitro*)**

Вещества	Концентрация, М	Вязкость крови при различных скоростях сдвига		
		200 с <sup>-1</sup>	100 с <sup>-1</sup>	20 с <sup>-1</sup>
Диабенол	$1\times 10^{-4}$	-24,79± 4,75*	-25,29± 4,62*	-24,14± 4,96*
	$1\times 10^{-5}$	-18,69±5,14*	-19,76± 5,25*	-17,02± 4,07
Гликлазид	$1\times 10^{-4}$	-25,20± 5,26*	-25,69± 5,12*	-22,91± 4,96*
	$1\times 10^{-5}$	-18,69± 5,43*	-19,76 4,97*	-18,26± 4,13

\*Данные достоверны по отношению к контролю ( $p<0,05$ ).

Влияние изучаемых препаратов на эритроцитсвязанные реологические параметры крови больных сахарным диабетом представлены в таблице 11.6. Действие на кислотную резистентность эритроцитов при введении диабенола в концентрациях  $10^{-4}$ М и  $10^{-5}$ М превосходило эффект гликлазида всего на 4,5% и на 4,0% соответственно. Повышение кислотной устойчивости эритроцитов носило статистически достоверный характер под действием препаратов диабенола и гликлазида в концентрациях  $10^{-4}$ М.

Таким образом, результаты исследования показали большей частью статистически достоверное воздействие соединения и препарата сравнения на гемореологический профиль крови больных сахарным диабетом. Сходные результаты влияния гликлазида на гемобиологические свойства крови при сахарном диабете получены ранее другими исследователями [Strojek K., 1993; Мельниченко Г.А., 1994; Недосугова Л. В., 1998; Galeone F. et al., 1998].

### **11.5. Влияние диабенола на мембраны эритроцитов**

Исследования структурно-функциональных свойств мембраны эритроцитов представляют значительный интерес для объяснения механизмов её физиологической авторегуляции и фармакологического пути коррекции возникающих нарушений. Наиболее важными свойствами мембраны, определяющими реологические свойства эритроцитов, а значит и реологические свойства крови, являются заряд мембраны эритроцитов и ее вязко-эластические свойства [Л.Н. Катюхин, 1995]. Величина заряда мембраны определяет дзета-потенциал эритроцитов, интенсивность процесса агрегации эритроцитов и, таким образом, суспензионную стабильность крови [В.Н. Захарченко, 1998]. Вязкость и эластичность мембраны эритроцитов являются главными лимитирующими факторами их деформируемости [В.Л. Сигал, 1993; Ф.И. Атауллаханов, 1994]. В связи с этим является актуальным изучение механизмов действия соединения диабенол и пентоксифиллина



на реологические свойства крови, а именно – их влияния на заряд мембраны эритроцитов и ее вязко-эластические свойства.

Вязкость мембран эритроцитов имеет важное значение для способности эритроцитов эффективно изменять свою форму под влиянием внешних воздействий в процессе циркуляции, обеспечивая, таким образом, эффективную реализацию эритроцитами своих функций. Для исследования показателя микровязкости мембран на сегодняшний день наиболее часто применяют флуоресцентные зонды [Г.Е. Добрецов, 1989]. Для изучения механизма гемореологической активности, в частности явления улучшения деформируемости эритроцитов диабенолом и пентоксифиллином представилось интересным оценить их влияние на величину вязкости мембраны эритроцитов.

Исследования были выполнены на 10 кроликах (самцы) породы «Шиншилла», весом 4-4,5 кг и 100 половозрелых нелинейных белых крысах обоего пола, массой 270-320 г. диабенол и препарат сравнения пентоксифиллин были изучены в концентрациях  $1 \times 10^{-4}$  М,  $1 \times 10^{-6}$  М и  $1 \times 10^{-8}$  М.

**Изучение микровязкости эритроцитарных мембран.** Определение проводили на спектрофлуориметре Hitachi MPF-400 (Япония) с использованием зонда *n*-толуолсульфонат-4-(*n*-диметиламино стирил)-1-гексилпиридиния (ДСП-6). На основании расчета анизотропии флуоресценции зонда ДСП-6 в суспензии эритроцитов можно судить о вязкости их мембраны [Г.Е. Добрецов, 1989]. Показатель анизотропии зонда определяется степенью его поляризации. Исследования проводились с использованием поляризаторов излучения, имеющих два угла поляризации:  $0^{\circ}$  и  $90^{\circ}$ . Интенсивность флуоресценции (I<sub>ф</sub>) оценивали по величине свечения исследуемого образца.

Расчет анизотропии зонда проводился по формуле с расчетом промежуточного G-фактора [Г.Е. Добрецов, 1989]:

$$G = I_{\phi}(90^{\circ}/0^{\circ}) / I_{\phi}(90^{\circ}/90^{\circ}),$$

$$A = (I_{\phi}(0^{\circ}/0^{\circ}) - G \times I_{\phi}(0^{\circ}/90^{\circ})) / (I_{\phi}(0^{\circ}/0^{\circ}) + 2 \times G \times I_{\phi}(0^{\circ}/90^{\circ})),$$

где:  $I_f$  ( $0^0/0^0$ ;  $0^0/90^0$ ;  $90^0/90^0$ ;  $90^0/0^0$ ) – интенсивность флуоресценции образца при различных положениях поляризаторов.

Чем больше показатель анизотропии, тем больше молекула зонда находится в мембране в состоянии покоя; анизотропия флуоресценции, стремящаяся к 0,4, свидетельствует об увеличении жесткости мембраны. Чем меньше показатель анизотропии, тем меньше молекула зонда находится в мембране в состоянии покоя, что говорит о снижении микровязкости мембраны [Добрецов Г.Е., 1989].

**Определение заряда мембраны эритроцитов.** Реализовали на спектрофлуориметре Hitachi MPF – 400 (Япония) с использованием положительно заряженного зонда *n*-толуолсульфонат-4-(*n*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния ( $DCM^+$ ). На основании интенсивности флуоресценции зонда  $DCM^+$  в суспензии эритроцитов можно судить о величине заряда мембраны [Добрецов В.Г., 1989]. При добавлении  $DCM^+$  в суспензию эритроцитов интенсивность его флуоресценции резко возрастает, причем этот рост пропорционален заряду поверхности мембраны [Блума Р.К. и др., 1990]. Интенсивность флуоресценции ( $I_f$ ) оценивали по величине свечения исследуемого образца. За эквивалент заряда мембраны принимали величину  $Q$ , которая рассчитывалась по формуле:

$$Q = I_f(z) - I_0(o),$$

где  $I_f(z)$  – интенсивность флуоресценции образца суспензии эритроцитов после инкубации с зондом  $DCM$ ,  $I_0(o)$  – интенсивность эмиссии образца суспензии эритроцитов без зонда.

Расчет изменения заряда мембраны эритроцитов под влиянием изучаемых соединений проводили по формуле:

$$\Delta (\%) = (Q_B / Q_K) \times 100\% - 100,$$

где  $Q_B$  – эквивалент заряда контрольного образца суспензии эритроцитов;  $Q_K$  – эквивалент заряда образца после добавления изучаемых веществ.

**Изучение деформируемости эритроцитов.** Исследование деформируемости эритроцитов проводилось на эктацитометрической

установке, собранной в Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (Санкт-Петербург) в широком диапазоне осмоляльности суспензионной среды при фиксированном напряжении сдвига методом осмотической градиентной эктацитометрии.

В основе метода лежит явление дифракции световых лучей при прохождении света через тонкий слой суспензии эритроцитов, взвешенных в вязкой жидкости. За эктацитометрический индекс деформируемости принимается отношение большой и малой полуосей дифракционных эллипсов.

Объектом исследования являлась кровь человека. Эктацитометрический индекс деформабельности эритроцитов изучен у шести больных цереброваскулярной болезнью, имеющих в анамнезе острое нарушение мозгового кровообращения и шести здоровых доноров. Диагноз был подтвержден клиническими, инструментальными и лабораторными методами исследования. Выбор больных с этой нозологической формой обусловлен тем, что при указанном патологическом состоянии наблюдаются выраженные нарушения реологических свойств крови [А.М. Асланов, 1989; Szobor A, 1992; Walzl M, 1993; В.Б. Гринштейн, 1999].

Кровь забирали из кубитальной вены, стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия (1:9). Стабилизированную кровь разводили фосфатным 3,1 % поливинилпирролидоновым буфером (Поливинилпирролидон - М.в. 360 000, Sigma, США) с осмоляльностью 290 мосмоль/кг, рН = 7,35. Вязкость суспензионной среды, измеренная на ротационном вискозиметре АКР-2 (Россия), составляла 10 сПз. Измерения проводились при постоянной скорости вращения цилиндра ячейки Куэтта в 100 об/мин. При этом условии в зазоре ячейки с суспензионной средой вязкостью 10 сПз развивалась скорость сдвига  $52,3 \text{ с}^{-1}$  и напряжение сдвига  $523 \text{ н/м}^2$ . Использование в методе постоянного сдвигового усилия исключало возможность изменения деформационных свойств эритроцитов в процессе эксперимента. Внутренний ста-

кан ячейки термостабилизирован ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Ширина щели ячейки составляет 0,5 мм.

Перед началом эксперимента производился подсчет эритроцитов в камере Горяева и готовилось 2 мл крови разведенной в изотоничном поливинилпирролидоновом буфере с концентрацией эритроцитов  $5 \times 10^5$  в 1 мкл крови. Далее, в отдельном бюксе готовился буферный раствор с осмоляльностью 890 мОсм. Исследование эктацитометрического индекса деформабельности проводилось при трех значениях осмоляльности суспензионной среды ячейки (273 мОсм/л, 319 мОсм/л, 449 мОсм/л). Осмоляльность стартовой суспензии эритроцитов, при которой снимался первый показатель эктацитометрического индекса деформируемости, составляла 273 мОсм. После этого к исследуемой пробе добавлялась аликвота 26 мкл буфера 890 мОсм, чем достигалась осмоляльность среды 319 мОсм. После четвертого добавления аликвоты осмоляльность равнялась 476 мОсм.

График зависимости эктацитометрического индекса деформируемости (ЭИД) от осмоляльности суспензионной среды называют профилем осмотической деформируемости эритроцитов, или осмосканом. Полученные цифровые данные всех отсчетов позволяют при построении графика осмоскана определить положение характеристических точек на оси осмоляльности и абсолютные значения индексов деформируемости исследуемых эритроцитов для последующего анализа.

На графике выделяют характеристическую точку осмоляльности суспензионной среды, при которой наблюдается наивысший ЭИД. Точка соответствует деформабельности эритроцитов в изотоничных условиях в крови. Линейное смещение точки наибольшей деформируемости в гипер- или гипотоничекую область осмоскана является индикатором изменений площади удельной поверхности и величины модуля жесткости мембраны исследуемых эритроцитов [R.M.Johnson, 1996].

Индекс деформируемости эритроцитов, измеренный при гипертонической (449 мОсм/л) осмоляльности суспензионной среды

(ЭИД<sub>449</sub>) может свидетельствовать о вязкости внутренней среды эритроцита. ЭИД<sub>449</sub> меняется со степенью внутренней вязкости эритроцита и может снижаться при дегидратации гемоглобина и увеличиваться – при увеличении его гидратированности [R.M. Johnson, 1996].

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакета статистических программ программного обеспечения Microsoft Excell 97.

Влияние диабенола и пентоксифиллина на вязкость мембраны эритроцитов. Полученные результаты представлены в таблице 11.9. Исследуемые вещества в концентрации  $1 \times 10^{-4}$  М достоверно уменьшали показатель анизотропии флуоресценции зонда ДСП-6 в суспензии эритроцитов. Диабенол снижал показатель анизотропии на 21,5 %, а пентоксифиллин – на 22,0 %. Таким образом, изучаемые вещества в равной степени понижали уровень вязкости мембранных липидов (табл. 11.9).

*Таблица 11.9*

**Влияние диабенола и пентоксифиллина  
на микровязкость мембран эритроцитов кролика  
(по показателю анизотропии,  $M \pm m$ )**

Вещества	Концентрация, М/л	Анизотропия, у.е.
Контроль	-	0,35±0,005
Диабенол	$1 \times 10^{-4}$	0,27±0,016*
	$1 \times 10^{-6}$	0,29±0,010*
	$1 \times 10^{-8}$	0,32±0,007
Пентоксифиллин	$1 \times 10^{-4}$	0,27±0,007*
	$1 \times 10^{-6}$	0,27±0,012*
	$1 \times 10^{-8}$	0,32±0,005

\*Данные достоверны по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ).

При уменьшении действующих концентраций исследуемых веществ до  $1 \times 10^{-6}$  М анизотропия флуоресценции ДСП-6 свидетельст-

вовала о достоверном изменении мембранной микровязкости. Увеличение подвижности зонда в липидном бислое происходило более активно после инкубации эритроцитов с пентоксифиллином (на 23,4 %).

Диабенол повышал оптическую активность зонда на 17,6 %. По влиянию на вязкость мембраны эритроцитов в микромолярной концентрации диабенол уступал по активности пентоксифиллину в 1,32 раза. Изменение анизотропии флуоресценции под воздействием микромолярных концентраций изучаемых веществ было статистически достоверным. Измерение эквивалента микровязкости мембраны под воздействием изучаемых веществ в концентрации  $1 \times 10^{-8}$  М показало незначительное увеличение пластичности мембраны эритроцита. Подвижность зонда в липидах мембраны несколько увеличивалась по сравнению с контрольными образцами. Диабенол и пентоксифиллин увеличивали оптическую активность ДСП-6 на 6,6 % и 5,5% соответственно. Однако отличие показателя анизотропии контрольных суспензий эритроцитов и образцов, инкубированных с изучаемыми веществами было статистически недостоверным.

Таким образом, при изучении влияния диабенола и пентоксифиллина на показатель анизотропии флуоресценции – оптический эквивалент вязкости мембраны была установлена активность веществ в широком диапазоне концентраций. Следует отметить достоверную эффективность воздействия изучаемых веществ в интервале концентраций от  $1 \times 10^{-4}$  М до  $1 \times 10^{-6}$  М. Проведенные исследования показали, что применение диабенола снижает микровязкость мембран эритроцитов и по эффективности оно практически не уступает препарату сравнения пентоксифиллину.

Действие диабенола и пентоксифиллина на заряд мембраны эритроцитов. Заряд поверхности мембран эритроцитов имеет важное значение для ионной проницаемости, межклеточных взаимодействий, таких как агрегация клеток, связывания лекарств и т. д. Для исследования заряда мембран наиболее часто применяют флуоресцентные зонды [Г.Е. Добрецов, 1989]. Для изучения механизма гемореологи-

ческой активности, в частности явления снижения агрегации эритроцитов диабенолом и пентоксифиллином представилось интересным изучить их влияние на заряд мембраны эритроцитов.

Полученные результаты представлены в таблице 11.10. Исследуемые вещества в концентрации  $1 \times 10^{-4}$  М значительно повышали интенсивность флуоресценции зонда ДСМ из суспензии эритроцитов в буферных растворах как с высокой, так и низкой ионной силах. В обоих случаях диабенол превосходил по активности пентоксифиллин в 1,4–1,5 раза. Заряд мембраны эритроцитов увеличивался в растворе с высокой ионной силой под воздействием диабенола и пентоксифиллина на 95,5 % и 62,1 % соответственно, в растворе с низкой ионной силой на 33,9 % и 24,9 % соответственно ( $p < 0,05$ ).

*Таблица 11.10*

**Влияние диабенола и пентоксифиллина на эквивалент заряда мембраны эритроцита (Q, у.е.) в осмолярных растворах с высокой и низкой ионными силами (M±m)**

Вещества	Концентрация, М/л	Буфер с высокой ионной силой, Q <sub>1</sub>	Буфер с низкой ионной силой, Q <sub>2</sub>
Контроль	-	29,0±1,3	51,0±0,5
Диабенол	$1 \times 10^{-4}$	56,7±7,7*	68,3±2,2*
	$1 \times 10^{-6}$	41,7±4,5*	65,0±5,3*
	$1 \times 10^{-8}$	31,2±2,9	53,2±2,5
Пентоксифиллин	$1 \times 10^{-4}$	47,0±1,6*	63,7±2,3*
	$1 \times 10^{-6}$	38,2±1,9*	59,0±2,8*
	$1 \times 10^{-8}$	30,6±1,4	52,8±3,1

\*Данные достоверны по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ).

При снижении концентрации исследуемых веществ до  $1 \times 10^{-6}$  М флуоресценция ДСМ показывала также достоверное изменение электроотрицательности мембраны. В буфере с высокой ионной силой под воздействием диабенола и пентоксифиллина происходило изме-

нение заряда эритроцитов, соответствующее росту их дзета-потенциала в крови на 43,8 % и 31,7 % соответственно.

Измерение эквивалента заряда мембраны под воздействием изучаемых веществ при низкой ионной силе раствора показало также достоверный рост показателя, характеризующего непосредственное увеличение электроотрицательности мембраны в отсутствии экранировки заряда ионами электролитов. Диабенол и пентоксифиллин увеличивали интенсивность флуоресценции образцов на 27,5 % и 15,7 % соответственно. По влиянию на заряд мембраны эритроцитов в микромолярной концентрации диабенол превосходил пентоксифиллин в 1,4 и 1,8 раза в растворах с высокой и низкой ионных силах соответственно.

Таким образом, изучение диабенола и пентоксифиллина в концентрациях от  $1 \times 10^{-4}$  до  $1 \times 10^{-8}$  М показало выраженную активность их влияния на заряд мембраны. Изменение изучаемыми веществами как неэкранированного заряда в буфере с низкой ионной силой, так и эквивалента дзета-потенциала эритроцитов в буфере с высокой ионной силой. По эффективности изменения электроотрицательности мембран эритроцитов диабенол превосходил препарат пентоксифиллин.

Влияние диабенола и препарата сравнения пентоксифиллина на деформируемость эритроцитов. Проявлением вязкоэластических свойств мембраны эритроцитов на клеточном уровне является величина их деформируемости. Для ее оценки применяются различные методы. Относительно часто используется фильтрационный метод, основанный на фильтрации эритроцитов через фильтры с различным диаметром пор. Главным недостатком метода является отсутствие стандартной общепринятой методики и единиц оценки деформируемости. Визкозиметрические методики с использованием ротационных вискозиметров позволяют оценить деформируемость по вязкости крови при высоких ( $200 \text{ с}^{-1}$  и более) скоростях сдвига. Но самым точным и общепринятым на сегодняшний день методом с единой систе-



мой оценки полученных результатов является эктацитометрический метод. Эктацитометрия, или лазерный дифрактометрический метод определения деформабельности эритроцитов является наиболее адекватно отвечающим условиям кровотока в сосудистой сети [R.M.Johnson, 1989; Л.Н. Катюхин, 1995]. С помощью метода эктацитометрии определяются параметры не только интегральной деформируемости, но и различных клеточных факторов, участвующих в формировании деформационных свойств эритроцитов: степени торроидальности (отношение площади мембраны к объёму клетки), жесткости мембраны и внутренней вязкости [R.M.Johnson, 1996].

Результаты исследования влияния соединений на эктацитометрический показатель деформируемости эритроцитов здоровых доноров представлены в таблице 11.11. Измерение этого индекса практически показало отсутствие действия препаратов на способность изменять форму у здоровых эритроцитов. При статистической обработке полученных данных все эффекты оказались статистически недостоверными ( $p > 0,05$ ). Однако у исследуемых соединений и препаратов сравнения были обнаружены определенные тенденции их влияния на эктацитометрический индекс деформируемости эритроцитов.

*Таблица 11.11*

**Влияние диабенола и пентоксифиллина на эктацитометрический индекс деформируемости эритроцитов доноров ( $M \pm m$ )**

Вещества	Концентрация, М/л	Осмолярность среды ячейки, мОсм/л		
		273	391	449
Контроль	-	624±29,9	665,2±24,3	320,2±19,3
Диабенол	1X10 <sup>-4</sup>	644,5±49,3	699,0±46,7	387,2±22,4
	1X10 <sup>-6</sup>	646,5±44,1	692,3±47,3	400,0±20,6
	1X10 <sup>-8</sup>	633,5±55,9	676,3±50,1	346,0±22,7
Пентоксифиллин	1X10 <sup>-4</sup>	623,0±49,0	627,0±45,0	428,5±43,5
	1X10 <sup>-6</sup>	627,5±27,0	630,3±27,6	296,3±11,5

Так, в концентрации  $1 \times 10^{-4}$  М диабенол и пентоксифиллин увеличивали индекс в гиперосмолярной области осмоскана при осмолярности среды ячейки 449 мОсм на 20,9 % и 33,7 % соответственно. Увеличение деформируемости при такой осмолярности среды может свидетельствовать о снижении внутренней вязкости эритроцита и увеличении гидратированности гемоглобина. Отмеченный эффект в концентрации  $1 \times 10^{-6}$  М проявляло только соединение диабенол. Оно поднимало правое крыло осмоскана на 24,9 %. Препарат сравнения пентоксифиллин в этой же концентрации не оказывал влияния на деформируемость эритроцитов. При дальнейшем уменьшении концентрации диабенола до  $1 \times 10^{-8}$  М эффект вещества еще более снижался до 8,1 %. Исследовать пентоксифиллин в аналогичной концентрации не представлялось целесообразным.

При осмолярных значениях ячейки, близким к показателю крови, изученные вещества проявляли очень низкую активность. На деформируемость эритроцитов здоровых доноров при осмолярности 273 мОсм и 319 мОсм соединение диабенол наибольший эффект оказывало в концентрации  $1 \times 10^{-4}$  М. Производное бензимидазола увеличивало эктацитометрический индекс деформируемости на 3,1 % и 5,1 % соответственно при вышеуказанной осмолярности среды ячейки. В микромолярной концентрации при тех же условиях соединение диабенол улучшало пластичность мембраны на 3,4 % и 4,0 % соответственно. Эффект соединения при концентрации  $1 \times 10^{-8}$  М не превышал двух процентов. Препарат сравнения пентоксифиллин во всем диапазоне изучаемых концентраций не изменял дифракционной картины от образцов эритроцитарных суспензий.

Эктацитометрическая оценка состояния эритроцитов крови больных показала резкое снижение индекса деформируемости клеток ( $p < 0,01$ ). Снижение деформабельности наблюдалось при различных значениях осмолярности среды ячейки. Так, при осмолярности 273 мОсм, 319 мОсм и 449 мОсм уменьшение эктацитометрического индекса эритроцитов составило 31,3%, 40,0% и 36,3% соответствен-

но. Точка осмоляльности суспензионной среды, при которой наблюдается наивысшее значение индекса, соответствующее деформабельности эритроцитов в изотоничных условиях в крови, смещалась в гипотоничекую область осмоскана, что может говорить о структурно-функциональных нарушениях мембраны исследуемых эритроцитов. Снижение индекса деформируемости эритроцитов при гипертонической (449 мОсм/л) осмоляльности суспензионной среды может свидетельствовать о повышении внутренней вязкости эритроцита и снижении гидратированности гемоглобина [R.M.Johnson, 1996].

Результаты исследования влияния соединений на эктацитометрический показатель деформируемости эритроцитов больных представлены в таблице 11.12.

*Таблица 11.12*

**Влияние диабенола и пентоксифиллина  
на эктацитометрический индекс деформируемости больных  
с острым нарушением мозгового кровообращения (M±m)**

Вещества	Концентрация, М/л	Осмолярность среды ячейки, мОсм/л		
		273	391	449
Контроль	-	428,84±23,9	398,8±27,2	320,2±19,3
Диабенол	1X10 <sup>-4</sup>	599,2±19,3	560,2±20,5	387,2±22,4
	1X10 <sup>-6</sup>	602,2±14,1	549,5±19,0	400,0±20,6
	1X10 <sup>-8</sup>	586,5±16,4	546,0±20,6	346,0±22,7
Пентоксифиллин	1X10 <sup>-4</sup>	553,2±23,0	517,5±24,4	428,5±43,5
	1X10 <sup>-6</sup>	561,7±26,3	519,8±23,8	296,3±11,5
	1X10 <sup>-8</sup>	464,7±35,9	441,8±33,1	224,8±25,4

\*Данные достоверны по отношению к контролю (p<0.05).

Действие соединений в концентрации 1×10<sup>-4</sup> М показало статистически достоверное увеличение пластичности клеток. В гиперосмолярной области осмоскана при осмолярности среды ячейки 449 мОсм соединение диабенол и пентоксифиллин увеличивали индекс на 42,3% и 23,4% соответственно. При осмолярности ячейки,

близкой к показателю крови, изученные вещества также проявляли высокую активность. При осмолярности 273 мОсм и 319 мОсм диабенол увеличивал эктацитометрический индекс деформируемости на 39,7 % и 40,5 %. Препарат сравнения пентоксифиллин при вышеуказанной осмолярности среды улучшал пластичность мембраны на 29,0 % и 29,8 % соответственно.

Действие веществ на эритроциты при уменьшении концентрации до микромолярной, показало статистически достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение способности клеток изменять свою форму. В изоосмолярной области диабенол и пентоксифиллин увеличивали эктацитометрический индекс деформируемости на 40,4 % и 31,0 % соответственно при осмолярности 273 мОсм; и на 37,8 % и 30,3 % соответственно при осмолярности среды ячейки 319 мОсм. Наибольший эффект диабенол проявил в гиперосмолярной области, увеличивая деформабельность на 50,1%. Пентоксифиллин уступал ему по активности в 1,7 раза; правое крыло осмоскана препарат сравнения приподнимал на 28,8 %.

Следует отметить эффект изучаемых соединений при наномолярных рабочих концентрациях. Диабенол, по влиянию на эктацитометрический индекс деформируемости, превосходил активность пентоксифиллина. Действие диабенола, в отличие от препарата сравнения в отношении деформируемости эритроцитов, оставалась статистически достоверным. По активности диабенол превосходил пентоксифиллин в 3,4-4,4 раза при различных осмолярностях среды ячейки. Так, при осмолярности 273 мОсм и 319 мОсм диабенол увеличивал пластичность клеток на 36,8% и 36,9% соответственно, а пентоксифиллин на 8,4 % и 10,8 % соответственно. Подъем правого крыла осмоскана, как известно, говорит об увеличении гидратированности гемоглобина. Диабенол снижал внутреннюю вязкость содержимого эритроцита на 45,3 %, а пентоксифиллин – на 10,2 %.

Таким образом, изученные соединения значительно улучшали пластичность эритроцитов. Вещества несколько нормализовали положение на графике осмоскана характеристической точки осмоляль-

ности суспензионной среды наивысшего эктацитометрического индекса деформируемости. Под действием диабенола и пентоксифиллина изменялась кривизна и правого крыла осмоскана – происходил линейный подъем точки наибольшей деформируемости при гипертонической осмолярности среды. Такие изменения осмоскана являются маркером влияния изученных веществ на несколько деформационных характеристик эритроцита [R.M.Johnson, 1996]. По-видимому, соединения изменяют как величину модуля жесткости мембраны (создавая резерв площади поверхности наружного слоя мембраны), так и снижают вязкость внутренней среды эритроцита (за счет увеличения гидратированности гемоглобина).

### **11.6. Влияние соединения диабенола и пентоксифиллина на агрегацию эритроцитов, индуцированную хлоридом лантана**

В 1998 г. появились сообщения о структурных изменениях, происходящих в мембране эритроцитов под воздействием ионов лантана [X.M.Li, 1998; Yi Cheng, 1998]. Методами флуоресценции, электронного парамагнитного резонанса и дифференциальной сканирующей калориметрии было показано ингибирование ионами  $\text{La}^{3+}$  активности мембранных ионных помп:  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  АТФазы и  $\text{Mg}^{2+}$  АТФазы и увеличение вязкости липидов мембраны эритроцитов. Позднее было предложено [Ю.А. Шереметьев, 2000] использовать  $\text{La}^{3+}$  для индукции агрегации эритроцитов с целью изучения мембранных изменений.

Наибольшую степень ингибирования агрегации проявил диабенол. В концентрации  $1 \times 10^{-4}$  М соединение снижало агрегацию на 53,3 %, что превосходило эффект пентоксифиллина в 1,3 раза. При уменьшении концентрации до  $1 \times 10^{-5}$  М различия в эффективности антиагрегантного действия еще больше усиливались: соединение РУ-254 было активнее пентоксифиллина в 5,5 раза. В микромолярной концентрации пентоксифиллин не проявлял активности, а соединение

РУ-254 ингибировало процесс на 18,2 %. Дальнейшее уменьшение концентрации производного бензимидазола в пробе до  $1 \times 10^{-7}$  М приводило к усилению процессов агрегации до исходных величин.

Для диабенола и пентоксифиллина были рассчитаны величины ЭК<sub>20</sub> (La<sup>3+</sup>) (табл. 11.13). Значения концентрации диабенола, ингибирующего процесс агрегации на 20 % ниже величины пентоксифиллина в 10 раз.

Таблица 11.13

**ЭК<sub>20</sub> (La<sup>3+</sup>) влияние диабенола и препарата сравнения пентоксифиллина на индуцированную LaCl<sub>3</sub> агрегацию эритроцитов *in vitro***

Соединение	ЭК <sub>20</sub> (La <sup>3+</sup> ), М/л
Диабенол	$1,5 \times 10^{-6}$
Пентоксифиллин	$1,5 \times 10^{-5}$

## 11.7. Заключение

Обобщая полученные результаты, по-видимому, можно говорить о том, что гемореологическая активность исследуемых веществ опосредована их мембранотропностью. Диабенол и пентоксифиллин проявили выраженную активность в достаточно широком диапазоне концентраций, которая выразилась в значительном изменении мембрано-связанных характеристик эритроцитов. Диабенол и пентоксифиллин оказывают влияние на заряд мембраны эритроцитов, увеличивая его. Усиление электроотрицательности мембраны эритроцитов приводит к увеличению силы так называемого «электростатического распора» между ними и снижению процесса агрегации клеток в процессе гемоциркуляции (В.Л. Сигал, 1988). Увеличение же микровязкости мембраны эритроцитов, соответственно, приводит к такому положительному явлению, как увеличение их деформируемости.

В свою очередь, действие соединений на микровязкость мембраны слабо проявляется на пластичности эритроцитов здоровых доноров, но выражено и достоверно увеличивает способность изменять форму эритроцитов при её нарушении у больных. Изменения вязкости мембраны, формы эритроцита и его заряда во многом зависят от функционирования мембранных ионных насосов. Показанное снижение агрегации эритроцитов, индуцированной ионами  $La^{3+}$  может говорить о нормализующем влиянии изученных веществ на ионный гомеостаз эритроцитов через изменение работы ферментов, контролирующих ионные помпы. На основании результатов проведенных исследований можно говорить о том, что диабенол по эффективности мембранотропной активности не уступает препарату сравнения пентоксифиллину.

## ГЛАВА 12

# ВЛИЯНИЕ ДИАБЕНОЛА НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ КОЖНОГО ЛОСКУТА В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

*П. А. Галенко-Ярошевский, А. В. Тегай*

---

К наиболее частым осложнениям сахарного диабета относят диабетические ангиопатии, сопровождающиеся генерализованным поражением кровеносных сосудов, распространяющимся как на мелкие сосуды (микроангиопатии), так и на сосуды среднего и крупного калибра (макроангиопатии). При этом, изменения в мелких сосудах (капиллярах, артериолах, венулах) носят специфический для сахарного диабета характер, а поражения крупных сосудов расцениваются как проявление раннего и распространенного атеросклероза. Преимущественной локализацией микроангиопатий у больных сахарным диабетом являются нижние конечности, глаза, почки, а макроангиопатий – аорта, коронарные, церебральные и периферические сосуды [А.С. Ефимов, 1989; А.С. Ефимов, 1998; М.И. Балаболкин, 2000; Б.Б. Салтыков, 2002; Н.Д. Тронько, 2002; Н.С.Базоян, 2004; М.И. Балаболкин, 2005; В.М. Бенсман, 2010; И.И. Дедов, 2011; М.Б. Анциферов, 2013; А.В. Зеленская, 2013; K. Sase, T. Michel, 1997; D.M. Nathan, 2009].

В связи с этим, одной из важнейших задач современной фармакологии является создание высокоактивных лекарственных средств, повышающих выживаемость тканей, в том числе и кожи, в условиях редуцированного кровообращения, вызванного диабетическими ангиопатиями [Б.И. Любимов, 1986; Н.Н. Самойлов, 1986; В.М. Шолохов, 1986; К.С. Васьков, 1989; И.И. Дедов, 1998, 2000; А.Л. Костенко,



2000; П.А. Галенко-Ярошевский, 2001; М.Д. Машковский, 2002; А.В. Зеленская, 2013; А.В. Зеленская, 2014].

Исходя из того, что диабенол обладает выраженным гипогликемическим действием, представлялось важным исследовать влияние его на выживаемость кожи в условиях редуцированного кровообращения на фоне нормо- и гипергликемии, индуцированной аллоксановым диабетом.

Исследования проведены согласно Методическим рекомендациям по количественной оценке влияния препаратов на жизнеспособность тканей в условиях редуцированного кровообращения, одобренным Фармакологическим комитетом МЗ СССР 16.05.1986 г., протокол № 9 [Б.И. Любимов, 1986], а также современным требованиям и рекомендациям, методологии и методам, представленным в специальных статьях, руководствах и других материалах [М.Д. Машковский, 1976; К.С. Шадурский, 1977; В.И. Шумаков, 1983; В.М. Шолохов, 1986; К.С. Васьков, 1989; В.И. Горовой, 1991; А.Л. Костенко, 2000; П.А. Галенко-Ярошевский, 2001; А.В. Зеленская, 2013].

Эксперименты выполнены на 309 белых беспородных мышах самцах и 535 крысах самцах (из них белых беспородных – 483, линии Вистар – 52), массой 0,018–0,032 и 0,120–0,215 кг соответственно. Изучение диабенола проводили в широком диапазоне доз в опытах на мышах и крысах [В.М. Шолохов, 1986; К.С. Васьков, 1989; В.И. Горовой, 1991; А.Л. Костенко, 2000].

Оценку результатов экспериментального изучения влияния веществ на выживаемость кожного лоскута проводили через 24 часа после операции, используя следующую градацию: значительно повышает (ЗП; более 50 %), умеренно повышает (УП; от 18 до 50 %), слабо повышает (СП; от 15 до 18 %), не изменяет (НИ;  $\pm 15$  %), слабо снижает (СС; от -15 до -18 %), умеренно снижает (УС; от -18 до -50 %). При этом исследованные соединения использовались в условно-терапевтических дозах (10 % от ЛД<sub>50</sub>).

В случаях исследования диабенола на выживаемость кожного лоскута в широком диапазоне доз, рассчитывались дозы вызывающие дерматопротекторной действие, составляющее 30 (ЕД<sub>30</sub>) и 50 % (ЕД<sub>50</sub>) и выраженное в мг/кг и в мМ/кг [К.С. Васьков, 1989; В.И. Горовой, 1991].

Оценку результатов исследований проводили через 72 часа, используя вышеописанную градацию для мышей. При этом рассчитывалась ЕД<sub>30</sub>, выраженная в мг/кг и мМ/кг.

Изучение влияния диабенола на жизнеспособность (количество) кератиноцитов в кожном лоскуте проводили в опытах на белых крысах-самцах [В.И. Шумаков, 1983; В.М. Шолохов, 1986; В.П. Туманов, 1987; M. Regnier, M. Prunieras, 1974]. Количество живых кератиноцитов у крыс 1-й контрольной группы определяли через 1 час после моделирования кожного лоскута. Животным 2-й контрольной группы трехкратно (в 1-й день – за 15 мин до моделирования КЛ и в последующие 2 дня) вводили внутривентриально по 0,2 мл физиологического раствора. Крысам подопытной группы – по той же схеме внутривентриально в дозе 10 мг/кг инъецировали по 0,2 мл исследуемого соединения. Во 2-й контрольной и подопытной группах количество живых и погибших кератиноцитов определяли через 3 суток после моделирования кожного лоскута.

Для определения количества живых кератиноцитов (на 1 см<sup>2</sup> поверхности) КЛ отсекали и после удаления подкожной жировой клетчатки помещали в питательную среду 199 с высокой концентрацией антибиотиков (1000 ЕД/мл пенициллина, 1000 ЕД/мл стрептомицина, 5 мкг/мл амфотерицина) на 3 часа. После ферментизации в 0,25 % растворе трипсина при 4 °С в течение 18 часов КЛ помещали в стерильные чашки Петри, затем удаляли роговой слой, механически щадяще смывали кератиноциты в питательную среду. Количество живых клеток оценивали с помощью метода исключения трипанового синего.

Модель инсулинзависимого диабета воспроизводили внутримышечным введением аллоксана в суммарной дозе 180 мг/кг массы

животного [В.И. Корчин, 1992; Л.Е. Бобырева, 1998; М.А. Юрина, О.А. Адейкина, 2002; В.И. Янькова, 2002]. Для предупреждения гибели животных от острой формы диабета суммарную дозу аллоксана вводили дробно в дозах 40, 60 и 80 мг/кг с интервалом в 7 дней. Возникновение экспериментального диабета контролировали по динамике глюкозы крови, взятой из хвостовой вены крыс, с помощью глюкометра «One Touch» Basic, используя тест-полоски для прибора «One Touch» фирмы Life-scan Inc., США. Аллоксановый диабет считали вызванным при увеличении содержания глюкозы в крови в 1,4 раза по сравнению с исходным фоном.

Изучение влияния диабенола на микроциркуляцию в коже проводили в опытах на крысах линии Вистар [А.М. Чернух, 1984]. Крыс наркотизировали нембуталом (40 мг/кг, внутривенно). Для внутривенного введения исследуемого вещества в левую бедренную вену устанавливали полиэтиленовый катетер. Для регистрации артериального давления (АД) электроманометром, катетер устанавливали в левую бедренную артерию. Кровоток в поверхностных слоях кожи определяли методом лазерной доплеровской флоуметрии с использованием двух флоуметров типа VLF-21 фирмы Transonic System Inc., США. Принцип метода основан на изменении частоты лазерного света, отраженного от движущихся эритроцитов (доплеровский сдвиг). В последующем в приборе используется алгоритм Боннера для расчета тканевого кровотока. Объем ткани, в котором происходит измерение кровотока, составляет 1 мм<sup>3</sup>.

В опытах каждой серии регистрацию исходных показателей гемодинамики проводили в течение 5 мин, после чего внутривенно вводились диабенол или физиологический раствор в контрольной серии опытов, регистрацию продолжали в течение 1 часа. В ходе опытов все параметры регистрировали в цифровом виде на системе МакЛаб. При обработке результатов эксперимента определяли средние значения каждого из параметров гемодинамики с интервалом в 5 мин.

Изучение влияния диабенола на развитие микроциркуляторных нарушений в коже и морфологических изменений в ней при моделировании редуцированного кровообращения проводили<sup>1</sup> в опытах на крысах [В.В. Банин, 2000; K. Willms-Kretschmer, G. Majno, 1969]. Моделирование ишемии осуществляли путем прошивания шелковой нитью кожной складки длиной 4,5–5 см, высотой 1 см в области спины животного. Основание складки прошивали одиночным прерывистым швом без промежутков между стежками.

Забор материала (кожи) проводили с использованием гексеналового наркоза (60 мг/кг, внутривенно). При этом экспериментальные животные были разделены на 3 группы: интактную, контрольную и подопытную. Животные 1-й группы (интактные) служили в качестве «чистого» контроля, поскольку у них под наркозом лишь удаляли шерсть на спине. Крысам 2-й группы (контроль) ежедневно в течение 3 суток внутривенно вводили 0,2 мл физиологического раствора, а животным 3-й (подопытной) группы – в таком же объеме диабенол в дозе 10 мг/кг.

Материал для электронномикроскопического исследования – узкую полоску кожи размерами 1,5x4,0 мм – брали на 4-е сутки из стандартного участка на середине складки у ее вершины. Полоски фиксировали в течение 2 ч в 2,5 % растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере (рН 7,4), разрезали на кусочки, дофиксировали в 1%-м растворе OsO<sub>4</sub> и заливали в аралдит.

Для ориентации использовали полутонкие срезы (30–50 нм), окрашенные 1 % метиленовым синим. При этом срезы, ориентированные перпендикулярно поверхности эпидермиса, покрывали площадь, соответствующую сосочковому и, частично, ретикулярному слоям дермы и первым 2–4 клеточным слоям эпидермиса.

---

<sup>1</sup> Исследования выполнены в отделе морфологии (рук. – член-корреспондент РАМН В.В. Банин) Российского государственного медицинского университета совместно со старшим научным сотрудником М.Г. Костяевой, за что выражаем ей благодарность.

Срезы окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали в электронном микроскопе «Hitachi HU-12A».

Изучение влияния диабенола на фибробласты кожи крыс исследовали<sup>1</sup> с помощью МТТ-теста [В.П. Фисенко, 2000, Т. Mossmann, 1983]. Метод основан на способности дегидрогеназ живых клеток превращать бледно-желтый водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромистый (МТТ) в голубые кристаллы формазана, не растворимые в воде. Количество образовавшегося формазана (определяемое колориметрическим методом после его растворения в органических растворителях) характеризует интенсивность окислительно-восстановительных процессов в клетках, что и было использовано в качестве критерия цитотоксического действия изучаемого соединения.

Для проведения экспериментальной работы использовались новорожденные белые крысы. Работа проводилась в условиях стерильности с применением ламинарбокса ЛБВ и бактерицидных ламп. Животные подвергались эвтаназии путем дислокацией шейных позвонков, кожу стерилизовали 96% этиловым спиртом. Кусочки кожи измельчали на фрагменты размером 1–3 мм<sup>3</sup> в среде RPMI-1640, содержащей 40 мкг/мл гентамицина. Фрагменты ткани после измельчения вносили в круглодонную пробирку объемом 15 мл и осаждали при 0–4 °С в среде RPMI-1640 в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удаляли и ткань ресуспендировали в 10 мл среды RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 40 мкг/мл гентамицина и 0,1% L-глутамин. После ресуспендирования ткани со средой ее вносили по 5 мл во флаконы для культивирования. Через 24 часа проводили смену среды. Неприкрепившиеся фрагменты удалялись. В дальнейшем смена среды проводилась каждые 3 суток.

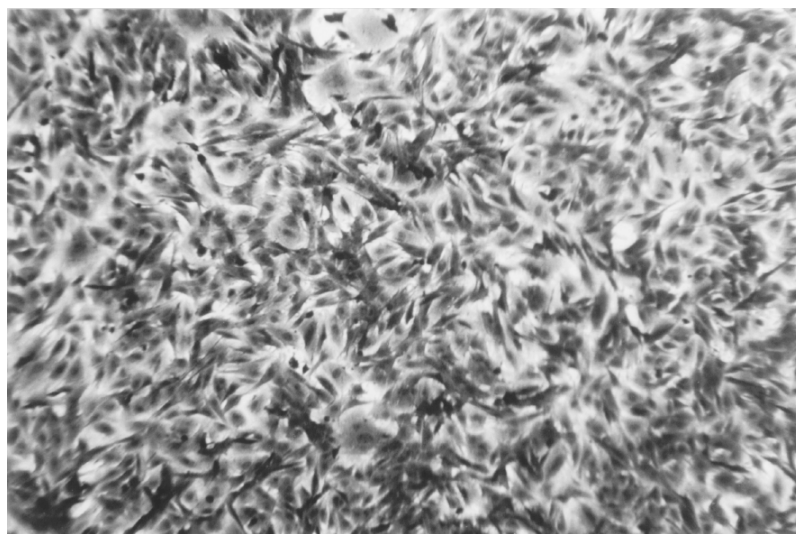
Через 7 дней культивирования при 37°С и 5% CO<sub>2</sub> наблюдали

---

<sup>1</sup> Эксперименты проведены на кафедре молекулярной фармакологии и радиобиологии (зав. – академик РАМН П.В. Сергеев) Российского государственного медицинского университета совместно с кандидатом медицинских наук А.В. Семейкиным.

начало образования клеточного монослоя, состоявшего из веретенообразных клеток. В дальнейшем эти клетки формировали монослой вокруг тканевых фрагментов (рис. 12.1.).

Для исследования влияния диабенола на количество клеток полученной культуры и их метаболизм суспензию клеток  $10^4$  /мл, полученную после обработки монослоя трипсином, вносили по 180 мкл в лунки 96-луночного плоскодонного пластикового планшета (Costar) с добавлением 20 мкл диабенола в исследуемых разведениях (0,001, 0,01, 0,1 и 1 мг/мл). Для оценки действия изучаемого вещества в условиях гипоксии, в лунки вносили химические анализаторы, описанные В.В. Соколовским (1971) и А. Laborit (1970): 2,4-динитрофенол (разобщитель окисления и фосфорилирования, ингибитор цикла Кребса) в конечных концентрациях 0,2 и 0,5 мМ и цианид натрия (ингибитор цитохромов) в конечных концентрациях 0,2 и 2 мМ. Сроки инкубации с диабенолом составляли 1 и 2 суток.



**Рис. 12.1. Фибробласты кожи крысы на 2-е сутки культивирования**

По окончании инкубации клеток среду из лунок удаляли и вносили по 200 мкл свежей среды. Затем в каждую лунку добавляли по 10 мкл раствора МТТ (5мг/мл в фосфатном буфере) и инкубировали при 37 °С в течение 3 часов. После инкубации среду удаляли

и вносили в каждую лунку по 150 мкл диметилсульфоксида для растворения образовавшихся гранул формазана. Оптическую плотность образцов регистрировали при длине волны 530 нм на анализаторе иммуноферментных реакций «УНИПЛАН» АИФР-01.

Жизнеспособность клеток перед экспериментом контролировалась по окрашиванию трипановым синим и составляла 85–90 %. Результаты выражали в % от контроля. Параллельно с постановкой МТТ-теста проводился учет по окрашиванию метиленовым синим клеточных препаратов в соответствующих лунках (цитологическое исследование).

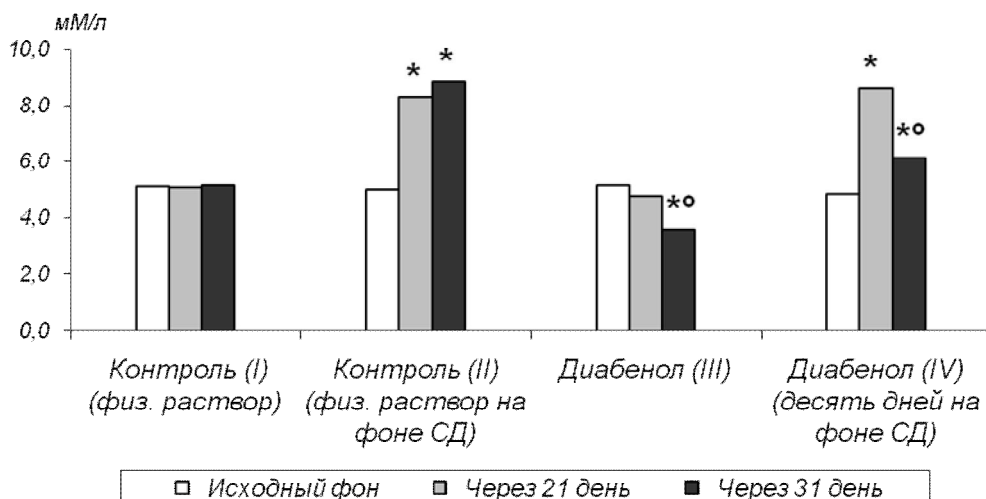
Статистическую обработку данных, учитываемых в градированной форме, проводили по Р.Н. Бирюковой (1962), М.Л. Беленькому (1963), Р. Беллману (1987), В.И. Сергиенко, И.Б. Бондаревой (2001) и с помощью таблиц Н.Н. Самойлова (1970). Результаты исследований, выраженные в *альтернативной форме* [определение ЛД<sub>50</sub>, ЕД<sub>30</sub> и ЕД<sub>50</sub>, границ доверительного интервала и терапевтических индексов, или широты терапевтического действия – ШТД (ЛД<sub>50</sub>/ЕД<sub>30</sub>, ЛД<sub>50</sub>/ЕД<sub>50</sub>)], обрабатывали с помощью методов, описанных В.Б. Прозоровским (1962) и М.Л. Беленьким (1963), с использованием разработанных на кафедре фармакологии Кубанского государственного медицинского университета программ для ЭВМ IBM PC XT.

### **12.1. Влияние диабенола на выживаемость кожного лоскута при экспериментальном сахарном диабете**

При создании экспериментального диабета установлено, что трехкратное (с интервалом в 7 дней) внутримышечное введение аллоксана крысам вызывало спустя 21 день повышение содержания глюкозы в крови (5,0 и 4,88 против 8,29 и 8,61 мМ/л соответственно в двух группах животных, отобранных с целью формирования диабета).

Внутрибрюшинное введение интактным животным диабенола (14 мг/кг) в течение 10 дней (с 21 по 31 день эксперимента) вызывало по сравнению с исходным фоном статистически достоверное снижение (на 25,6%;  $p < 0,001$ ) уровня глюкозы в крови.

Использование диабенола в аналогичной дозе и временном интервале на фоне сахарного диабета индуцировало существенное снижение (на 28,6 %;  $p < 0,001$ ) содержания глюкозы в крови по сравнению с данными, имевшими место при развившемся диабете (21 день опыта). Следует отметить, что у животных с сахарным диабетом (при введении физиологического раствора в качестве контроля) содержание глюкозы в крови по состоянию на 21 (8,29 мМ/л) и 31 дни (8,86 мМ/л) практически не изменялось (табл. 12.1, рис. 12.2.).



**Рис. 12.2. Влияние диабенола на содержание глюкозы в крови в условиях экспериментального сахарного диабета при моделировании кожного лоскута на питающей ножке у крыс. \* $p < 0,001$  по сравнению с исходным фоном;  $p < 0,001$  по сравнению с данными на 21-й день опыта**

Следовательно, в опытах на крысах с экспериментальным диабетом диабенол проявлял выраженное гипогликемическое действие, что согласуется с данными, полученными Г.П. Дудченко (2001).



При исследовании дерматопротекторных свойств диабенола (14 мг/кг внутривенно) в условиях экспериментального СД установлено, что в контрольных экспериментах (физиологический раствор на фоне СД) жизнеспособность кожного лоскута по сравнению с данными, полученными на интактных животных, статистически достоверно ( $p < 0,001$ ) снижалась (на 30 %) (табл. 12.1., рис. 12.3.).

Таблица 12.1

**Влияние диабенола на выживаемость кожного лоскута в условиях экспериментального сахарного диабета у крыс**

Вещество	Доза, мг/кг	Кол-во животных	Содержание глюкозы в крови <sup>1</sup> , мМ/л			Дерматопротекторная активность <sup>2</sup>		
			исходный фон (1)	через 21 день (2)	через 31 день <sup>3</sup> (3)	некротизированная часть КЛ, %	выжившая часть КЛ, %	оценка <sup>4</sup>
Контроль (I) (физраствор)	-	8	5,15 ± 0,30	5,08 ± 0,29	5,19 ± 0,32	57,1 ± 2,29	0(100)	-
Контроль (II) (физраствор на фоне СД)	-	8	5,0 ± 0,30	8,29 ± 0,24 $p_{1-2} < 0,001$	8,86 ± 0,15 $p_{1-3} < 0,001$	74,2 ± 2,04 $p_{I-II} < 0,001$	-30,0 (I-II)	УС
Диабенол (III)	14,0	9	5,17 ± 0,17	4,8 ± 0,20	3,57 ± 0,13 $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$	38,9 ± 2,99 $p_{I-III} < 0,001$	+32,0 (I-III)	УП
Диабенол (IV) (десять дней на фоне СД <sup>5</sup> )	14,0	10	4,88 ± 0,21	8,61 ± 0,30 $p_{1-2} < 0,001$	6,15 ± 0,24 $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$	52,1 ± 1,46 $p_{II-IV} < 0,001$	+29,8 (II-IV)	УП

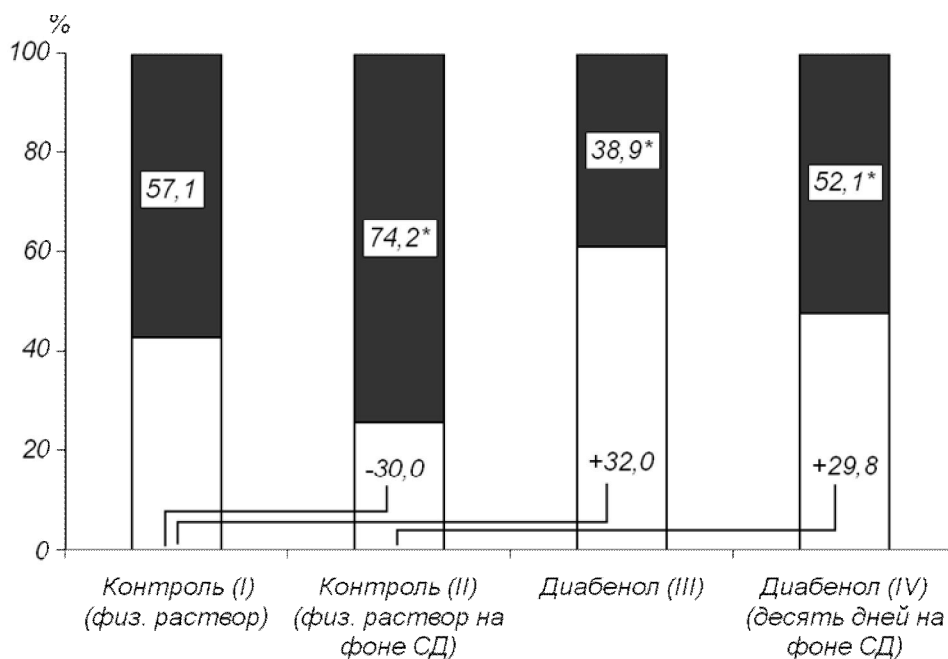
<sup>1</sup>Данные обработаны методом прямых разностей (по В.И. Сергиенко, И.Б. Бондаревой, 2001).

<sup>2</sup>Учитывалась на 32 день опыта (на 4 день после формирования КЛ).

<sup>3</sup>Изменение содержания глюкозы через 2 ч после последнего введения диабенола.

<sup>4</sup>УС – умеренное снижение, УП – умеренное повышение.

<sup>5</sup>В том числе 3 дня после моделирования КЛ.



**Рис. 12.3. Соотношение некротизированной и выжившей частей кожного лоскута при внутрибрюшинном введении диабенола (14 мг/кг) в условиях экспериментального сахарного диабета у крыс. \* $p < 0,001$**

Введение животным диабенола в течение 10 дней на фоне сахарного диабета приводило к значимому повышению (на 29,8 %) выживаемости кожного лоскута.

Обращает на себя внимание тот факт, что дерматопротекторное действие диабенола, в принятых условиях эксперимента, практически сопоставимо - некротизированная часть лоскута составляет 52,1 % по сравнению с таковым в опытах на кожном лоскуте интактных животных (57,1 %).

Следует также отметить, что способность диабенола повышать выживаемость кожного лоскута на фоне сахарного диабета была на 25,3 % меньше, чем это имело место при использовании его у животных с нормальным содержанием глюкозы в крови.

Таким образом, в опытах на крысах с экспериментальным сахарным диабетом, индуцированным аллоксаном, диабенол проявляет выраженную способность повышать выживаемость кожного лоскута на питающей ножке.

## **12.2. Влияние на микроциркуляцию в коже**

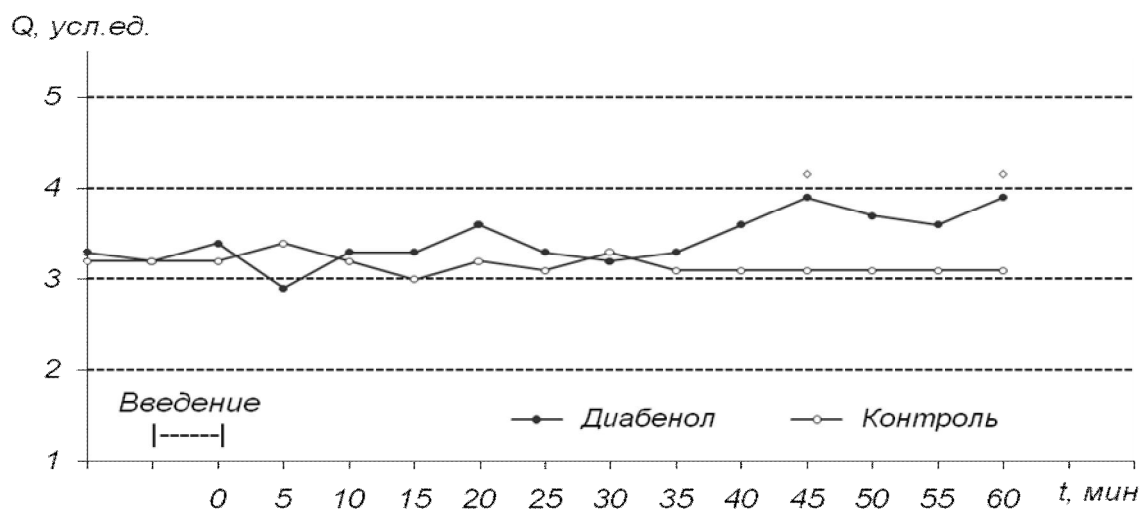
Установлено, что диабенол в дозе 10 мг/кг (внутривенно) сразу после введения по сравнению с контрольными исследованиями (физиологическим раствором) вызывал статистически достоверное снижение АД на 6,1 – 10,9 % в течение 25 мин, а по сравнению с фоном – на 7,1 – 9,1 % в течение 10 минут.

Кровоток в коже под влиянием диабенола по отношению к контрольным значениям не претерпевал существенных изменений, а по отношению к фоновым – отмечалась тенденция к его повышению, которое на 45 и 60 мин исследования статистически достоверно. При этом сосудистое сопротивление, по сравнению с контрольными данными, практически не изменялось, а по отношению к фоновым в большинстве временных интервалов проявляло тенденцию к снижению, которое на 45 мин исследования статистически значимо.

Таким образом, в опытах на наркотизированных крысах диабенол вызывает слабовыраженное кратковременное снижение АД, несколько повышает кровоток в коже, снижая в ней сопротивление сосудов.

## **12.3. Ультроструктурный анализ дерматопротекторного действия при микроциркуляторных нарушениях в коже**

Ультроструктурные признаки циркуляторных расстройств и клеточные повреждения были принципиально однотипны в 3 экспериментальных группах: 1-я – интактная, 2-я – контрольная, 3-я – подопытная с использованием диабенола, хотя и выражались в разной степени, встречались с разной частотой, а иногда не выявлялись совсем (рис. 12.4., табл. 12.2.).



**Рис. 12.4. Влияние диабенола (10 мг/кг) на кровоток в коже (Q) крыс**

*Таблица 12.2*

**Микроциркуляторные нарушения и клеточные повреждения при моделировании ишемии и использовании диабенола (10 мг/кг внутрибрюшинно ежедневно в течение 3 суток) у крыс**

Признак	Группа		
	1-я (интактная)	2-я (контрольная)	3-я (диабенол)
Закрытые капилляры	±	+	+
Отслойка эндотелия	-	+	±
Деструкция эндотелия	-	+	±
Трансформация эндотелия	-	+	±
Отек перицитов	-	+	+
Перикапиллярный отек	-	+	+
Гидратация матрикса	±	+	+
Эритроциты в ткани	-	+	+
Отек клеток ткани	-	+	+
Деструкция клеток ткани, фагоцитоз	-	+	+
Дегрануляция тучных клеток	-	-	+
Отек и повреждение эпидермиса	-	+	±
Отек и повреждение нервных волокон	±	+	±

*Примечание.* "+" встречается регулярно, "±" эпизодически, "-" отсутствует.

Эпизодически встречающиеся в группе интактных животных закрытые капилляры – вполне закономерное явление для кожи, в которой колебания объема крови и числа функционирующих капилляров являются нормальным регуляторным механизмом. В контрольной группе (введение физиологического раствора на фоне ишемии) капилляры с полностью закрытым, щелевидным просветом или сосуды, рабочий просвет которых был резко сужен, отмечались регулярно, составляя примерно половину от всех капилляров (рис. 12.5а). Несколько реже закрытые капилляры встречались и в 3-й (подопытной) группе крыс. Для закрытых капилляров и многих сосудов с просветом нормальной величины был характерен выраженный периваскулярный отек. Капиллярная стенка и прилегающая ткань были инфильтрированы флоккулярным преципитатом, свидетельствующим о высоком содержании белка в экссудате. Эндотелиальная выстилка капилляров у животных 3-й группы имела меньшие повреждения, чем в контрольной группе (рис. 12.5б). Примечательно, что при явных периваскулярных отеках плотные контакты в эндотелии выглядели достаточно сохранными (рис. 12.5в) даже при заметных повреждениях эндотелия. В подопытной группе и, особенно часто, в группе контроля можно было отметить истончение периферических зон эндотелиальных клеток, увеличение цитоплазматической фракции плазмалеммальных везикул, которое сопровождалось формированием трансэндотелиальных каналов, обычно нехарактерных для капилляров с соматическим типом эндотелия. Эти трансформации эндотелиальной выстилки, по-видимому, отражают интенсификацию транспорта жидкости и сравнительно крупных молекул через эндотелий.

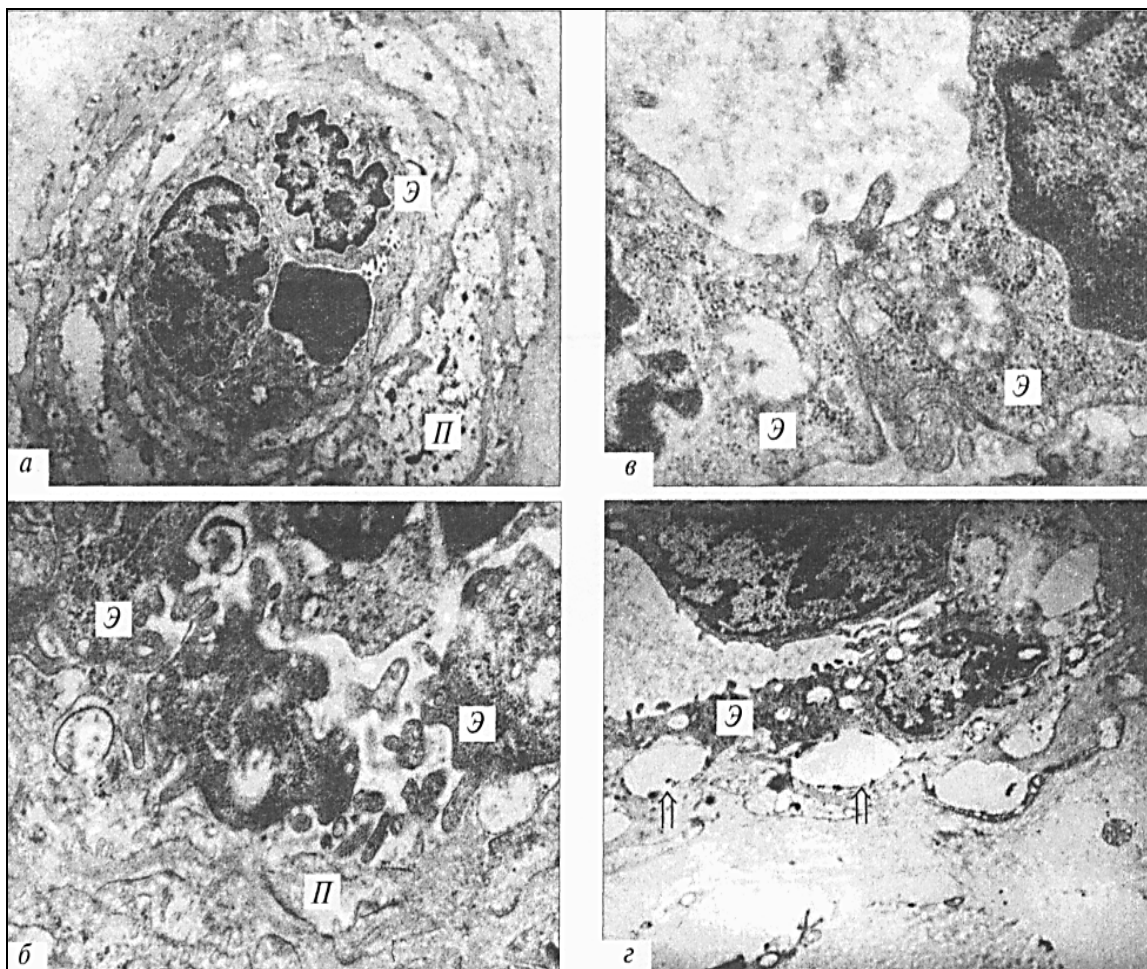
На фоне более плотных, инфильтрированных белком пространств, отчетливо определялись контуры светлых, отечных перицитов, практически лишенных мембранных органелл. Частичная отслойка эндотелиальной выстилки от подлежащей базальной пластинки, характерная для 2-й контрольной группы, в подопытной группе была менее выражена (рис. 12.5г). На таких участках формировались ограниченные, наполненные жидкостью пространства. Обширные пустоты пространства, содержащие жидкость, встречались в экстра-

клеточном матриксе практически на всех участках дермы. В клетках соединительной ткани, значительно удаленных от стенки капилляров, также выявлялись признаки гидратации цитоплазмы и мембранные повреждения, хотя и не столь выраженные, как у клеток, расположенных непосредственно у капилляров.

Если в клетках дермы встречались отчетливые проявления ишемического повреждения, вплоть до полной деструкции, то явных некрозов в эпителиальном покрове кожи крыс даже в контрольной группе не наблюдалось. Как правило, кератиноциты были несколько гидратированы и нередко содержали митохондрии с частично разрушенными кристами. Во 2-й и, реже, в 3-й группах животных можно было отметить признаки гидратации всего эпидермального пласта, особенно ярко выраженные в базальных слоях клеток. Расширенные межклеточные пространства приобретали четкообразную форму, поскольку контакты (десмосомы) между клеточными отростками в базальном и шиповатом слоях эпидермиса были вполне сохранены. Не было обнаружено также и признаков отслойки эпителиального пласта от подлежащей базальной пластинки или сосочкового слоя дермы.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что протекторное антигипоксическое действие диабенола в условиях использованной модели оказалось слабовыраженным. Характерным признаком в подопытной группе крыс была отчетливая заинтересованность тучных клеток. Их дегрануляция, нередко полное разрушение и, в отдельных случаях, явные признаки гибели вследствие апоптоза, регистрировались достаточно регулярно. Очевидно, что и выраженные циркуляторные расстройства, так же как и нарушения проницаемости, отчетливые в 3-й группе, можно связать с реакцией тучных клеток, дегрануляция которых, как известно, приводит к освобождению в интерстиций вазоактивных веществ в непосредственном окружении микрососудов.

Таким образом, диабенол проявляет слабовыраженный протекторный эффект в отношении развития микроциркуляторных расстройств и нарушения проницаемости стенок капилляров кожи.



**Рис. 12.5. Повреждения кровеносных капилляров и окружающих тканей в коже крыс при парциальной ишемии: а – капилляр с резко суженным просветом, периваскулярный отек, х 6000; б – повреждения эндотелиальной выстилки закрытого капилляра во 2-й группе, х 18000; в – плотный контакт между эндотелиальными клетками, х 25200; з – «пустые» полости под эндотелием (стрелки), х 6000. Э – эндотелий, П – перицит**

#### **12.4. Влияние на жизнеспособность и метаболизм изолированных фибробластов кожи**

По данным МТТ-теста, подтвержденного световой микроскопией, установлено, что диабенол в разведении 1 мг/мл вызывал гибель

культивируемых фибробластов (оптическая плотность  $46,6 \pm 3,54\%$  по отношению к контролю), а при увеличении разведения исследуемого вещества до 0,1 мг/мл выявлялись отдельные жизнеспособные фибробласты (оптическая плотность  $66,7 \pm 10,37\%$ ). В концентрации диабенола, равной 0,01 мг/мл, количество жизнеспособных фибробластов приближалось к таковому в контроле ( $76,7 \pm 8,25\%$ ), а в разведении 0,001 мг/мл практически не отличалось от него.

В присутствии субтоксических и токсических доз динитрофенола (0,2 и 0,5 мМ соответственно) и цианида натрия (0,2 и 2 мМ соответственно) диабенол (0,001, 0,01 и 0,1 мг/мл) не проявлял статистически значимой антигипоксической активности.

Таким образом, в опытах на изолированных фибробластах кожи крыс диабенол не проявляет антигипоксического действия.

### **12.5. Влияние диабенола на показатели энергетического обеспечения, антиоксидантной системы и активность лизосомальных ферментов в кожном лоскуте**

Под воздействием диабенола (10 мг/кг внутривнутрибрюшинно перед моделированием кожного лоскута и в последующие 3 дня 1 раз в сутки) в выжившей области ишемизированного кожного лоскута отмечается повышение содержания окисленной формы НАД и суммы пиридиновых нуклеотидов до уровня нормы, а также увеличение содержания цитохрома С, несмотря на снижение активности цитохром С-редуктазы (внешней ротеноннечувствительной редуктазы митохондрий). В зоне некроза выявлялось повышение (сохранение на нормальном уровне) отношения НАД/НАДН, при этом содержание НАД и суммы никотинамидных коферментов несколько снижалось относительно соответствующих контрольных значений. Следует отметить, что активность цитохром С-редуктазы в некротизированной ткани под влиянием диабенола превосходила аналогичную в контрольной группе более чем в 3,5 раза (табл. 12.3.).



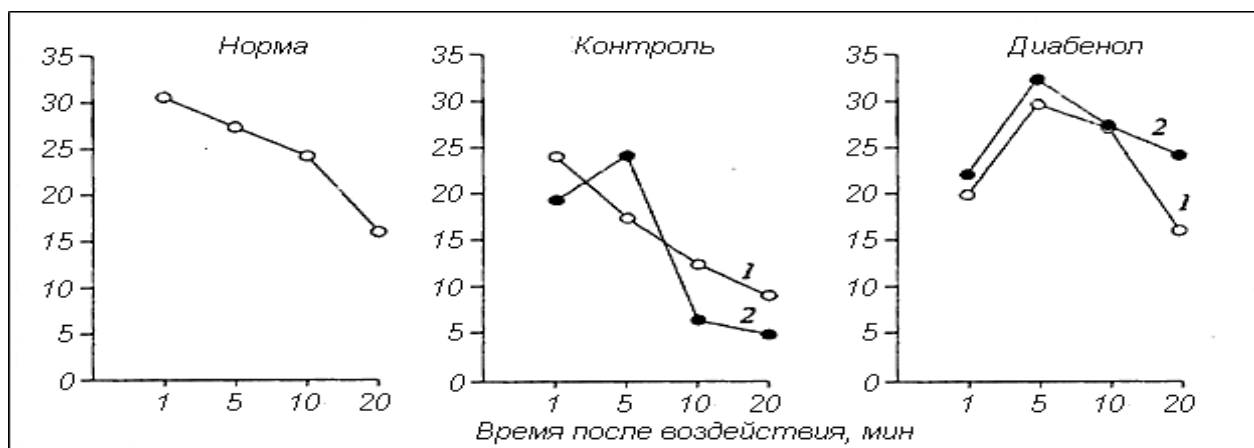
**Влияние диабенола на показатели системы энергетического обеспечения, антиоксидантной системы и активность лизосомальных ферментов в КЛ ( $M \pm m$ )**

Показатель	Норма	Кожный лоскут			
		контроль		диабенол	
		интактная	ишемия	интактная	ишемия
Цитохром <i>C</i> , мкмоль/мг	10,2 ± 1,5	8,0 ± 2,0	5,6 ± 1,2*	11,0 ± 2,0	9,9 ± 1,4 <sup>o</sup>
НАДН-цитохром <i>C</i> -редуктаза, нмоль восстановленного цитохрома <i>C</i> /мг х мин	59,0 ± 3,0	82,0 ± 12,0**	11,0 ± 3,0* <sup>+</sup>	50,0 ± 10,0	39,0 ± 5,0 <sup>o</sup>
НАД, мкмоль/г	2,8 ± 0,3	2,25 ± 0,11*	1,4 ± 0,2* <sup>+</sup>	2,6 ± 0,2	1,21 ± 0,11* <sup>+</sup>
НАДН, мкмоль/г	2,12 ± 0,12	2,46 ± 0,14	2,8 ± 0,2	2,8 ± 0,2	1,19 ± 0,14* <sup>+o</sup>
НАД/НАДН	1,32 ± 0,22	0,91 ± 0,09***	0,50 ± 0,10	0,92 ± 0,08*	1,1 ± 0,1 <sup>o</sup>
НАД+НАДН, мкмоль/г	5,0 ± 0,3	4,8 ± 0,2	4,2 ± 0,2*** <sup>++</sup>	5,4 ± 0,2 <sup>o</sup>	2,40 ± 0,15* <sup>+o</sup>
ПГЕ, пг/г ткани	17,5 ± 1,5	13,5 ± 1,3*	6,8 ± 1,2* <sup>+</sup>	14,9 ± 1,0	11,1 ± 1,0* <sup>+++o</sup>
ПГФ, пг/г ткани	3,1 ± 0,4	5,1 ± 0,7***	10,4 ± 1,2* <sup>+</sup>	2,9 ± 0,4 <sup>oo</sup>	5,1 ± 0,3* <sup>+o</sup>
ПГЕ/ПГФ	5,6 ± 0,8	2,6 ± 0,9*	0,65 ± 0,90* <sup>+</sup>	5,1 ± 0,9 <sup>oo</sup>	2,2 ± 0,9* <sup>+++o</sup>
Катепсин Д, мкг тирозина/мг белка х ч	2,9 ± 0,3	6,4 ± 0,6*	3,0 ± 0,2 <sup>+</sup>	5,1 ± 1,0*	1,9 ± 0,5* <sup>+o</sup>
РНКаза, ммоль/л	1,0 ± 0,2	2,2 ± 0,3***	0,5 ± 0,1* <sup>+</sup>	1,98 ± 0,25**	1,75 ± 0,15* <sup>o</sup>
Щелочная фосфатаза, нмоль/г	7,2 ± 0,4	6,9 ± 0,4	3,9 ± 0,2* <sup>o</sup>	8,3 ± 1,2 <sup>oo</sup>	6,3 ± 1,2 <sup>o</sup>
Супероксиддисмутаза, усл. ед/мг бел-ка х мин	39,2 ± 2,3	26,6 ± 2,4*	23,0 ± 2,4**	32,7 ± 2,6 <sup>oo</sup>	10,2 ± 1,2* <sup>+o</sup>
Cu,Zn-супероксиддисмутаза, усл. ед/мг белка х мин	37,6 ± 2,2	23,8 ± 2,3*	22,5 ± 1,5**	30,5 ± 2,6 <sup>oo</sup>	29,5 ± 2,1
β-Галактозидаза, ммоль п-нитрофенола/мг белка х ч	0,98 ± 0,22	0,90 ± 0,12	1,54 ± 0,12	1,06 ± 0,13	0,30 ± 0,01* <sup>+o</sup>
β-Глюкозидаза, ммоль п-нитрофенола/мг белка х ч	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,32 ± 0,08	0,89 ± 0,13* <sup>o</sup>	0,09 ± 0,02* <sup>+o</sup>

\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,05$  по сравнению с нормой;

$^+p < 0,001$ ;  $^{++}p < 0,05$  по сравнению с интактной тканью;  
 $^{\circ}p < 0,001$ ;  $^{\circ\circ}p < 0,05$  по сравнению с соответствующим контролем.

Установлено, что диабенол существенно повышает пропускную способность протона по цепи переноса электронов – активность НАДН-оксидазы как в зоне ишемии, так и в интактной области в первые 20 мин исследования существенно возрастает и имеет четко выраженный пик активности, который отсутствует в случае суспензии митохондрий интактной кожи и указывает на включение экзогенного цитохрома С. Затем, в последующие 40 мин опыта, активность НАДН-оксидазы падает, превышая на 60-й мин уровень нормы (рис. 12.6.). Следует подчеркнуть, что после первоначального пика, который наблюдается и при исследовании интактной области контрольного КЛ, активность НАДН-оксидазы падает не резко, как в контроле, а поддерживается на высоком уровне (по-видимому, мембраны митохондрий под воздействием диабенола сохраняются).



**Рис. 12.6. Влияние диабенола на активность НАДН-оксидазы КЛ. 1 – некротизированная ткань; 2 – интактная ткань; по осям ординат – нмоль/мин на 1 г белка**

Таким образом, диабенол обладает определенной энергопротекторной активностью, которая, вероятно, связана со стабилизацией

под воздействием исследуемого вещества структуры мембран, а не с прямым действием на синтез АТФ.

Активность катепсина Д (отражает лизис белков в каждом лоскуте) в зоне некроза меньшая, чем в контроле, тогда как активность РНКазы (принимает активное участие в протеолизе нуклеиновых кислот) и щелочной фосфатазы, наоборот, повышена. Активность других лизосомальных ферментов в зоне некроза снижалась, однако в интактной области кожного лоскута она была существенно выше контрольных значений. Различные ферменты лизосом под воздействием диабенола полностью не восстанавливают свои функции по ограничению распространенности поражения и утилизации продуктов гидролиза. По-видимому, диабенол по-разному взаимодействует с различными гидролазами и так же, как и в случае митохондрий, стабилизирует липидный компонент лизосомальных мембран.

В системе метаболизма арахидоновой кислоты в каждом лоскуте к 3-му дню исследования резко возрастает содержание ПГФ и снижается уровень ПГЕ, происходит сдвиг в сторону вазоконстрикторного компонента. Под воздействием диабенола содержание ПГФ в зоне некроза существенно снижалось, а содержание ПГЕ – повышалось.

Таким образом, под воздействием диабенола в зоне некроза на 3-и сутки на нормальном уровне сохранялось отношение НАД/НАДН, содержание цитохрома С, повышалась активность НАДН-оксидазы митохондрий. Данные изменения отмечались на фоне снижения содержания НАД и суммы никотинамидных коферментов, а также относительного повышения активности цитохром С-редуктазы (по сравнению с контрольными данными), что позволяет предположить о способности диабенола сохранять структуру мембран митохондрий. Влияние диабенола на лизосомальные ферменты неоднозначно, следует отметить снижение активности катепсина Д и повышение активности РНКазы и щелочной фосфатазы как в некротизированной ткани, так и в интактной.

В системе метаболизма арахидоновой кислоты к 3-му дню опыта наблюдалось снижение содержания ПГF и повышение уровня ПГЕ. Полученные результаты свидетельствуют о благоприятных сдвигах в метаболизме арахидоновой кислоты и системе энергетического обеспечения под воздействием диабенола, лежащих в основе его дерматопротекторного действия.

## 12.6. Заключение

Обобщая результаты исследований, представленные в настоящей главе, можно заключить, что диабенол в опытах на интактных мышах и крысах при внутрибрюшинном введении в широком диапазоне доз (3,5–56,0 и 3,5–14,0 мг/кг соответственно) способен индуцировать дозозависимое повышение выживаемости кожного лоскута, увеличивать выживаемость кератиноцитов. При подкожном введении интактным мышам диабенол по способности повышать выживаемость кожного лоскута превосходит или сопоставим с пентоксифиллином. В условиях внутривенного введения интактным крысам диабенол по активности сопоставим с пентоксифиллином.

В опытах на крысах с экспериментальным (аллоксановым) СД диабенол обладает выраженной способностью повышать выживаемость кожного лоскута на питающей ножке, а также кожный лоскут передней брюшной стенки, находящихся в условиях артериальной и артериовенозной недостаточности.

Дерматопротекторное действие диабенола может быть обусловлено способностью его вызывать благоприятные сдвиги в метаболизме арахидоновой кислоты и системе энергетического обеспечения кожи.

# ГЛАВА 13

## ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДИАБЕНОЛА

*Л. В. Смирнова, А. А. Спасов*

---

Проведение фармакокинетических исследований на ранних стадиях доклинических испытаний лекарственных препаратов имеет большое практическое значение [Mangoni A.A., 2004]. Фармакокинетические свойства лекарственных веществ определяют закономерности абсорбции, распределения, биотрансформации и экскреции лекарственных веществ у человека и животных, а также механизмы, обеспечивающие функционирование данных процессов в организме [Жердев В.П., 1998]. Все это имеет большое значение при проведении дальнейших фармакодинамических и фармацевтических исследований и, не редко, позволяет сократить общий объем экспериментов [Houston J.V., 2003].

В результате анализа литературных данных можно сделать вывод, что для многих препаратов, производных бензимидазола, характерны сложные фармакокинетические процессы. Производные бензимидазола подвергаются сильному метаболизму в печени. Основными изоформами цитохрома P450, принимающими участие в метаболизме бензимидазолов, являются CYP2C19 и CYP3A4 [Venkatakrisnan K., 1998]. Причем производные бензимидазола способны индуцировать те же самые изоформы CYP450 и таким образом воздействовать на свой собственный метаболизм и метаболизм других ксенобиотиков.

У лекарственных препаратов производных бензимидазола, наблюдается гепатодуоденальная циркуляция [Смирнова Л.А., 2000],

повторное всасывание неизмененного препарата и его метаболитов в кишечнике. Чем, скорее всего, и объясняется сложность и неоднозначность фармакокинетических процессов. Для многих производных бензимидазола наблюдается довольно низкая абсолютная биодоступность при пероральном введении (от 2 до 60 %). Следует отметить, что для многих бензимидазолов наблюдаются высокие объёмы распределения, в десятки раз превышающие физиологические объёмы биологических объектов, что характеризует интенсивность распределения бензимидазолов в различные органы и ткани, и проницаемость через биологические барьеры. Для производных бензимидазола имеются данные о сильном связывании с белками и форменными элементами крови. Фармакокинетическая модель для животных и человека практически всегда одинакова [Спасов А.А., 2001].

Эксперименты были выполнены на белых беспородных крысах самцах массой 200–250 г, по стандартным методам изучения фармакокинетических свойств. Подопытным животным с помощью шприца в хвостовую вену вводили вещество диабенол, растворенное в физиологическом растворе в дозе 25 мг/кг. Контрольная группа животных в аналогичном объеме получала 0,9 % раствор хлорида натрия. Оценивалась динамика содержания соединения в крови, распределение по органам и тканям, а также экскреция с мочой и с калом. Количественное определение проводилось методом ВЭЖХ с УФ-детекцией при длине волны 280 нм [Спасов А.А., 1999]. Полученные экспериментальные данные анализировались модельно-независимым методом [Gibaldi M., 1982]. Площадь под фармакокинетической кривой (AUC) рассчитана с помощью смешанного линейно-логарифмического метода статистических моментов [Пиотровский В.К., 1986]. Для количественной оценки связывания исследуемых препаратов с сывороточным альбумином крыс использовался метод диализного равновесия [Чёгёр С.И., 1975]. Для определения места и характера связывания исследуемых препаратов использовался метод флуоресцентных зондов [Грызунов Ю.А., 2000].

Прогноз возможных метаболитов производных бензимидазола и изменение физико-химических свойств в процессе биотрансформации проводили с помощью программы «PALLAS» (CompuDrug Chemistry Ltd.). В качестве критериев оценки изменения физико-химических свойств были выбраны lgP и lgKa.

Для подробного изучения влияния производных бензимидазола на систему цитохрома P450 использовались тесты взаимодействия с гексеналом (изоформы CYP2C9, CYP2B1 и CYP2B2) [Omiecinski S.J., 1999; Nebert D.W., 2002], мидазоламом (изоформы CYP3A1 и CYP2C) [Perloff M.D., 2000; Warrington J.S., 2000] и альпразоламом (изоформа CYP3A1) [Никитин Н.А., 2002].

Для изучения влияния производных бензимидазола на вторую фазу биотрансформации использовался тест хлоралгидратного сна, так как хлоралгидрат является тест-субстратом глюкуронилтрансферазы [Лакин К.М., 1981].

Для исключения седативного или психостимулирующего эффектов проводили тест «барбитал-натриевого сна», т.к. барбитал-натрий не метаболизируется системой цитохрома P450 [Лакин К.М. и др. 1981]. Барбитал – натрий (ООО «МедПро Инк», Латвия) вводили внутрибрюшинно в дозе 250 мг/кг.

Эксперименты выполнены на 300 крысах самках (гексеналовый сон, хлоралгидратный сон) массой 200–250 г и 200 мышях самках массой 20–25 г (мидазоламовый сон, альпрозоламовый сон). Тест гексеналового сна использовали как общепринятый тест, позволяющий косвенно судить об активности монооксидазной системы печени. Гексенал (ООО «МедПро Инк», Латвия) в виде водного раствора инъецировали внутрибрюшинно крысам в дозе 70 мг/кг. Альпрозолам («Органика», Новокузнецк, таблетки по 0,001) вводили внутрибрюшинно, в виде суспензии на твине-85, в дозе 50 мг/кг, мидазолам (Dormicum, «Roche», Швейцария, 0,5% раствор в ампулах по 3 мл) – внутрибрюшинно в дозе 80 мг/кг. Хлоралгидрат (ООО «МедПро Инк», Латвия) вводили крысам внутрибрюшинно в виде водного раствора в дозе 70 мг/кг.

Лекарственное вещество диабенол вводили в терапевтическом диапазоне доз – 5 мг/кг (антиагрегантный эффект), 25 мг/кг (гипогликемический эффект) 50 мг/кг (доза, в 2 раза превышающую гипогликемическую) за 1 час до введения тест-субстратов.

Определение метаболитов проводили также при использовании кислотного, щелочного и ферментативного гидролиза (Лакин К.М. и др., 1981) проб мочи и кала, собираемых отдельно в течение суток в специальных метаболических камерах при проведении фармакокинетического эксперимента. Полученные пробы инкубировали с  $\beta$ -глюкуронидазой и арилсульфатазой в 0,1М ацетатном буфере (рН 5,0), с 5М раствором NaOH и 5М раствором HCl при 37°C в течение 2 часов. После инкубации проводили извлечение диабенола ацетонитрилом и далее проводили его количественное определение методом ВЭЖХ. По качественным и количественным изменениям на хроматограммах в данном случае возможны предположения о возможных путях метаболизма.

Лекарственная форма препарата диабенол разработана в виде гранулята таблеток в ЗАО «Медисорб» г. Перми под руководством проф., д.ф.н. Вдовиной Г.П. Оптимальный состав гранулята таблеток был установлен в партии № 14, достоверно уменьшающей содержание глюкозы на 23,15% по отношению к контрольной группе [Гаврилова Е.С., 1996]. В состав лекарственной формы вошли: связующее вещество – поливинилпирролидон и антифрикционное вещество – магния стеарат.

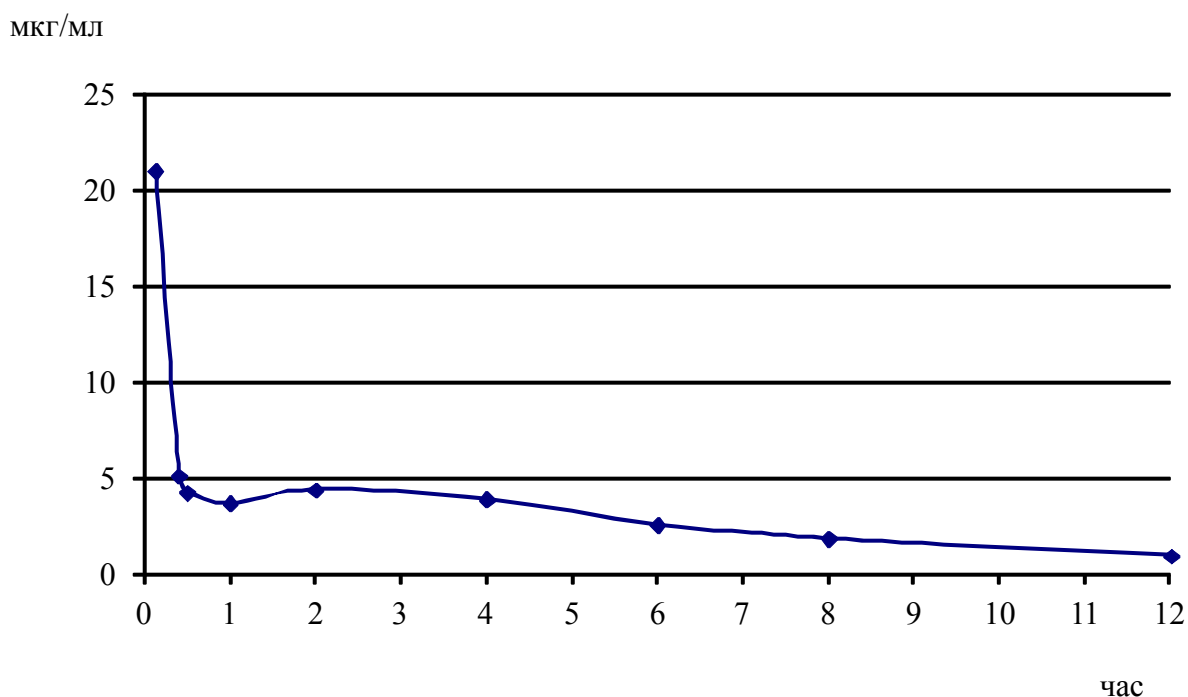
Экспериментальное изучение биодоступности гранулята таблеток препарата диабенол соответствовало регламенту проведения фармакокинетического исследования субстанции диабенола.

### **13.1. Фармакокинетика диабенола при внутривенном введении**

Препарат диабенол после внутривенного введения крысам в дозе 25 мг/кг имеет максимальную концентрацию в плазме крови



через 5 минут после введения (21,01 мкг/мл). После этого концентрация быстро снижается, причем снижение носит биэкспоненциальный характер, предполагая быструю первую фазу распределения ( $\alpha$ -фаза), сменяющуюся более медленной фазой элиминации ( $\beta$ -фаза). Профили кривых «концентрация-время» в плазме и цельной крови имеют сходный характер с несколько большими концентрациями препарата в цельной крови, что, по-видимому, связано с возможностью адсорбции препарата на форменных элементах. Диабенол определяется и в плазме, и в цельной крови до 12 часа (рис. 13.1).



**Рис.13.1. Содержание препарата диабенол в плазме крови крыс при внутривенном введении в дозе 25 мг/кг**

При изучении распределения диабенола было обнаружено, что препарат быстро и интенсивно распределяется по органам и тканям, о чем свидетельствуют показатели  $T_{1/2\alpha}$ ,  $V_d$ ,  $V_{ss}$  (табл. 13.1), а также непосредственное обнаружение в них препарата. Диабенол определяется в жировой и мышечной тканях уже на пятой минуте исследования, но максимум концентрации отмечается к получасу, а затем кон-

центрация начинает медленно снижаться, определяясь до двенадцатого часа. В сердце препарат достигает максимального содержания уже на пятой минуте, что, по-видимому, связано с обильным кровоснабжением данного органа, после чего начинает резко снижаться, но определяется до двенадцатого часа. Диабенол быстро проникает через гематоэнцефалический барьер, достигая максимальной концентрации на пятой минуте. Большие количества препарата определяются в почках и печени, что, по-видимому, свидетельствует о высоком уровне процессов элиминации диабенола, происходящих в данных органах. Но наиболее высокие уровни содержания препарата были выявлены в органах с высоким уровнем кровотока – легких и селезенке. Полученные данные показывают, что диабенол интенсивно распределяется в органы и ткани, концентрация в которых превышает его содержание в плазме крови в несколько раз. При этом отмечается четкая зависимость между содержанием препарата и уровнем органного кровотока. Параметры оценки интенсивности проникновения препарата в ткани приведены в таблице 13.2.

При изучении экскреции диабенола с мочой было выявлено, что выделение препарата достигает максимального уровня уже к первому часу (рис. 13.2). При этом большая часть препарата выводится в первые шесть часов после введения, как видно на графике кумулятивной экскреции диабенола (рис. 13.3). В первые 12 часов выводится 90 % от общего количества экскретируемого препарата в неизменном виде. Но с мочой выделилось всего 21 % неизменной субстанции от общего количества введенного диабенола. Почечный клиренс составил 0,135 мл/час. Соответственно, внепочечный клиренс равен 0,5 мл/час.

При исследовании экскреции диабенола с калом было обнаружено, что препарат определяется в небольших количествах в течение 36 часов, причем суммарная экскреция неизменной субстанции составила менее 1 % от введенной дозы. При этом в пробах и мочи и кала на хроматограммах были обнаружены дополнительные пики,

которые предположительно являются возможными продуктами метаболизма диабенола.

Полученные данные позволяют нам предположить, что в элиминации диабенола из организма большую роль играют процессы метаболизма препарата, происходящие в печени, которые преобладают над процессами экскреции неизмененного диабенола с мочой и калом.

*Таблица 13.1*

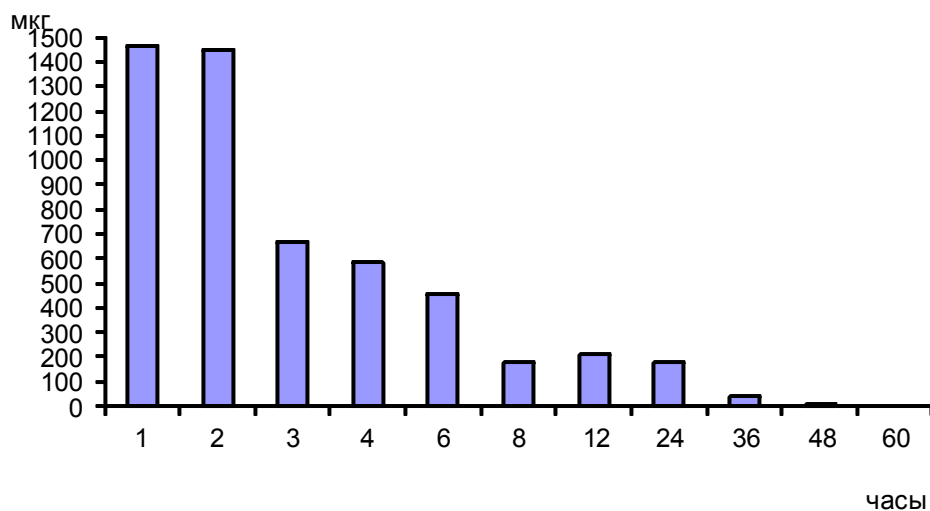
**Фармакокинетические параметры препарата диабенол в плазме и цельной крови крыс (25мг/кг, внутривенно)**

Параметры	Плазма	Цельная кровь
AUC, мкг/мл*час	38,95	36,845
Ke1, час <sup>-1</sup>	0,26	0,294
T1/2, час	2,68	2,355
MRT, час	5,00	4,429
Cl, мл/час	0,64	0,679
Vd, мл	2,48	2,305

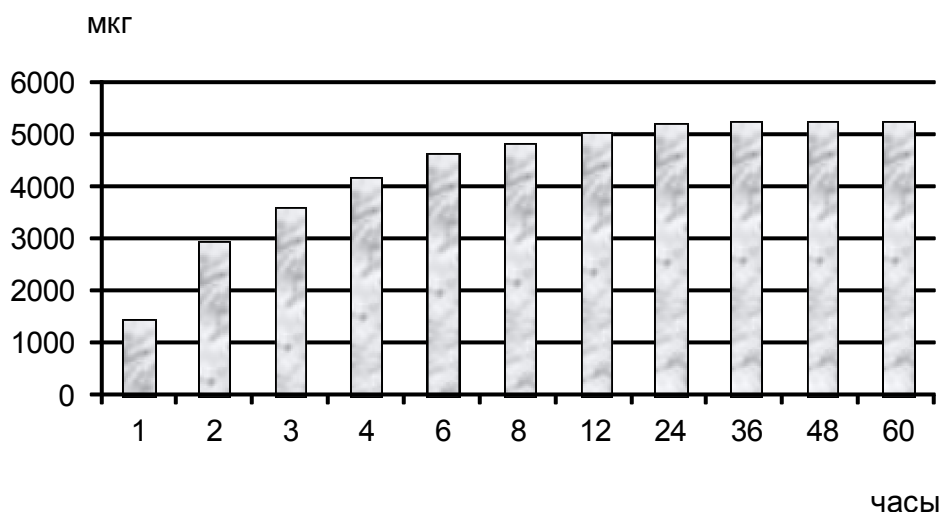
*Таблица 13.2*

**Фармакокинетические параметры распределения препарата диабенол в органах и тканях при внутривенном введении крысам в дозе 25мг/кг**

Органы	AUC мкг/мл*час	Ft	Kd	T max, час	C max, мкг/г
Кровь	38,97	1,0	1,0	0,13	24,61
Жир	80,59	2,07	3,94	0,5	7,03
Мозг	88,91	2,28	3,18	0,13	14,93
Мышцы	94,51	2,43	3,18	0,5	15,19
Сердце	71,02	1,82	2,13	0,13	46,41
Почки	151,42	3,89	5,76	0,13	106,53
Печень	137,24	3,52	6,67	0,25	38,53
Селезенка	381,54	9,79	17,35	0,5	28,79
Легкие	234,79	6,02	10,31	0,13	60,24



**Рис. 13.2. Экскреция препарата диабенол с мочой крыс при внутривенном введении в дозе 25мг/кг (мкг на одну крысу)**

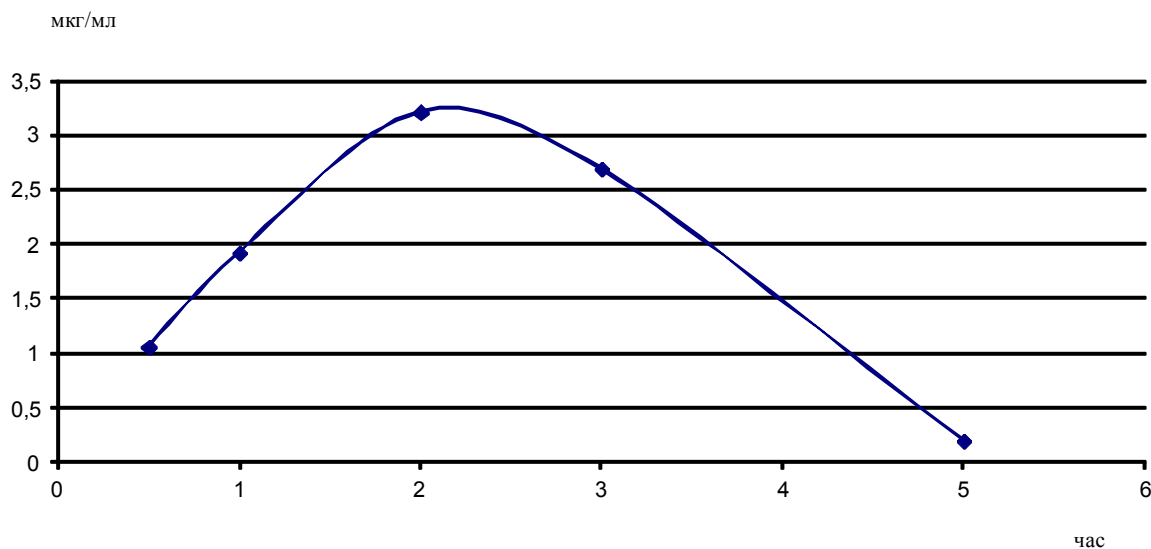


**Рис. 13.3. Кумулятивная экскреция препарата диабенол с мочой крыс при внутривенном введении в дозе 25мг/кг (мкг на одну крысу)**

### **13.2. Фармакокинетика диабенола при пероральном введении**

При изучении фармакокинетической кривой препарата диабенол в крови (рис. 13.4) было установлено, что концентрация диабенола

в крови начинает повышаться через полчаса после введения, достигая максимума ко 2-му часу, затем снижается к 3-му часу. Через 5 часов после введения препарат в крови практически не определяется.



**Рис.13.4. Содержание препарата диабенол в крови крыс при внутрижелудочном введении в дозе 25 мг/кг**

Фармакокинетические параметры диабенола представлены в таблице 13.3. Невысокие величины общего объема распределения и периода полувыведения, скорее всего, объясняются малой степенью распределения в органы и ткани, что подтверждается отсутствием диабенола в них.

Исследуя экскрецию препарата диабенол через почки, было отмечено повышение концентрации его в моче со 2-го по 5-й час, достигая максимума, а затем снижение концентрации к 12-му часу после введения субстанции и к 24-му часу после введения лекарственной формы. Почечный клиренс (Cl<sub>R</sub>) по величине практически совпадает с общим клиренсом, что позволяет сделать выводы об основном пути выведения через почки. На хроматограммах обнаружены дополнительные пики с большим временем удерживания и со значительно большей площадью, чем пик соответствующий стандарту диабенола. В кале диабенол не определялся.

**Фармакокинетические параметры препарата диабенол при внутрижелудочном введении крысам в дозе 25мг/кг**

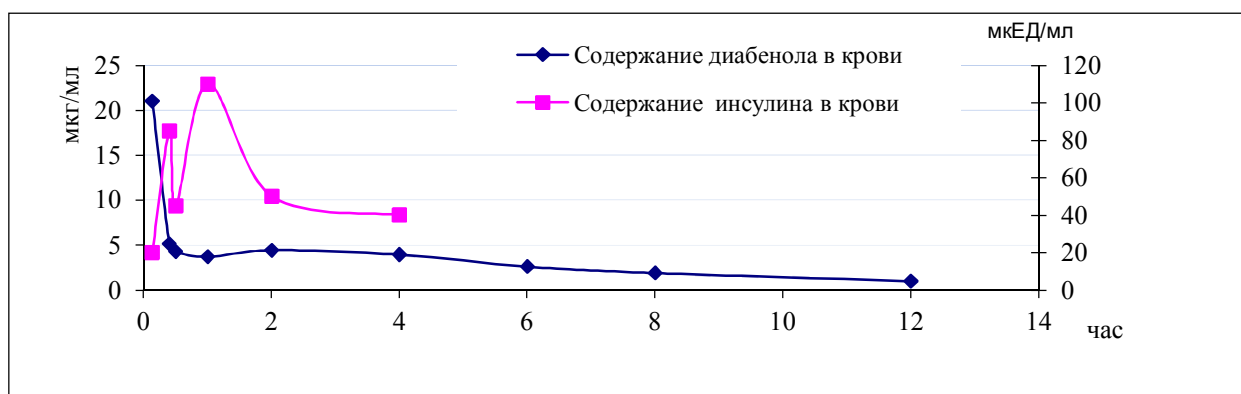
Параметры	Цельная кровь
AUC, мкг/мл*час	5,691
Ke1, час <sup>-1</sup>	0,925
T1/2, час	2,75
MRT, час	2,04
Cl, мл/час	4,23
Vd, мл	4,57
Cl <sub>R</sub> , мл/час	3,98
Cl <sub>NR</sub> , мл/час	0,25

Таким образом, можно предположить, что диабенол выводится из организма в основном через почки, как в неизмененном виде, так и в виде метаболитов.

Абсолютная биодоступность для диабенола составила 15,41 %, что позволяет рекомендовать данное лекарственное вещество для разработки пероральных лекарственных форм.

### **13.3. Зависимость фармакодинамических свойств от фармакокинетических параметров диабенола**

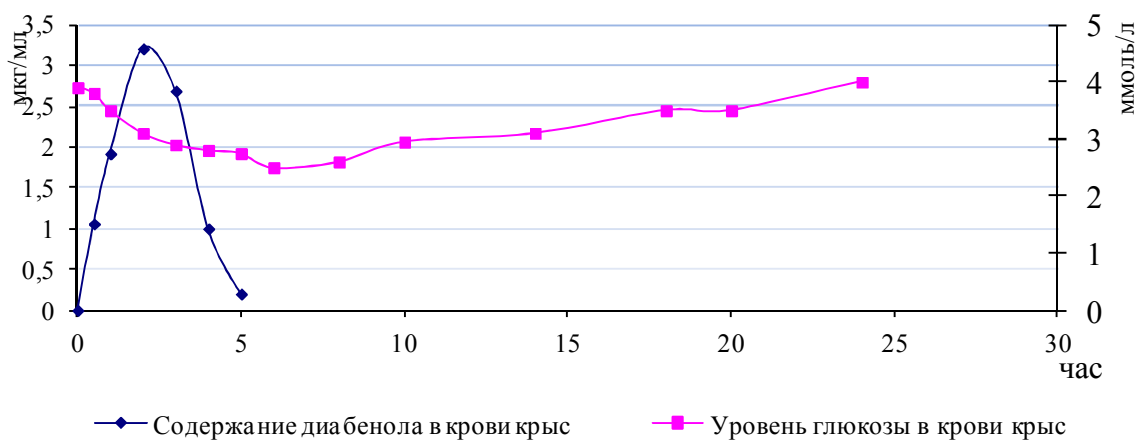
Эксперименты по изучению влияния диабенола при внутривенном введении на секрецию инсулина выполнены на кошках. Было установлено, что диабенол достоверно увеличивал концентрацию инсулина в крови кошек более чем в 4 раза по сравнению с исходным его содержанием, начиная с 10 минуты эксперимента. Увеличенное количество гормона, выделившееся в ответ на введение диабенола, сохранялось до 60 минуты наблюдения с некоторым снижением его на 20 минуте эксперимента. Секреция инсулина под влиянием диабенола носит двухфазный характер (рис. 13.5).



**Рис. 13.5. Зависимость уровня инсулина в крови intactных кошек от содержания диабенола в крови intactных крыс при внутривенном введении в дозе 10 мг/кг. Обозначения: по оси абсцисс – время (часы); по левой оси ординат – концентрация диабенола в крови (мкг/мл); по правой оси ординат – содержание инсулина в крови кошек (мкЕД/мл)**

Сопоставление фармакодинамической и фармакокинетической кривых указывает на отрицательную корреляцию зависимости содержания препарата в крови и секреции инсулина. Коэффициент корреляции составляет  $-0,57$ . Характер фармакокинетических и фармакодинамических кривых позволяет предположить стимулирующий механизм диабенола на I фазу секреции инсулина (рис. 13.6). И хотя нами не изучалось содержание диабенола непосредственно в поджелудочной железе крыс, так как это было связано с техническими и методическими сложностями, но, тем не менее, при изучении распределения диабенола по органам и тканям получены достаточно высокие коэффициенты тканевой биодоступности для селезенки и легких, то есть для органов с высокой степенью васкуляризации. Полученные данные позволяют предположить, что диабенол, скорее всего, будет легко проникать в ткани поджелудочной железы, которые также обладают высокой васкуляризацией. Отрицательная корреляция содержания диабенола в крови и секреции инсулина под-

тверждает предполагаемый в ранних исследованиях рецепторный механизм действия диабенола.



**Рис. 13.6. Зависимость уровня глюкозы от содержания диабенола в крови интактных крыс при пероральном введении в дозе 25 мг/кг. Обозначения: по оси абсцисс – время (часы); по левой оси ординат – содержание глюкозы в крови (ммоль/л); по правой оси ординат – концентрация диабенола в крови (мкг/мл)**

Повышением секреции инсулина обусловлен и гипогликемический эффект диабенола. Влияние диабенола на содержание глюкозы в крови изучалось у интактных крыс при внутрижелудочном введении в дозе 25 мг/кг [Дудченко Г.П., 1989]. При сопоставлении фармакокинетической и фармакодинамической кривых не установлено прямой корреляции, так как максимальное содержание диабенола в крови совпадает с максимальным снижением содержания глюкозы в крови крыс (рис. 13.5). Установлена отрицательная корреляция, коэффициент корреляции составляет – 0,259.

Как видно из рисунка, содержание диабенола в крови после достижения максимума достаточно быстро снижается и через 5 часов после введения становится ниже порога определения. Уровень глюкозы в крови при этом продолжает оставаться ниже исходного на протяжении 20–22 часов после введения диабенола.



Таким образом, в результате фармакокинетических и фармакодинамических исследований, можно сделать вывод о том, что диабенол способствует выбросу инсулина в кровь. Далее, подвергаясь биотрансформации и элиминации, диабенол исчезает из крови, а гипогликемический эффект поддерживается за счет выделившегося инсулина [Спасов А.А., 1999].

Подобные механизмы действия лекарственных веществ, по нашему мнению, могут иметь название – «стартерный эффект».

Таким образом, в результате проведенных исследований можно сделать вывод, что для лекарственного средства диабенол при попадании в кровь характерно быстрое снижение концентрации. Рассчитанные фармакокинетические параметры свидетельствуют о невысокой степени распределения диабенола в органы и ткани. Наибольшую тропность диабенол имеет к тканям с высокой степенью васкуляризации. Элиминация диабенола из организма происходит, скорее всего, за счет процессов метаболизма препарата в печени, которые преобладают над процессами экскреции неизмененного диабенола с мочой и калом.

При пероральном введении диабенол быстро попадает в кровь, уровень препарата в органах и тканях находится ниже порога определения. В моче, при условиях хроматографирования стандарта диабенола, определяется несколько метаболитов с большим временем удерживания. Абсолютная биодоступность для диабенола составила 15,41 %, что позволяет рекомендовать данное лекарственное вещество для разработки пероральных лекарственных форм.

Установлена отрицательная корреляция кривых зависимости «концентрация диабенола в крови – содержание инсулина в крови» и «концентрация диабенола в крови – содержание глюкозы в крови». При сопоставлении фармакокинетических и фармакодинамических исследований можно сделать вывод о стимулирующем действии диабенола на секрецию инсулина и увеличении утилизации глюкозы периферическими тканями, что и обуславливает его гипогликемический эффект в течение 24 часов.

### 13.4. Связывание диабенола с сывороточным альбумином

В результате проведенных исследований установлено, что при добавлении диабенола к комплексу «альбумин – зонд» происходит уменьшение флуоресценции в среднем на 26 % или увеличение в среднем на 23 %.

Для диабенола отмечено неконкурентное и конкурентное взаимодействие. Можно предположить, что для данного препарата существует целый регион связывания в молекуле альбумина, характер присоединения к этому региону диабенола зависит от состояния самой молекулы альбумина, и от наличия или отсутствия на молекуле каких-либо лигандов. Следует отметить, что для диабенола не выражена способность связываться с сывороточным альбумином. Всего 12 % от введенного в диализную ячейку диабенола находится в связанном состоянии и 88 % в свободном.

### 13.5. Возможные пути метаболизма диабенола

Расчетная схема метаболизма и оценка констант липофильности и диссоциации диабенола представлены в таблице 13.4. Согласно данному прогнозу, основные пути метаболизма можно подразделить на окислительные и деградационные. Причем окисление возможно путем гидроксирования бензольного кольца как бензимидазольной или имидазобензимидазольной структуры, так и ароматического радикала у 2-го атома углерода. Второй механизм окисления – образование N – оксидов, как по атому азота алифатического радикала в положении N1, так и по атомам азота бензимидазольной или имидазобензимидазольной структуры.

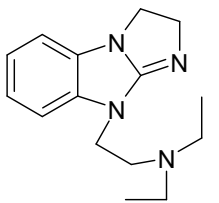
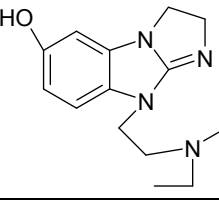
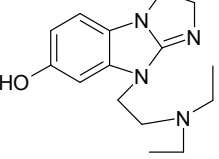
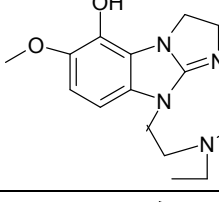
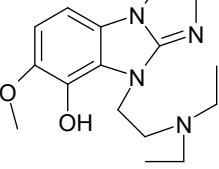
Деструкционные процессы происходят за счет деградации диэтиламиноэтильного радикала или за счет разрыва имидазольного цикла, сопровождающегося образованием N – оксида при метаболиз-

ме диабенола, который является дигидропроизводным имидазобензимидазола.

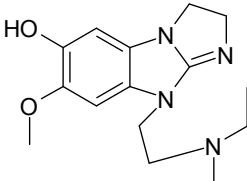
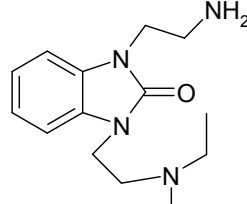
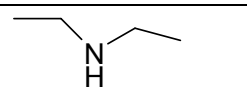
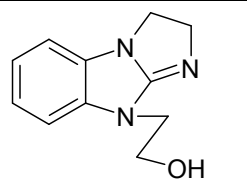
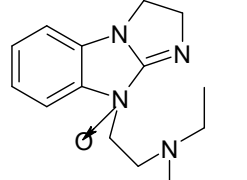
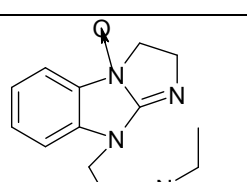
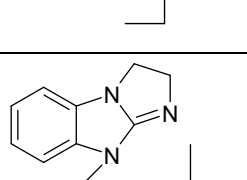
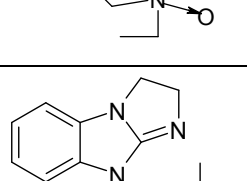
**Образование N – оксидов.** Данный вид биотрансформации характерен для многих лекарственных препаратов в разной степени выраженности, что подтверждается пролонгацией «альпрозоламового сна». Следует отметить, что это наиболее часто встречающийся вид биотрансформации по данным компьютерного прогноза.

Таблица 13.4

**Физико-химические свойства диабенола  
и его возможных метаболитов**

Метаболит	LgP	LgKa	
	2,39	Кислотных групп нет	
		Базисные гр.	10,11
			4,32
	1,82	Кислотные гр.	9,77
		Базисные гр.	10,11
			3,95
	1,82	Кислотные гр.	9,78
		Базисные гр.	10,11
			5,22
	1,69	Кислотные гр.	9,78
		Базисные гр.	10,14
			4,27
	1,69	Кислотные гр.	9,77
		Базисные гр.	10,11
			4,76
			1,87

Окончание таблицы 13.4

Метаболит	LgP	LgKa	
	1,89	Кислотные гр.	9,77
		Базисные гр.	10,11
			4,76
			2,50
	0,47	Кислотных групп нет	
		Базисные гр.	9,26
			9,19
			-4,76
	0,78	Кислотных групп нет	
		Базисные гр.	11,21
	0,88	Кислотные гр.	15,58
		Базисные гр.	4,86
			4,18
			-2,53
	1,93	Кислотных групп нет	
		Базисные гр.	9,83
			3,72
			-2,78
	1,93	Кислотных групп нет	
		Базисные гр.	10,11
			1,32
			-0,08
	2,5	Кислотных групп нет	
		Базисные гр.	4,90
			4,08
	1,64	Кислотных групп нет	
		Базисные гр.	10,75
			4,82
			3,03

### **Постадийная деградация диэтиламиноэтильного радикала.**

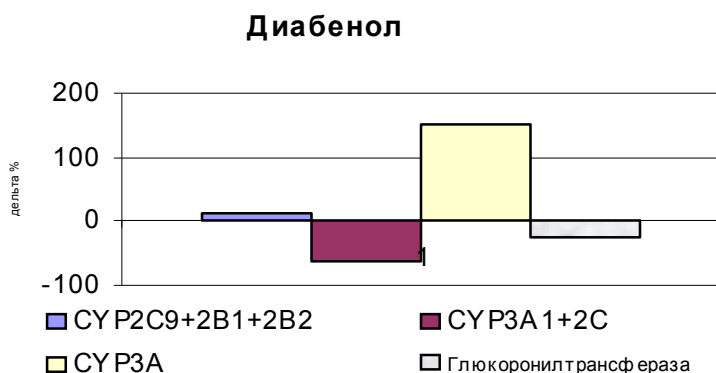
Этот вид метаболизма достаточно выражен для диабенола. Наши предположения строятся в основном на данных хроматографического анализа и расчете изменения физико-химических свойств метаболитов относительно исходного вещества. Подобные изменения незначительно изменяют хроматографические свойства метаболитов, которые с небольшим увеличением времени удерживания будут определяться в одинаковых хроматографических условиях вместе с исходным веществом. Причем их хроматографические свойства относительно друг друга будут достаточно близки.

Данное предположение несколько противоречит компьютерному прогнозу, так как по прогнозу нет метаболита, у которого отсутствуют оба этила в диэтиламиноэтильном радикале. Но на хроматограммах обычно выходят после стандартного вещества два очень близких друг к другу по времени удерживания пика. Таким образом, можно предположить, с определенной долей вероятности, именно постадийную деградацию диэтиламиноэтильного заместителя.

Компьютерный прогноз и результаты хроматографического анализа были подтверждены другими косвенными методами оценки биотрансформации, такими как проведение гидролитических реакций и взаимодействие с тест-субстратами СYP450.

В тесте мидазоламового сна у животных наблюдалось снижение продолжительности сна только на фоне введения диабенола на 64,3 % ( $p \leq 0,05$ ). В тесте альпрозоламового сна при введении диабенола наблюдалась пролонгация сна на 153,1% ( $p \leq 0,05$ ) (рис. 13.7.).

Совокупность всех проведенных косвенных тестов изучения биотрансформации, позволяет сделать вывод о том, что метаболизм диабенола осуществляется, в основном, за счет окислительных реакций, задействуя изоформы СYP3A4 и, скорее всего, способствует индукции изоформы СYP2C.

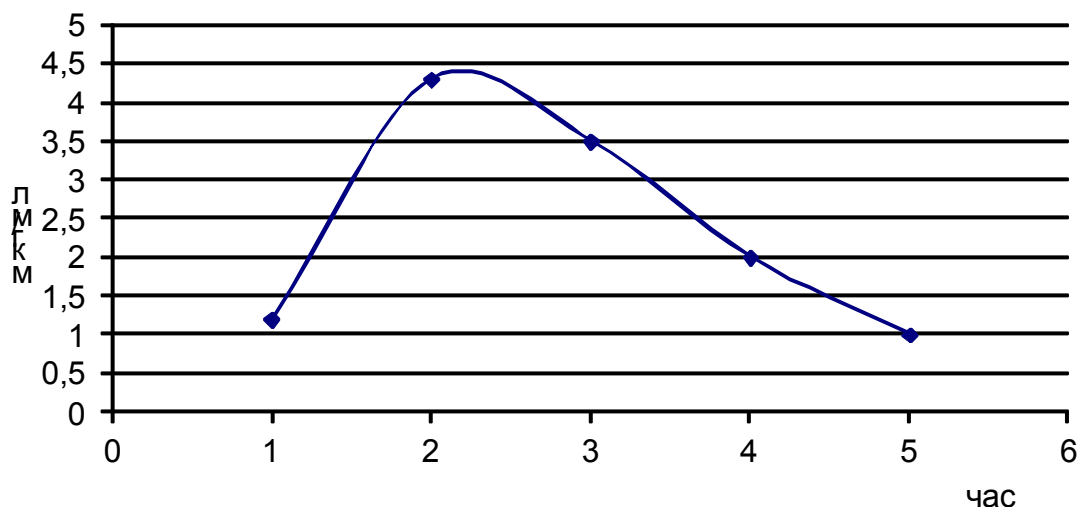


**Рис. 13.7. Влияние диабенола (25 мг/кг, внутрижелудочно) на длительность сна животных, вызванного гексеналом (тест-субстрат CYP2C9+2B1+2B2), мидазоламом (тест-субстрат CYP3A1+2C), альпрозаламом (тест-субстрат CYP3A) и хлоралгидратом (тест-субстрат глюкоронилтрансферазы)**

### **13.6. Токсико-кинетические параметры лекарственного средства диабенол**

В результате проведенных исследований были определены токсикокинетические параметры препарата диабенола в крови и моче. При изучении токсикокинетической кривой препарата в крови (рис. 13.8) было установлено, что препарат обнаруживается в крови через 1 час после введения. Ко второму часу концентрация препарата в крови достигает максимального значения и выходит на плато. По истечении 3,5 часов после введения концентрация препарата резко снижалась, и к пятому часу препарат в крови не обнаруживался. Сравнивая полученные данные с приведенными ранее результатами по изучению фармакокинетической кривой дибазола в дозе 25 мг/кг, можно сказать, что в токсической дозе препарат на 30 минут позже

определяется в крови, но пик его концентрации в крови и время, когда препарат уже в крови не определялся, одинаковы для обеих доз.



**Рис. 13.8. Содержание препарата диабенол в крови крыс при пероральном введении в дозе 250 мг/кг**

При исследовании токсикокинетики величина площади под фармакокинетической кривой составила  $AUC=9,67$  мкг/мл/час. Площадь фармакокинетической кривой субстанции препарата диабенол (доза 25 мг/кг) составила 5,691 мкг/мл/час, что в 1,5 раза меньше. Это, по-видимому, связано с разницей в изучаемых дозах препарата. Среднее время пребывания в организме молекулы препарата (MRT) при изучении токсикокинетики составил 2,48 часа, что соответствует полученным данным по изучению терапевтической дозы. При изучении фармакокинетики эта величина составляла 2,04 часа. Кажущийся (общий) клиренс отражает скорость освобождения единицы объема крови от препарата в результате экскреции и составляет 25,85 (мл/час). Кажущийся клиренс при изучении терапевтической дозы препарата составил 4,23 мл/час. Увеличение данного показателя в 6 раз связано с увеличением в 10 раз изучаемой дозы.

Стационарный объём распределения, отражающий степень проникновения лекарственного вещества в ткани организма  $V_{ss} = 64,12$  мл. При изучении фармакокинетики препарата диабенол этот показатель равнялся 8,06 мл, то есть в 8 раз меньше. Полученное различие связано с разницей в значении клиренса. Продолжительность периода полувыведения, отражающая время, в течение которого концентрация вещества снижается вдвое при введении в токсической дозе:  $T_{1/2} = 3,67$  часа. Токсикокинетические параметры препарата диабенол представлены в таблице 13.5.

Таблица 13.5

**Фармако- и токсикокинетические параметры препарата диабенол при пероральном введении в дозе 25 и 250 мг/кг**

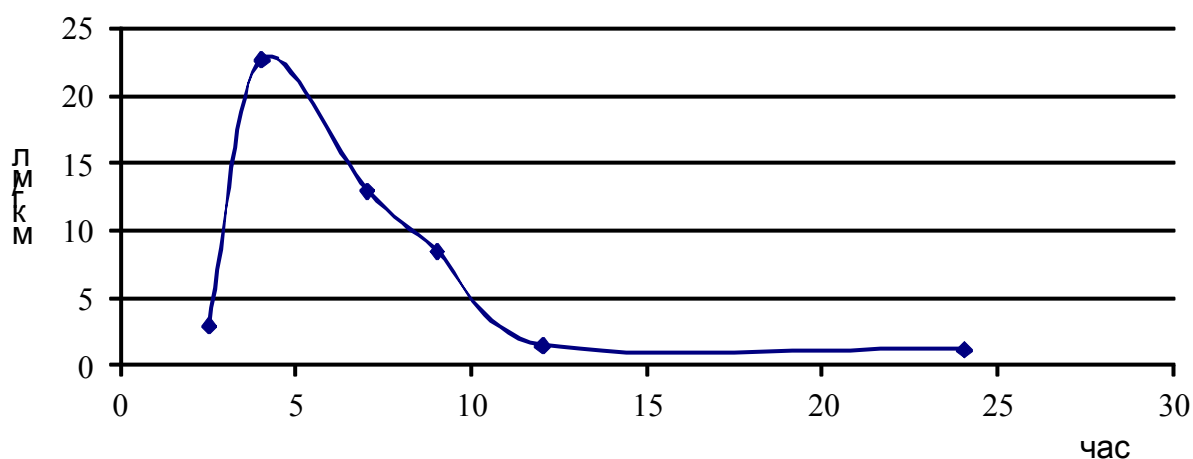
Параметры	Доза, мг/кг	
	25	250
AUC, (мкг/мл) час	5,69	9,67
$T_{1/2}$ , час	2,75	3,67
$K_{el}$ , час <sup>-1</sup>	0,93	0,69
$Cl_{EV}$ , мл/час	4,23	25,85
MRT, час	2,04	2,48
$Cl_R$ , мл/час	3,98	4,77
$Cl_{NR}$ , мл/час	0,25	21,08

Исследуя элиминацию препарата диабенол с мочой (рис. 13.9.) было установлено, что содержание препарата в моче нарастает со второго по четвёртый час, достигает на четвертом часу максимального значения, а затем резко снижается. По истечении 12 часов после введения, препарат в моче не определяется. Аналогичная кривая была получена и при исследовании экскреции препарата диабенол через почки в фармакокинетических исследованиях с той лишь разницей, что при изучении токсикокинетики максимум приходится не на пятый, а на четвертый час.



При исследовании экскреции лекарственного вещества с мочой оценивали почечный клиренс, определяемый отношением кумулятивной экскреции препарата с мочой к AUC препарата в крови:  $ClR = 4,77$  мл/час. Данная величина соответствует полученным данным при изучении фармакокинетики препарата диабенол (3,98 мл/час).

Внепочечный клиренс оценивался по разности между кажущимся и почечным клиренсом и составил  $ClNR = 21,08$  мл/час. При изучении фармакокинетики данное значение равнялось 0,25 мл/час. Такая большая разница в полученных значениях внепочечного клиренса объясняется большим различием величин кажущегося клиренса.



**Рис. 13.9. Содержание препарата диабенол в моче крыс при пероральном введении в дозе 250 мг/кг**

При изучении распределения диабенола по органам и тканям установлено, что препарат в органах и тканях не обнаруживается. В кале препарат также не был обнаружен.

В результате проведенных исследований было установлено, что препарат диабенол в токсической дозе всасывается в кровь примерно через час после поступления в организм, достигая максимума на 2 часу после введения. Снижение концентрации препарата происходит к 5-му часу. Через 2 часа после введения диабенола, по достижении максимальной концентрации в крови, начинается его элиминация че-

рез почки. При этом максимум приходится на 4 часа, через 12 часов после введения диабенол в моче не определяется.

Выявленные некоторые различия между фармакокинетической и токсикокинетической кривыми можно объяснить увеличением в 10 раз исследуемой дозы. Этой особенностью и объясняется разница некоторых фармакокинетических параметров диабенола, таких как кажущийся и внепочечный клиренсы, стационарный объем распределения.

На основании приведенных данных можно сказать, что при изучении токсикокинетики препарата диабенол, несмотря на различие в некоторых параметрах, характер фармакокинетической кривой не изменился.

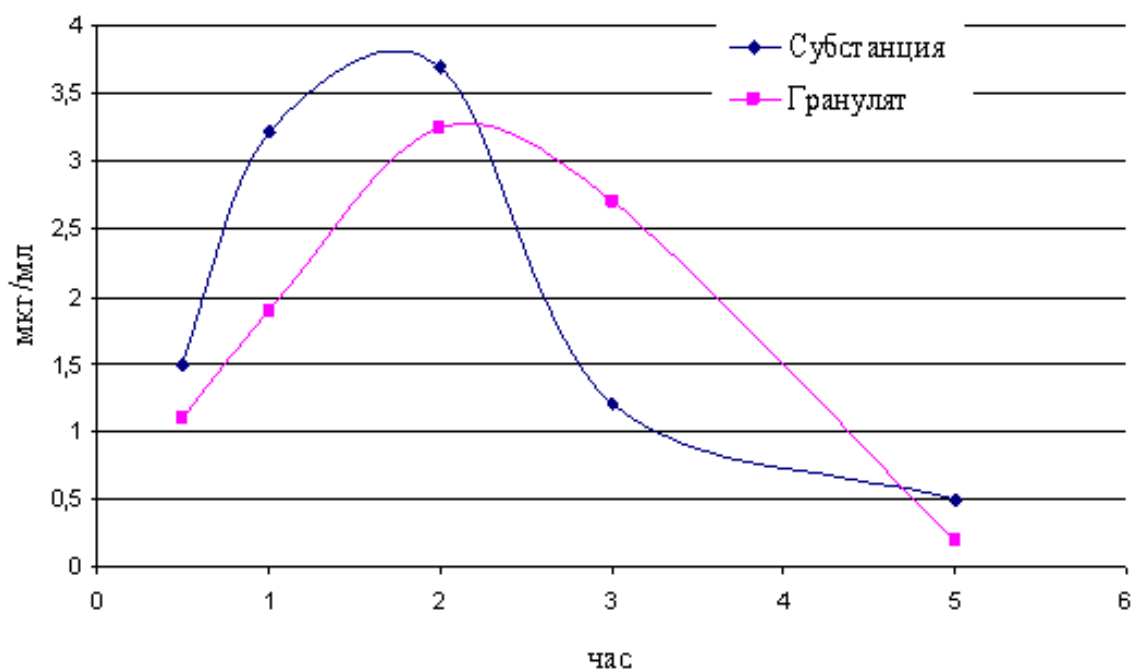
Таким образом, препарат диабенол ни в терапевтических, ни в токсических дозах не проникал в органы и ткани, но в течение 3,5 ч в достаточно высоких концентрациях определялся в крови. Через 5 ч после введения препарат в крови не определяется. При изучении экскреции диабенола установлено его полное удаление через 12 ч из организма через почки, независимо от вводимой дозы.

По данным острой токсичности диабенол можно отнести к малотоксичным веществам, при исследовании кумуляции в высоких дозах обнаружено нарастание токсических эффектов. При 6-месячной хронической токсичности для диабенола не отмечено каких-либо очевидных тенденций в изменении лабораторных тестов при его назначении в терапевтических дозах. При введении диабенола в токсических дозах отмечалось ухудшение функции печени (удлинение «гексеналового сна» и замедление выведения бромсульфолеина), а также происходили изменения гистологического строения почечной ткани. Также выявлено его неблагоприятное влияние на почки [Дудченко Г.П., 2001].

Таким образом, воздействие диабенола в токсических дозах на печень и почки объясняет значительное изменение токсикокинетических параметров по сравнению с фармакокинетическими. В основном увеличивается внепочечный клиренс, что вызывается, скорее всего, нарушениями процессов биотрансформации и выведения.

## 13.7. Биофармацевтическое исследование гранулята диабенола

Фармакокинетическая кривая при изучении гранулята таблеток препарата диабенол имеет аналогичный вид по сравнению с кинетической кривой при введении субстанции, с той лишь разницей, что снижение концентрации происходит не к 3-му, а к 5-му часу (рис.13.10). Следует отметить, что при введении субстанции несколько быстрее достигается максимальная концентрация в крови. Значение максимальной концентрации при введении субстанции и гранулята отличаются в пределах ошибки измерения. При введении гранулята таблеток наблюдается увеличение циркуляции диабенола в крови крыс, сопровождающееся невысоким увеличением периода полувыведения, времени пребывания молекулы препарата в организме (MRT), снижением общего клиренса на 21,4 %. Фармакокинетические параметры субстанции и гранулята диабенола представлены в таблице 13.6. Достоверных различий в изменении фармакокинетических параметров не наблюдается. Относительная биодоступность гранулята по отношению к раствору субстанции составляет 127,02 %



**Рис. 13.10. Содержание препарата диабенол в крови крыс при пероральном введении гранулята таблеток по сравнению с субстанцией**

*Таблица 13.6*

**Фармакокинетические параметры препарата диабенол (при пероральном введении в дозе 25 мг/кг)**

Диабенол	AUC, (мкг/мл) час	T <sub>1/2</sub> , час	Kel, час <sup>-1</sup>	Cl, мл/час	MRT, час
Субстанция	10,29	1,58	0,44	2,43	2,33
Лекарственная форма	13,07	1,63	0,42	1,91	3,03

Таким образом, можно сделать вывод о биоэквивалентности гранулята таблеток диабенола по отношению к субстанции, и предположить небольшую пролонгацию терапевтического эффекта диабенола в лекарственной форме, связанную с уменьшением клиренса и увеличением периода полувыведения.

## 13.8. Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования были установлены закономерности всасывания, распределения, биотрансформации и выведения диабенола в организме крыс при внутрисосудистом и пероральном введении.

Значения периода полувыведения и среднего времени удерживания в организме одной молекулы вещества свидетельствуют о его способности достаточно быстро подвергаться процессам элиминации. Величина стационарного объема распределения доказывает способность соединения интенсивно проникать в органы и ткани животных. Анализ распределения диабенола позволяет сделать вывод, что его концентрация в тканях превышает его содержание в плазме крови в несколько раз. При этом отмечается четкая зависимость между содержанием соединения и уровнем органного кровотока: наибольшие количества определяются в органах с сильной васкуляризацией – легких, селезенке, сердце. Также высокие концентрации отмечаются в печени и почках, что свидетельствует об интенсивных процессах элиминации вещества.

Преобладание внепочечного клиренса над почечным, выведение незначительного количества неизмененного соединения с мочой и калом позволяют предположить, что в элиминации диабенола большую роль играют процессы метаболизма соединения, происходящие в печени, которые преобладают над процессами экскреции неизмененного диабенола с мочой и калом. Это предположение подтверждается тем, что на хроматограммах обнаружены дополнительные пики, которые возможно являются продуктами метаболизма исследуемого соединения.

## ГЛАВА 14

### ВЛИЯНИЕ ДИАБЕНОЛА НА КАНЦЕРОГЕНЕЗ

*В. Н. Анисимов, М. А. Забежинский, И. Г. Попович,  
И. Н. Алимова, П. А. Егормин, А. А. Спасов*

---

Важнейшим требованием к любому фармацевтическому препарату является его безопасность при применении. Подобный подход диктует необходимость проведения предклинических испытаний токсичности препарата на животных. В соответствии с международными требованиями Фармкомитет РФ разработал инструкции по проведению отдельных видов предклинических испытаний (Пылев Л.Н., 2000). Одним из наиболее важных в этом комплексе биотестов является изучение возможной канцерогенности препаратов.

Обычно при проведении тестирования химических веществ на канцерогенность проводятся хронические исследования с длительным введением испытуемых агентов грызунам (в основном, низкоракowym) и наблюдением в течение всей продолжительности жизни [Методические указания, 2000]. Подобное исследование является трудоемким, длительным и требует значительных финансовых расходов. В связи с этим в последние десятилетия разрабатываются различные краткосрочные тесты на канцерогенность [Montesano, 1986]. Среди них перспективными являются исследования канцерогенности на трансгенных животных с повышенной предрасположенностью к развитию опухолей. Одной из таких линий является линия трансгенных мышей, несущих ген рака молочной железы HER-2/neu. Эти животные предрасположены к развитию рака молочных желез, причем опухоли у них развиваются с высокой частотой и в ранние сроки [Аниси-

мов, 2001]. Таким образом, при испытании канцерогенности целесообразно комбинировать длительные хронические опыты на низкоракковых животных с опытами меньшей продолжительности на высоко-раковых, в особенности, трансгенных животных.

Основной целью данного исследования являлось изучение канцерогенных свойств нового антидиабетического препарата диабенол. Следует отметить, что антидиабетические препараты представляются перспективными не только в плане лечения больных диабетом, но и для терапии онкологических больных и профилактики рака. Дело в том, что у онкологических больных часто наблюдаются изменения жирового обмена и иммунодепрессия, способствующие развитию рака и объединяемые в синдром «канкрофилии» [Oilman V.M., 1978]. Показано, что антидиабетические бигуаниды устраняют метаболическую иммунодепрессию у онкологических больных, ослабляют проявления опухолевого процесса и увеличивают 5-летнюю выживаемость [Дильман В.М., 1987; Дильман В.М., 1975; Oilman V.M., 1994]. В экспериментальных исследованиях показано, что антидиабетические бигуаниды фенформин и буформин устраняют метаболическую иммунодепрессию при введении канцерогенов, увеличивают продолжительность жизни и тормозят развитие спонтанных и индуцированных опухолей у мышей и крыс [Анисимов В.Н., 1982; Дильман В.М., 1977; Anisimov V.N., 1987, 2001, 2003; Oilman V.M., 1979, 1980]. В частности, буформин и фенформин тормозили индукцию опухолей молочных желез канцерогеном 7,12-диметилбенз(а)антраценом и развитие рака толстой кишки, вызванного 1,2-диметилгидразином у крыс [Анисимов В.Н., 1980; 1980а; Dilmann V.M., 1978]. С учетом выявленных свойств антидиабетических препаратов, обоснованным представляется изучение, наряду с канцерогенностью, потенциального антиканцерогенного и геропротекторного эффекта диабенола.

В целом, на основании проведенного анализа состояния проблемы, целью данного исследования явилось изучение канцероген-

ности диабенола и его возможного геропротекторного и антиканцерогенного эффектов в опытах на низкоракowych и трансгенных мышах и крысах.

Опыты проведены на 100 аутбредных мышах-самках NMRI 3-месячного возраста, 57 мышах-самках HER-2/neu 2-месячного возраста, и 39 крысах-самках ЛИО 3-месячного возраста.

В опытах использовали только самок, поскольку из-за агрессивности самцов при групповом содержании может наблюдаться их ранняя гибель. Животные содержались в стандартных пластмассовых клетках (мыши по 5–7 особей, крысы – по 5 особей) при температуре 21–23 ПС и световом режиме 12 ч – свет/12 ч – темнота. Мыши получали стандартный гранулированный полнорационный корм производства агрофирмы «Волосово» и водопроводную воду без ограничения. Все животные поддерживались в виде собственной разводки в виварии НИИ онкологии им. проф. Н.Н.Петрова.

Аутбредные мыши NMRI впервые были получены в США и относятся к низкоракowym животным, онкологическая характеристика которых в значительной степени изучена [Bombard, 1989]. Данная линия животных была выбрана для эксперимента как типичная низкораковая с достаточно изученной характеристикой спонтанных опухолей. Последнее является необходимым условием для выявления канцерогенных (или антиканцерогенных) свойств тестируемых препаратов.

Использованные в экспериментальных исследованиях самки мышей линии FVB/N, несущих ген рака молочной железы человека HER-2/neu, были получены из Итальянского Национального исследовательского центра старения (г. Анкона) и поддерживались в виде разводки в отделе канцерогенеза и онкогеронтологии. Их онкологическая характеристика, свидетельствующая о высокой предрасположенности к развитию рака молочных желез, была изучена нами в серии хронических опытов [Анисимов, 2001]. Мышей этой линии выбрали для эксперимента в связи с тем, что антидиабетические средства, как указывалось выше, могут тормозить возникновение и развитие рака молочных



желез. Таким образом, на этой модели можно было изучать как возможный канцерогенный, так и антиканцерогенный эффект диабенола.

Кроме того, были использованы самки крыс ЛИО (первоначальная разводка Ленинградского института онкологии). Динамика развития спонтанных опухолей у этих животных была изучена нами ранее [Anisimov, 1989]. Крысы были использованы для изучения влияния Диабенола на канцерогенез толстой кишки, вызванный 1,2-диметилгидразином, поскольку было показано, что антидиабетический препарат фенформин тормозит на этой модели развитие опухолей [Анисимов, 1980в].

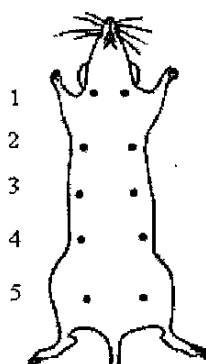
При проведении исследований была использована субстанция препарата диабенол (PY-254). В опытах на крысах с изучением канцерогенеза толстой кишки использовался 1,2-диметилгидразин дигидрохлорид (ДМГ) (Sigma, США). В соответствии с задачами работы было проведено 3 серии экспериментов с использованием препарата диабенол.

Учитывая легкую растворимость диабенола в воде и его всасывание в желудочно-кишечном тракте, для данного экспериментального исследования был выбран путь введения препарата животным с питьевой водой. Такой метод введения, адекватный клиническому применению, обеспечивал постоянную экспозицию животных к исследуемому соединению и возможность учета дозировки при регистрации количества выпиваемой воды. Следует отметить, что пероральный метод введения считается наиболее оптимальным при исследовании возможных канцерогенных свойств химических соединений [Montesano, 1986].

Для проведения опытов на животных было решено использовать терапевтическую дозу препарата 10 мг/кг массы тела. В предварительных опытах с учетом количества выпиваемой животными воды было показано, что подобная дозировка обеспечивается при введении препарата животным с питьевой водой в концентрации 0,1 мг/мл. Свежеприготовленный раствор разливали в поилки (бутылочки из темного стекла для избежания фотолиза), раствор меняли через день.

В 1-й серии опытов изучали влияние диабенола на продолжительность жизни и развитие спонтанных опухолей у мышей NMRI. 50 подопытным самкам мышей, начиная с 3-мес. возраста, 5 дней в неделю с питьевой водой вводили препарат диабенол в концентрации 0,1 мг/мл, тогда как 50 самок мышей этой же линии, не подвергающиеся никаким специальным воздействиям, составили контрольную группу.

За животными вели наблюдение на протяжении всей жизни (эвтаназии путем шейной дислокации подвергали животных только в состоянии крайней слабости). Еженедельно животных пальпировали для выявления опухолей молочной железы, локализацию и размеры которых регистрировали на специальной схеме (рис.14.1).



**Рис. 14.1. Схема с расположением 5 пар молочных желез, на которой отмечалось возникновение опухолей**

Для изучения биомаркеров гомеостаза и старения, животных регулярно взвешивали, оценивали количество поглощенного корма и потребленной воды, исследовали эстральную функцию, измеряли температуру тела. Регистрировали сроки гибели животных. Павших и убитых животных вскрывали и подвергали полной аутопсии с последующим гистологическим исследованием.

Во 2-й серии опытов изучали влияние диабенола на продолжительность жизни и развитие спонтанных опухолей у самок трансгенных мышей HER-2/neu. 28 подопытным самкам, начиная с 2-мес. возраста, 5 дней в неделю с питьевой водой вводили препарат диабенол

в концентрации 0,1 мг/мл. 29 самок мышей этой же линии, не подвергавшиеся никаким специальным воздействиям, служили контролем. За мышами вели наблюдение на протяжении жизни с регистрацией тех же параметров, как и в 1-й серии опытов. Полученный материал подвергали морфологическому исследованию.

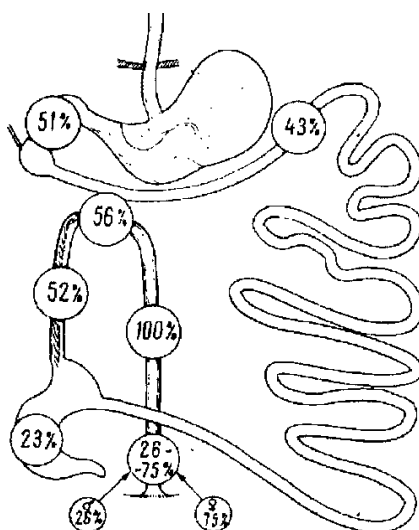
В 3-й серии опытов изучали антиканцерогенную активность Диабенола на модели индуцируемого ДМГ канцерогенеза толстой кишки у крыс. Эта модель широко используется в экспериментально-онкологических исследованиях в связи с тем, что возникающие опухоли по своей морфологии сходны с аналогичными новообразованиями у человека [Pozharisski., 1990, 1979). Однако, при использовании традиционного метода индукции рака толстой кишки длительным введением ДМГ в дозе 21 мг/кг один раз в неделю, у крыс через 6 мес. опыта развивались не только опухоли толстой кишки, но и новообразования тонкой кишки, наблюдались патологические изменения в печени. Нами показано, что селективная индукция новообразований толстой кишки достигается при условии 5-кратного введения канцерогена в дозе 21 мг/кг [Anisimov, 1997]. Такая схема введения была использована в данном исследовании.

39 самкам крыс ЛИО весом 120–140 г 5 раз с недельными интервалами подкожно ввели 1,2-диметилгидразин дигидрохлорид в разовой дозе 21 мг/кг (в расчете на основание). Непосредственно перед введением, канцероген растворяли в дистиллированной воде и нейтрализовали бикарбонатом натрия до рН 7,0.

20 подопытным животным, начиная с 1 -го дня введения канцерогена, 5 дней в неделю с питьевой водой вводился диабенол в концентрации 0,1 мг/мл. 19 контрольных крыс получали чистую водопроводную воду.

Всех крыс убили через 26 недель (6 мес.) после начала опыта. Животных подвергали полной аутопсии. Локализацию и размеры выявленных опухолей кишечника регистрировали на специальных схемах, впервые разработанных К.М. Пожарисским (рис.14.2.).

На аутопсии у мышей и крыс осматривали также кожу и все внутренние органы. Выявленные новообразования классифицировали согласно рекомендациям Международного агентства по изучению рака (МАИР) как "фатальные" (то есть послужившие непосредственной причиной гибели животных) или как "случайные" (в случаях, когда животное погибло от других причин) [Gart J.J., 1986]. Все опухоли и другие патологические изменения, а также основные внутренние органы (печень, почки, селезенку, легкие) вырезали и фиксировали в 10 % нейтральном формалине. После обычной гистологической обработки ткани заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и изучали микроскопически. Использовали гистологические классификации опухолей, предложенные МАИР [Turusov V., 1990; 1994].



**Рис. 14.2. Схема регистрации расположения опухолей кишки у крыс с указанием относительной частоты распределения новообразований в различных отделах кишечника при индукции опухолей большими дозами 1,2-диметилгидразина [Pozharisski, 1990]**

Регистрируемые параметры. Определяли массу тела. Всех животных ежемесячно взвешивали на электронных весах. В каждой груп-

пе находили среднее значение массы животных и ошибки среднего. Одновременно с взвешиванием животных, производили определение суточного количества поглощенного корма. С этой целью, сразу после чистки клеток, в кормушки помещали заранее взвешенное количество корма (100 г) и через сутки определяли количество корма, оставшегося в кормушке. Рассчитывали среднюю массу съеденного корма в граммах на одно животное. Измеряли также количество выпитой воды, наливая в поилки заранее измеренное количество воды и регистрируя объем оставшейся жидкости через сутки.

Эстральная функция – раз в три месяца у животных, в течение 2 недель ежедневно цитологически исследовали содержимое влагалищных мазков. Оценивались следующие параметры эстральной функции: длительность эстрального цикла, соотношение фаз эстрального цикла, рассчитывалось относительное число коротких (менее 5 дней) и длинных (более 7 дней) эстральных циклов, относительное число животных с регулярными циклами.

Известно, что в различные фазы овуляторного цикла у грызунов влагалищное содержимое имеет неодинаковый состав, легко определяемый при микроскопии. Весь овуляторный цикл мыши условно делят на следующие стадии (фазы): 1) диэструс, или стадия покоя; 2) проэструс, или стадия подготовки к течке (предтечка); 3) эструс, или стадия течки; 4) метаэструс, или стадия послетечки. Соответственно этим фазам изменяется и состав влагалищного содержимого (таблица 14.1.).

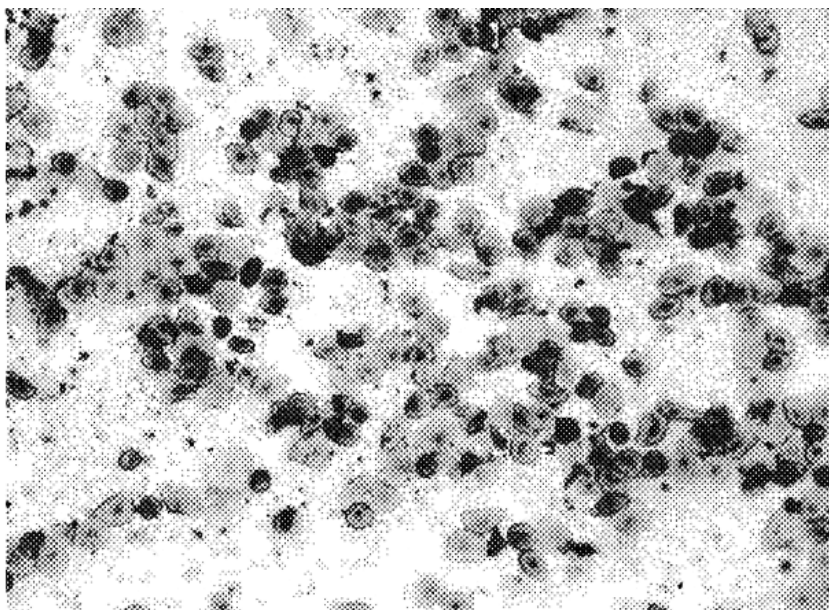
Мазки готовили по обычно принятой методике [Кабак Я.М., 1968] из влагалищного содержимого, полученного всегда утром в одно и то же время посредством введения во влагалище мышей ватного тампончика. Свежеприготовленные мазки без фиксации и окраски сразу же микроскопировали при увеличении в 70 раз (об. 10, ок. 7) и с опущенным конденсором микроскопа. Определение фазы овуляторного цикла проводили в соответствии с общепринятыми

критериями (табл. 14.1, рис. 14.3–14.6). В результатах исследования вагинального содержимого регистрировали дату взятия мазка.

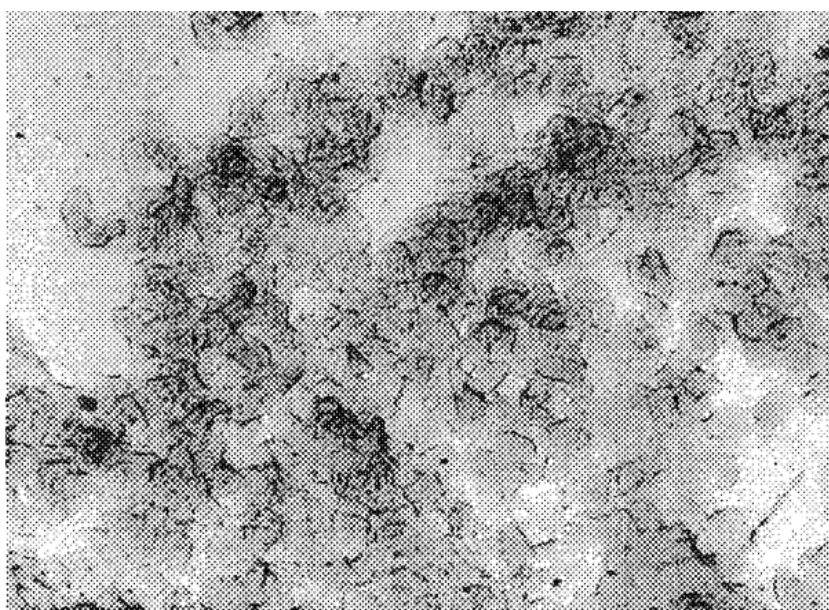
*Таблица 14.1*

**Особенности вагинального содержимого у мыши в зависимости от стадии овуляторного цикла [Кабаку, 1968]**

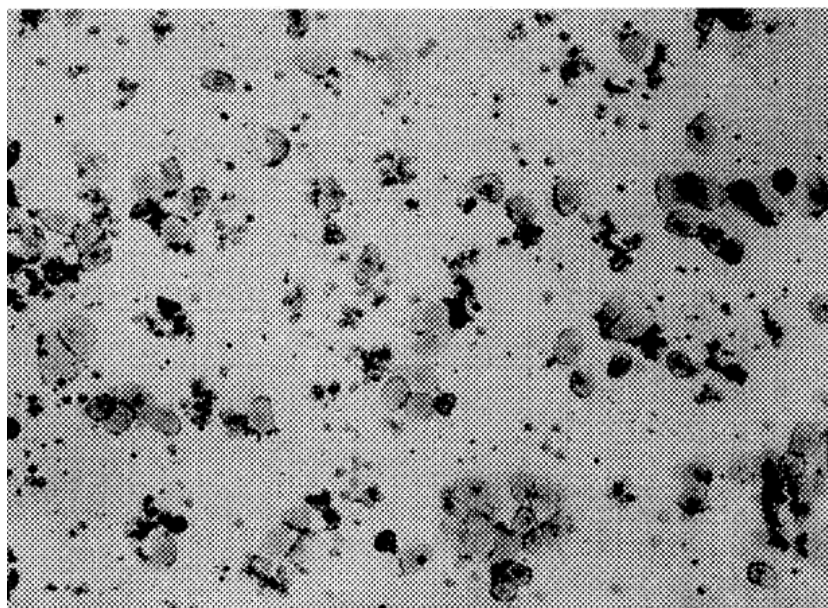
Стадии цикла	Средняя продолжительность цикла	Состав содержимого влагалища
Диэструс	Значительно варьирует, составляя в среднем, около половины всей продолжительности цикла	Значительное количество слизи. Основную массу клеток составляют лейкоциты
Прозэструс	12 часов	Слизь и лейкоциты исчезают, мазок почти исключительно состоит из слущенных эпителиальных клеток стенки влагалища, располагающихся в мазке поодиночке или небольшими группами. Все эпителиальные клетки примерно одинаковой величины, имеют овальную форму. На окрашенном мазке видно, что все они имеют ядра
Эструс	27 часов	В мазке видны только ороговевшие "безъядерные" клетки, имеющие вид чешуек. Лейкоциты и эпителиальные клетки с ядрами отсутствуют. К концу стадии чешуйки образуют хорошо видимые беловатые скопления
Метаэструс	6 часов	Среди массы ороговевших клеток (чешуек) появляются лейкоциты. На короткое время могут появиться и эпителиальные клетки, так что в мазке встречаются все 3 типа клеток (чешуйки, эпителиальные и лейкоциты). Чешуйки постепенно исчезают



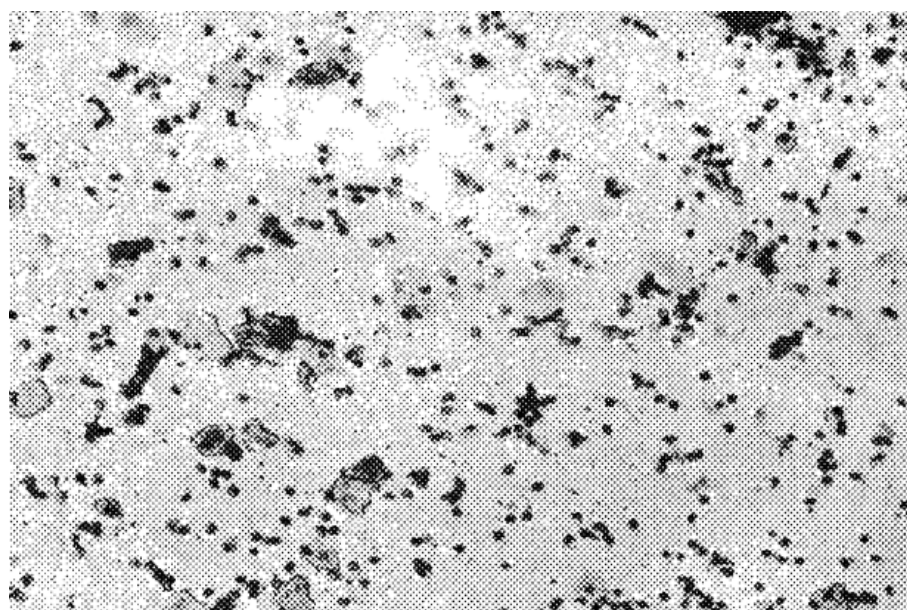
**Рис. 14.3. Микроскопическая картина влагалищного содержимого у мыши в фазе проэструса (предтечки). Характерно наличие клеток с ядрами (Ув. x70)**



**Рис. 14.4. Микроскопическая картина влагалищного содержимого у мыши в фазе эструса (течки). Ороговевшие безъядерные клетки, имеющие вид пластинок или чешуек (Ув. x70)**



**Рис. 14.5. Микроскопическая картина влагалищного содержимого у мыши в фазе метаэструса (послетечки). Различные типы клеток (клетки с ядрами, безъядерные клетки и лейкоциты) в мазке (Ув. х70)**



**Рис. 14.6. Микроскопическая картина влагалищного содержимого у мыши в фазе диэструса (покоя). В мазке преобладают лейкоциты (Ув. х70)**



Измерение температуры тела производили с помощью медицинского электротермометра (ТПЭМ-1). Смазанный глицерином электрод вводили в прямую кишку мышей на глубину 1 см и ждали до момента стабилизации температуры, поскольку вначале, в момент введения детектора, происходила стрессорная гипотермия из-за спазма сосудов. В момент стабилизации производилась регистрация температуры. Регистрация температуры проводилась 1 раз в 3 месяца. Поскольку температура тела может зависеть от фазы астрального цикла, параллельно производилась оценка эстрального цикла с помощью влагалищных мазков.

Показатели продолжительности жизни и скорости старения. Рассчитывали среднюю продолжительность жизни всех животных, а также 10 % максимально проживших мышей; медиану; максимальную продолжительность жизни. При расчете кинетических параметров популяционного старения использовали модель Гомперца для функции выживания:

$$S(x) = \exp\left\{-\frac{\beta}{\alpha}[\exp(\alpha x) - 1]\right\}$$

где параметры  $a$  и  $p$  связаны с популяционной скоростью старения и начальной силой смертности, соответственно. Параметр  $a$  часто характеризуется также величиной времени удвоения силы смертности (mortality rate doubling time, MRDT), рассчитываемой как  $1/p(2)/a$ .

Параметры канцерогенеза. Во всех сериях опытов регистрировали следующие параметры канцерогенеза:

- срок обнаружения первой опухоли,
- средний латентный период,
- суммарную частоту опухолей,
- общее количество опухолей,
- частоту и сроки появления опухолей отдельных локализаций и гистологическую структуру.

Дополнительно у мышей рассчитывали множественность опухолей молочной железы, их средние размеры, частоту и размеры метастазов опухолей в легких, а у крыс – частоту, множественность

и размеры опухолей толстой кишки (суммарно и в различных отделах кишечника), уровень их дифференцировки и глубину инвазии.

При статистической обработке результатов опытов использовали методы вариационной статистики с использованием пакетов статистических программ STATGRAPH, STATISTICA (5.5) и STADIA. Достоверность различий оценивали по критериям t Стьюдента,  $\chi^2$ , Вилкоксона-Манна-Уитни и точному методу Фишера, а также P-value, рекомендованного МАИР [Гублер Е.В., 1978; Gart, 1986].

При анализе скорости старения параметры модели Гомперца определяли по реальным данным, используя метод максимального правдоподобия в приложении для Гауссовских статистических систем [Gauss System..., 1994]. Доверительные интервалы для показателей скорости старения рассчитывали, используя log-подобные функции [Cox, 1994].

#### **14.1. Исследование диабенола на мышах NMRI**

В 1-й серии экспериментов длительное введение препарата в выбранной дозе и режиме не оказывало токсического эффекта. Не обнаружено неблагоприятного воздействия диабенола на состояние животных.

Данные о возрастной динамике массы тела представлены в таблице 14.2. В обеих группах мышей, начиная с 6 месяцев, отмечалось значительное нарастание веса. При этом, статистически достоверных различий в измеряемых показателях у подопытных и контрольных животных отметить не удалось.

При анализе динамики поглощения корма животными (табл. 14.3.) выявлено нарастание с возрастом поглощения пищи. Характер этого нарастания и количество корма в расчете на одно животное в сутки не отличались в контрольной и подопытной группах.

Сведения о потреблении жидкости животными содержатся в таблице 14.4. Из нее видно, что в обеих группах потребление жидкости с 3- до 6-месячного возраста возрастало, затем стабилизирова-

лось и в более позднем возрасте – снижалось. Однако, при всех этих колебаниях, подопытные и контрольные животные одного возраста потребляли, примерно, одинаковое количество жидкости.

*Таблица 14.2*

**Возрастная динамика веса тела мышей линии NMRI,  
получавших и не получавших диабенол**

Показатели	Вес тела (в граммах) в возрасте				
	3 мес.	6 мес.	9 мес.	12 мес.	18 мес.
Контроль	28,4±0,22	27,7±0,30	29,3±0,17	33,4±0,51	33,3±0,55
Диабенол	28,5±0,31	27,9±0,26	28,9±0,21	33,8±0,47	32,9±0,61

*Таблица 14.3*

**Возрастная динамика поглощения корма мышами линии NMRI,  
получавшими и не получавшими диабенол**

Показатели	Количество поглощенного корма (в граммах/мышь/сутки) в возрасте:				
	3 мес.	6 мес.	9 мес.	12 мес.	18 мес.
Контроль	4,9±0,40	5,2±0,41	5,9±0,21	5,8±0,41	5,6±0,23
Диабенол	4,8 ± 0,51	5,1±0,27	5,7 ±0,17	5,5±0,34	5,4±0,16

*Таблица 14.4*

**Возрастная динамика поглощения жидкости мышами линии  
NMRI, получавшими и не получавшими диабенол**

Показатели	Количество поглощенной жидкости (в мл/мышь/сутки) в возрасте:				
	3 мес.	6 мес.	9 мес.	12 мес.	18 мес.
Контроль	4,8±0,41	5,2±0,52	5,3 ±0,23	4,9±0,43	4,3±0,33
Диабенол	4,7 ±0,52	5,0± 0,24	5,2 ±0,43	4,5±0,31	4,0±0,36

Характерные различия между группами выявлены при анализе показателей эстральной функции (табл. 14.5.). У контрольных мышей после 9-месячного возраста отмечалось увеличение продолжительности эстрального цикла, являющееся одним из признаков старения. Подобное увеличение объясняется снижением относительного количества коротких астральных циклов продолжительностью менее 5 суток. До этого периода отмечены небольшие волнообразные колебания этого показателя. У животных, получавших диабенол, также наблюдались подобные волнообразные колебания с минимумом в возрасте 6 месяцев, когда продолжительность эстрального цикла была статистически ниже, чем в возрасте 3 месяца. Следует отметить, что в отличие от контрольных мышей, у подопытных животных не обнаружено возрастное увеличение продолжительности цикла к 12 месяцам. В результате у 12-мес. животных общая продолжительность цикла при введении диабенола была существенно меньшей, чем в интактном контроле. Это свидетельствует о торможении под влиянием диабенола возрастного нарушения эстральной функции. В пользу данного предположения можно привести и различия в таком характерном показателе, как количество мышей с иррегулярными циклами. У контрольных животных с возрастом частота таких циклов возрастала с 6,5 % до 57,9 %. В то же время, при введении Диабенола возрастное нарастание количества иррегулярных циклов резко тормозилось и в 12-мес. возрасте частота иррегулярных циклов была почти в 3 раза меньшей, чем у интактных животных.

Изучение базальной температуры тела является важным интегральным показателем уровня обмена и его изменений при старении. Следует отметить, что в обеих группах с возрастом наблюдалась типичная для старения картина – снижение базальной температуры (таблица 14.6.). При этом значительных различий между группами не выявлено, за исключением показателей у 6-мес. животных, когда в подопытной группе температура тела была статистически досто-

верно ниже, чем в контроле. Возможно, что отмеченные различия носили случайный характер.

Таблица 14.5

**Возрастная динамика показателей эстральной функции у мышей линии NMRI, получавших и не получавших диабенол**

Возраст (мес)	Количество мышей	Продолжительность эстрального цикла, сутки	Относительное количество эстральных циклов (%) с продолжительностью			Количество мышей с регулярным циклом (%)	Количество мышей с иррегуляр. циклом (%)
			<5 суток	5-7 суток	>7 суток		
<b>Контроль</b>							
3	30	6,7±0,28	17,2	44,8	38	93,5	6,5
6	28	6,2±0,34	29,6	44,4	26	90	10
9	19	6,4±0,63	15,8	57,9	26,3	79,2	20,8
12	18	8,0±1,34	12,5	50	37,5	42,1	57,9
<b>Диабенол</b>							
3	30	6,4±0,26	19,4	51,6	29	93,9	6,1
6	26	5,8±0,38#	17,4	65,2	17,4	85,2	14,8
9	22	6,3±0,44	15,8	57,9	26,3	86,4	13,6
12	22	6,1±0,54**	17,6	64,8	17,6	77,3	22,7*

Различие с соответствующим параметром у контрольных мышей того же возраста достоверно: \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  ; # $p < 0,05$  различия достоверны по сравнению с группой диабенол 3 мес.

Таблица 14.6

**Возрастная динамика базальной температуры тела у мышей линии NMRI, получавших и не получавших диабенол**

Показатели	Базальная температура (°C) в возрасте:			
	3 мес.	6 мес.	9 мес.	12 мес.
Контроль	38,6± 0,04	38,6± 0,14	38,0± 0,17	37,9±0,16
Диабенол	38,6± 0,06	38,1± 0,19*	37,8± 0,16	37,9±0,18

\* $p < 0,05$  – различия с контрольной группой статистически достоверны.

Сведения о динамике выживаемости мышей представлены в таблице 14.7. и на рис. 14.7.

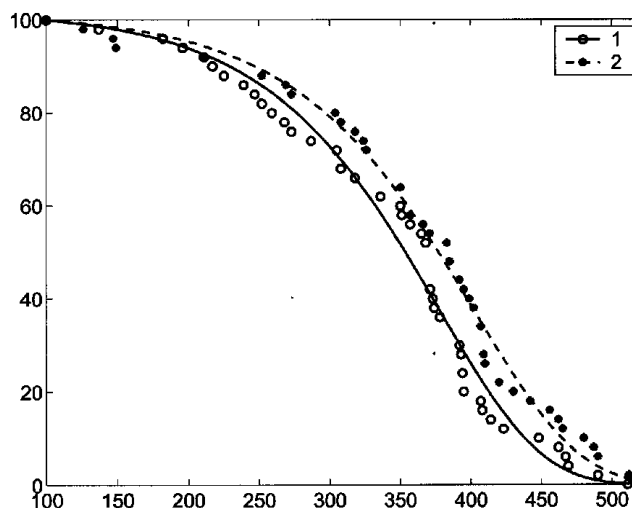
На них видно, что уже начиная с 8-месячного возраста контрольные мыши погибали быстрее, чем животные, получавшие диабенол. Эти различия нарастали, достигая максимума в возрасте 13 мес., когда количество подопытных мышей было статистически выше, чем в контроле.

Таблица 14.7

**Возрастная динамика выживаемости самок мышей NMRI, получавших и не получавших диабенол**

Группа	Возраст, в месяцах												
	4	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	Количество мышей, доживших до указанного периода												
Контроль	50	49	43	38	37	33	28	12	6	5	2	0	0
Диабенол	50	47	46	42	42	36	29	22*	11	9	1	0	0

*Примечание.* Различие с контролем достоверно,  $p < 0,001$ .



**Рис. 14.7.** Динамика гибели мышей NMRI: по оси абсцисс – возраст в сутках; по оси ординат – процент выживших мышей; 1 – контрольная группа; 2 – подопытная группа

Таким образом, диабенол замедлял гибель животных, что отразилось и на показателях продолжительности жизни (таблица 14.8.). Под влиянием диабенола несколько увеличивалась средняя продолжительность жизни и, в особенности, продолжительность жизни последних 10 % мышей, которая возрастала на 5 %. Отмечена также тенденция к увеличению времени удвоения силы смертности. В целом, эти показатели свидетельствуют о геропротекторном эффекте диабенола у мышей NMRI. Одновременно, выявленная закономерность отражает и отсутствие токсического действия диабенола в условиях данного опыта.

Таблица 14.8

**Влияние диабенола на показатели продолжительности жизни у самок мышей линии NMRI**

Показатели	Контроль	Диабенол
Количество мышей	50	50
Средняя продолжительность жизни, сутки (M±ш)	346 ±11,9	369 ± 12,9
Медиана	371	385
Средняя продолжительность жизни 10% максимально проживших мышей, сутки	480 ±9,2	504 ±6,4*
Максимальная продолжительность жизни, сутки	511	518
a (сутки <sup>-1</sup> )	0,0140 (0,0139; 0,0157) <sup>a</sup>	0,0136 (0,0133; 0,0145)
MRDT, сутки	49,62(44,13; 49,85)	51,09(47,94; 51.99)

*Примечание.* Константа a в уравнении Гомепрца:  $R = R_0(\exp)\alpha t$ , где  $R_0$  = смертность во время  $at$   $t = 0$ ; MRDT – время удвоения силы смертности (mortality rate doubling time). a – в скобках – 95% доверительный интервал, различие с контролем достоверно, \*  $p < 0,05$ .

Наблюдение за животными обеих групп показало, что для данной линии мышей разводки вивария НИИ онкологии характерно

развитие, в первую очередь, новообразований молочной железы (таблица 14.9.).

Таблица 14.9

**Влияние диабенола на развитие спонтанных опухолей  
у самок мышей линии NMRI**

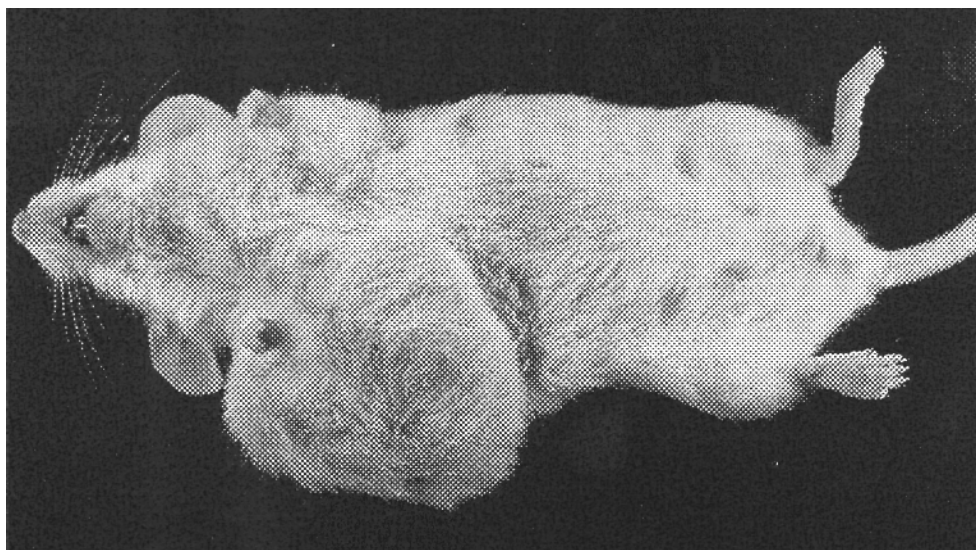
Показатели	Контроль	Диабенол
Количество мышей	50	50
Количество мышей с опухолями (%)	25 (50 %)	17 (34 %)
Количество мышей с ОМЖ (%)	21 (42%)	16 (32%)
Возраст обнаружения 1-й опухоли молочной железы, сутки	176	273
Общее количество ОМЖ	26	21
Множественность ОМЖ (количество ОМЖ/мышь)	1,24 ± 0,1	1,31 ± 0,12
Средний латентный период (СЛП) ОМЖ, сутки	259 ± 13,8	328 ± 12,4**
Максимальный диаметр ОМЖ, см	2,51 ± 0,21	2,5 ± 0,25
Количество мышей с метастазами ОМЖ в легкие, (%)	5 (10 %)	0*
Количество мышей со злокачественными лимфомами	4 (8%)	1 (2%)
СЛП злокачественных лимфом, сутки	349,3±38,3	357

*Примечание.* ОМЖ – опухоль молочной железы.

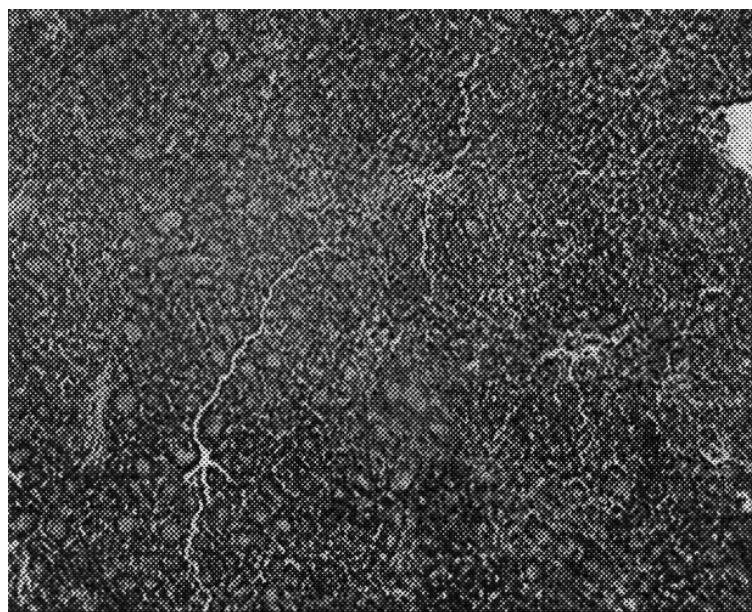
Различие с соответствующим показателем для контрольной группы статистически достоверно, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Эти опухоли имели вид узелков, расположенных под кожей и часто спаянных с кожей и подлежащими тканями (рис. 14.8). В ряде случаев были обнаружены метастазы опухоли молочной железы (ОМЖ) в легких в виде серо-розовых узелков под плеврой. При гистологическом исследовании все опухоли являлись аденокарциномами, большинство имело микроацинарную и микротубулярную структуру и соответствовало аденокарциномам типа А [Turusov, 1994) (рис. 14.9).





**Рис. 14.8. Опухоль молочной железы № 2 справа у контрольной мыши NMRI**



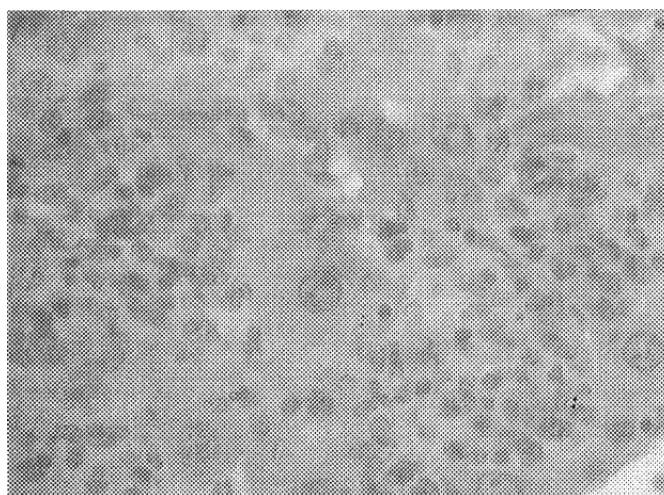
**Рис. 14.9. Опухоль молочной железы у контрольной мыши NMRI. Аденокарцинома типа А с микроацинарной и микротубулярной структурой. Гематоксилин-эозин. Ув. х 200**

Другим типом новообразований явились злокачественные лимфомы. Для этих опухолей было характерным резкое увеличение тимуса (вилочковой железы), периферических лимфатических узлов,

лимфатических узлов грудной и брюшной полости, а также печени и селезенки (рис. 14.10). При микроскопическом анализе отмечена инфильтрация лейкозными клетками внутренних органов, в частности, печени (рис. 14.11).

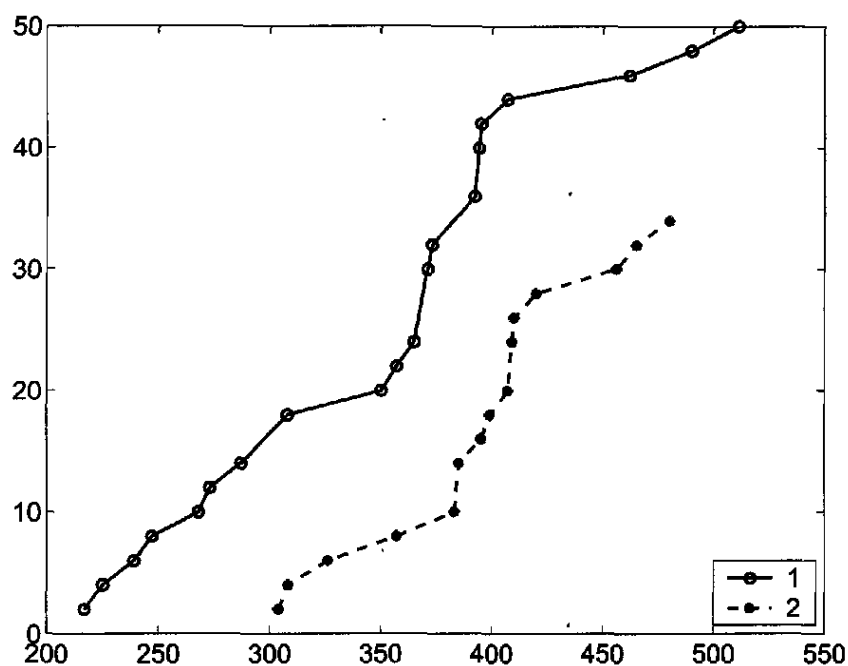


**Рис. 14.10. Злокачественная лимфома у контрольной мыши NMRI со значительным увеличением печени и селезенки**

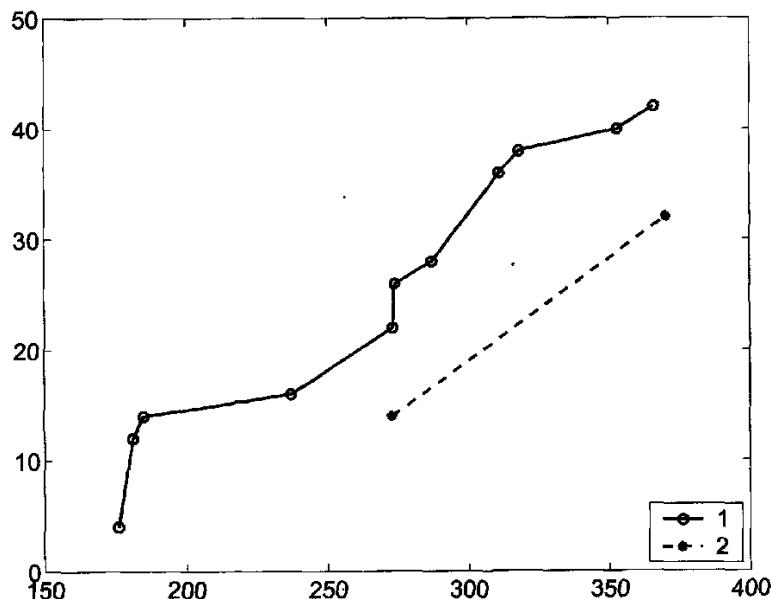


**Рис. 14.11. Злокачественная лимфома у контрольной мыши NMRI Инфильтрация лейкозными клетками ткани печени. Гематоксилин-эозин. Ув. x 440**

Характерно, что первые новообразования были отмечены в контрольной группе (в возрасте 176 дней), тогда как при введении Диабенола – примерно на 100 дней позже. Динамика нарастания общего количества опухолей, а также опухолей молочной железы, представлена на рис. 14.12. и рис. 14.13. Можно видеть, что скорость нарастания частоты опухолей была примерно одинаковой, однако кривая роста при введении диабенола была сдвинута вправо.



**Рис. 14.12. Динамика нарастания частоты опухолей у мышей NMRI с возрастом: по оси абсцисс – возраст в сутках, по оси ординат – частота опухолей (%), 1 – контрольная группа, 2 – подопытная группа**



**Рис. 14.13. Динамика нарастания частоты опухолей молочной железы у мышей NMRI с возрастом: по оси абсцисс – возраст в сутках, по оси ординат – частота опухолей (%); 1 – контрольная группа, 2 – подопытная группа**

Количество мышей со злокачественными лимфомами в подопытной группе было меньшим, чем в контроле, в 4 раза, однако отмеченные различия не достигали уровня статистической достоверности. Сходными были сроки обнаружения этих новообразований (таблица 14.9.).

Из других патологических изменений следует отметить нефрозо-нефрит у стареющих мышей, который выражался макроскопически в сморщивании почек с бугристой поверхностью и иногда наличии мелких кист. При микроскопическом исследовании отмечалось кистозное расширение извитых канальцев, сморщивание клубочков, мелкие очаги интерстициальной инфильтрации ткани лимфоидными клетками. Подобные изменения отмечены у 11 контрольных и 6 подопытных мышей. Второй по частоте патологией явилось увеличение отдельных групп лимфатических узлов. В этих случаях гистологиче-

ски отмечалась гиперплазия лимфатических узлов, однако поражения печени, селезенки, тимуса, почек и легких опухолевыми лимфоцитами выявить не удалось, в связи с чем диагноз злокачественной лимфомы был отвергнут в пользу гиперплазии лимфатических узлов, возможно, предопухолевого характера (учитывая возникновение в отдельных случаях истинных злокачественных лимфом). Среди изменений, носивших единичный характер, следует отметить геморрагические кисты яичников (у двух контрольных мышей), жировую дистрофию печени у одной контрольной мыши, кавернозную ангиому печени у одной подопытной мыши, а также отдельные случаи очаговой пневмонии, сердечной недостаточности с венозным застоем и расширением синусоидов печенит, отека рогов матки. Учитывая, что частота отмеченных патологических изменений у подопытных животных не превышала данные в контроле, а в ряде случаев (нефроз-нефрит и гиперплазия лимфатических узлов) была ниже, чем в контроле, можно сделать вывод о том, что признаков токсического поражения внутренних органов при введении диабенола не выявлено.

Таким образом, в опытах на мышах NMRI было показано, что длительное введение диабенола с питьевой водой в терапевтической дозе не оказывает общетоксического и канцерогенного эффекта, замедляет старение репродуктивной системы, увеличивает продолжительность жизни и тормозит развитие спонтанных опухолей.

## **14.2. Изучение диабенола на мышах HER-2/neu**

Трансгенные мыши охотно пили воду, содержащую диабенол. Каких-либо изменений в состоянии и поведении животных выявлено не было.

Данные по возрастной динамике веса тела, поглощения корма и жидкости мышами HER-2/neu представлены в таблицах 14.10, 14.11 и 14.12. Из них видно, что в к 11-месячному возрасту все эти показате-

тели возрастали по сравнению с 3-месячным возрастом. Ни на одном сроке исследований (3 мес., 6 мес., 9 мес., 11 мес.) каких-либо статистически достоверных различий в массе тела, количестве поглощенного корма и жидкости в подопытной и контрольной группах установить не удалось. Однако можно отметить некоторую тенденцию к уменьшению количества поглощенного корма в группе мышей, получавших диабенол. Возможно, отмеченные различия носили случайный характер, хотя нельзя исключать, что потребляемый препарат вызывал небольшое снижение аппетита.

Анализ возрастной динамики эстральной функции (таблица 14.13.) показал, что общая продолжительность астрального цикла у контрольных мышей возрастала от 2-го к 9-му месяцу жизни, тогда как при введении диабенола этот показатель не увеличивался с возрастом. Таким образом, исследуемый препарат препятствовал возрастным изменениям эстральной функции. В 9-месячном возрасте продолжительность цикла у подопытных мышей была в 1,3 раза меньше, чем в контроле. Такое статистически достоверное укорочение продолжительности эстрального цикла было обусловлено увеличением относительного количества коротких циклов (менее 5 суток) и значительным (в 11,4 раза) снижением относительного количества длинных циклов (более 8 суток).

Другим показателем изменений эстральной функции является нарушение регулярности эстральных циклов. В контроле их частота с возрастом снижалась со 100% до 80,8%. В то же время, под влиянием диабенола частота регулярных циклов сохранялась на высоком уровне, достигая в возрасте 5 месяцев – 90,6%, в 9-месячном возрасте – 100% (различия с контролем статистически достоверны). Соответственно, низкой оставалась частота иррегулярных циклов.

Изучение базальной температуры тела выявило тенденцию к возрастному снижению данного показателя, как у контрольных, так и у подопытных животных. Значительных различий между группами при этом выявить не удалось (табл. 14.14.).

Таблица 14.10

**Возрастная динамика веса тела трансгенных мышей HER-2/neu, получавших и не получавших диабенол**

Показатели	Вес тела (в граммах) в возрасте:			
	3 мес.	6 мес.	9 мес.	11 мес.
Контроль	22,9 ± 0,27	26,7 ± 0,40	32,8 ± 0,99	40,6 ± 2,24
Диабенол	22,8 ± 0,32	26,4 ± 0,38	31,4 ± 0,67	39,5 ± 2,01

Таблица 14.11

**Возрастная динамика поглощения корма трансгенными мышами HER-2/neu, получавшими и не получавшими диабенол**

Показатели	Количество поглощенного корма (в граммах/мышь/сутки) в возрасте:			
	3 мес.	6 мес.	9 мес.	11 мес.
Контроль	3,73 ± 0,58	3,27 ± 0,48	4,20 ± 0,14	4,20 ± 0,24
Диабенол	3,30 ± 0,55	2,63 ± 0,14	3,80 ± 0,51	4,03 ± 0,24

Таблица 14.12

**Возрастная динамика поглощения жидкости трансгенными мышами HER-2/neu, получавшими и не получавшими диабенол**

Показатели	Количество поглощенной воды (в мл/мышь/сутки) в возрасте:			
	3 мес.	6 мес.	9 мес.	11 мес.
Контроль	5,17 ± 0,34	5,67 ± 1,03	4,50 ± 0,51	5,85 ± 0,77
Диабенол	5,15 ± 0,40	5,73 ± 0,45	4,25 ± 0,43	4,15 ± 0,84

**Возрастная динамика показателей эстральной функции  
у трансгенных мышей HER-2/neu,  
получавших и не получавших диабенол**

Возраст (мес.)	Продолжи- тельность эст- рального цикла, сутки	Относительное количество эстральных циклов (%) с продолжительностью:			Количество мышей с регулярным циклом (%)	Количество мы- шей с иррегулярны м циклом (%)
		<5 суток	5-8 су- ток	>8 суток		
Контроль						
2	5,20 ± 0,18	27,5	72,5	0	100	0
5	5,68 ± 0,22	36,4	63,6	0	66,7	33,3
9	6,86 ± 0,40	14,3	57,1	28,6	80,8	19,2
Диабенол						
2	5,50 ± 0,29	26,5	70,6	2,9	97,1	2,9
5	5,31 ± 0,32	44,8	44,8	10,4	90,6*	9,4
9	5,20 ± 0,22***	37,5*	60,0	2,5*	100*	0

Различие с соответствующим параметром у контрольных мышей того же возраста достоверно: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,002.

**Возрастная динамика базальной температуры тела  
у трансгенных мышей HER-2/neu,  
получавших и не получавших диабенол**

Показатели	Базальная температура (°C) в возрасте:		
	2 мес.	5 мес.	9 мес.
Контроль	39,2 ± 0,08	39,3 ± 0,08	38,2 ± 0,18
Диабенол	38,9 ± 0,07	39,5 ± 0,07	38,1 ± 0,20

Данные о динамике выживаемости трансгенных мышей представлены в таблице 14.15. и на рис. 14.14. С возрастом количество выживших животных снижалось, примерно, с равной скоростью



в контрольной и подопытной группах. Таким образом, влияния диабенола на выживаемость трансгенных мышей не отмечено. Не выявлено значительных различий в показателях продолжительности жизни у животных, получавших и не получавших исследуемый препарат (табл. 14.16.). В подопытной группе по сравнению с контролем сходными оказались показатели средней продолжительности жизни всех животных и 10 % максимально проживших мышей, одинаковой была медиана, максимальная продолжительность жизни была несколько увеличена.

Таблица 14.15

### Возрастная динамика выживаемости трансгенных мышей HER-2/neu, получавших и не получавших диабенол

Группа	Возраст, в месяцах												
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
	Количество мышей, доживших до указанного периода												
Контроль	29	28	24	16	7	3	3	3	1	1	0	0	0
Диабенол	28	28	26	16	6	5	3	1	1	1	1	1	0

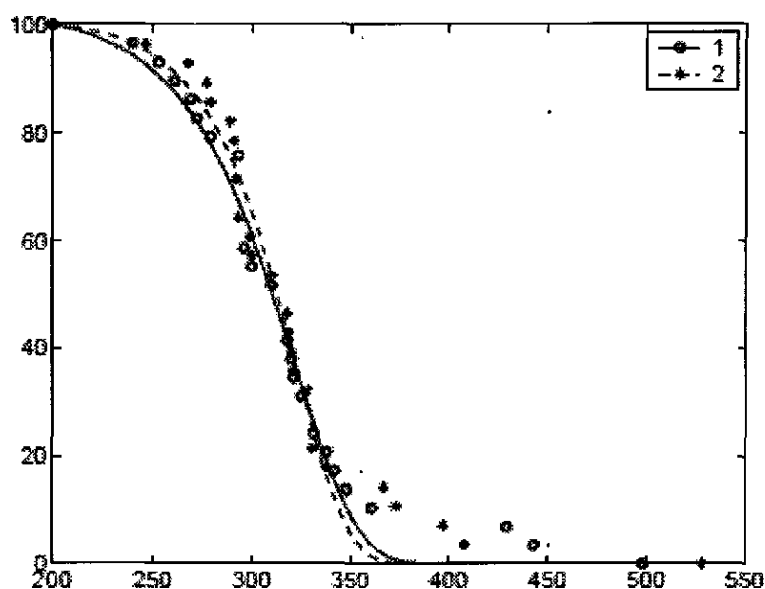


Рис. 14.14. Динамика гибели мышей HER-2/neu: по оси абсцисс – возраст в сутках; по оси ординат – % выживших мышей; 1 – контрольная группа, 2 – подопытная группа

**Влияние диабенола на показатели продолжительности жизни  
у трансгенных HER-2/-neu мышей**

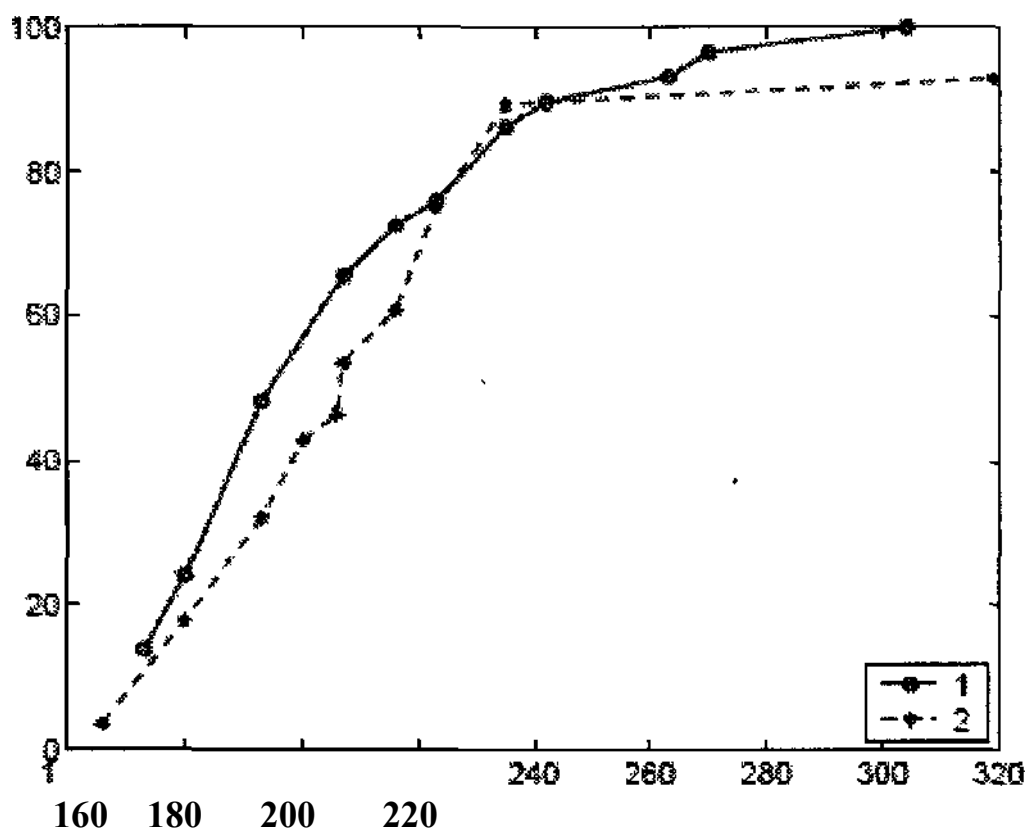
Показатели	Контроль	Диабенол
Количество мышей	29	28
Средняя продолжительность жизни, сутки (M±t)	321 ± 10,4	324 ± 10,3
Медиана, сутки	318	318
Средняя продолжительность жизни 10% максимально проживших мышей, сутки	457 ±21 Л	444 ± 42,0
Максимальная продолжительность жизни, сутки	498	528
a (сутки <sup>-1</sup> )	0.0307 (0,0281 ;0,0337) <sup>a</sup>	0.0374* (0,0351; 0,0415)
MRDT, сутки	22,58 (20,58; 24,66)	18,54 (16,71; 19,77)*

*Примечание.* Константа а в уравнении Гомперца:  $R = r_0 (exp) ut$ , где  $r_0$  = смертность во время at  $t = 0$ ; MRDT – время удвоения силы смертности (mortality rate doubling time); а – в скобках – 95% доверительный интервал, различие с контролем достоверно, \* $p < 0,05$ .

Длительное наблюдение за животными показало, что у трансгенных мышей сравнительно рано и с большой частотой развивались новообразования молочных желез. Первые опухоли в обеих исследуемых группах возникли примерно в одно и то же время. В дальнейшем, у животных получавших диабенол, количество мышей с опухолями возрастало несколько медленнее, чем в контрольной группе, однако, к 220-му дню эти различия нивелировались (рис. 14.15).

ОМЖ имели вид множественных узлов, поражавших обычно три-четыре пары молочных желез, но иногда – и все молочные железы животного. Часто ОМЖ сливались в конгломераты, поражая несколько молочных желез на одной стороне тела, достигая размеров 5–6 см в диаметре, с участками некроза и изъязвлениями. На вскрытии у мышей HER-2/neu опухоли молочной железы имели вид узелков раз-

личного размера, располагающихся под кожей и спаянных с кожей и подлежащими тканями (рис. 14.16.). Часть опухолей была окружена серовато-розовой капсулой. На разрезе опухоли имели кистозное и дольчатое строение. Участки дольчатого строения состояли из серо-розовой ткани тестоватой консистенции, в опухолях крупного размера – с очагами некрозов и кровоизлияний. Участки кистозного строения состояли из кист различного диаметра с прозрачным бесцветным или кровянистым содержимым. Для опухолей крупного размера характерным было истончение и последующее изъязвление кожи над опухолью.



**Рис. 14.15.** Динамика нарастания частоты ОМЖ у мышей HER-2/neu с возрастом: по оси абсцисс – возраст в сутках, по оси ординат – частота ОМЖ (%); 1 – контрольная группа, 2 – подопытная группа



**Рис. 14.16. Общий вид опухолей молочных желез у трансгенных мышей HER-2/neu**

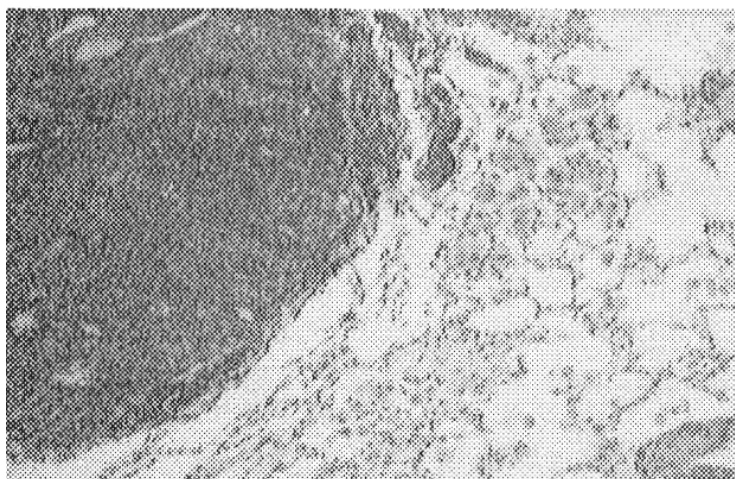
При микроскопическом исследовании опухоли молочной железы имели разнообразное гистологическое строение. Участки с дольчатой структурой состояли преимущественно из очагов солидного рака, в отдельных случаях с развитой гиалинизированной стромой. Участки кистозного строения перемежались с очагами папиллярной и тубулярной карциномы (рис. 14.17.). В участках солидного рака во многих случаях наблюдались некрозы, очаги комедо-карциномы, криброзные структуры и кровоизлияния с образованием геморрагических полостей и разрастанием капилляров. Кисты образовывались также на месте расширенных протоков, содержащих секрет. В целом, отмеченная полиморфная картина соответствовала аденокарциномам типа В [Turusov V., 1994].

У части мышей в легких обнаруживались метастазы опухолей молочных желез, преимущественно в виде множественных узелков различного размера, располагающихся, в основном, под плеврой и состоящих на разрезе из серо-розовой ткани. Микроскопически метастазы опухолей молочной железы в легких имели, в основном, солидное

и кистозное строение, соответствующее первичным опухолевым очагам (рис. 14.18.). В легких также отмечались очаги пневмонии.



**Рис. 14.17. Солидный рак молочной железы с геморрагическими полостями у трансгенной мыши-самки HER-2/neu (Гематоксилин-эозин. Ув. x180)**



**Рис. 14.18. Метастаз солидного рака молочной железы в легких у трансгенной мыши-самки HER-2/neu (Гематоксилин-эозин. Ув. x180)**

Что касается изменений в других органах, то у отдельных мышей обеих групп выявлены макроскопически признаки венозного застоя. При микроскопическом исследовании в печени, в ряде случаев, наблюдалась атрофия балок с расширением синусоидов и мелкоклеточной инфильтрацией. Каких либо очагов жировой дистрофии, свидетельствующей о токсическом действии препарата на печень, не обнаружено.

В селезенке единичных подопытных и контрольных животных отмечены явления лимфоидного истощения с атрофией фолликулов.

Анализ динамики канцерогенеза показал, что влияние диабенола на развитие аденокарцином у трансгенных мышей было незначительным (таблица 14.17.). Разница в сроках обнаружения первого новообразования составила 7 дней.

*Таблица 14.17*

**Влияние диабенола на развитие аденокарцином  
молочной железы у самок трансгенных мышей HER-2/neu**

Показатели	Контроль	Диабенол
Количество мышей	29	28
Возраст обнаружения 1-й опухоли молочной железы, сутки	173	166
Средний латентный период обнаружения 1-й ОМЖ, сутки	208 ± 5,93	210 ± 5,84
Количество мышей с опухолями, (%)	29 (100 %)	26 (92,9%)
Общее количество ОМЖ	195	179
Множественность ОМЖ	6,72 ± 0,37	6,88 ± 0,33
Максимальный диаметр опухолей, см	2,75 ± 0,16	2,73 ± 0,15
Количество мышей с метастазами ОМЖ в легкие, (%)	14 (48,3 %)	9 (35,7 %)
Максимальный диаметр метастазов, см	0,52 ± 0,11	0,46 ± 0,08

*Примечание.* ОМЖ – опухоли молочной железы.

Средний латентный период выявления первых новообразований молочной железы у подопытных и контрольных животных был сход-

ным. В то же время, общая частота мышей с новообразованиями и количество опухолей при введении диабенола были несколько меньшими, чем у интактных животных. В подопытной группе отмечена также тенденция к снижению количества мышей с метастазами и максимального размера метастазов.

Таким образом, в опытах на мышах HER-2/neu не обнаружено каких-либо признаков токсического и канцерогенного действия диабенола. Препарат тормозил возрастные изменения эстральной функции у животных, хотя и не оказывал значительного влияния на выживаемость и показатели продолжительности жизни у мышей.

### **14.3. Действие диабенола на крысах LIO**

В этой серии опытов, в отличие от других серий, подопытные и контрольные животные получали канцероген ДМГ. При этом дополнительно подопытные крысы получали с питьевой водой диабенол. Введение препарата также не вызывало каких либо изменений в состоянии и поведении животных. Крысы, получавшие диабенол, прибавляли в весе примерно с такой же скоростью, как и контрольные животные, и значительных различий в этом показателе между группами не установлено (таблица 14.18.). Отмечена также сходная динамика поглощения корма крысами, получавшими и не получавшими диабенол (таблица 14.19.), т.е. вводимый препарат не влиял на аппетит. У животных, получавших диабенол, объем поглощенной за сутки жидкости, не отличался от показателей в контроле (таблица 14.20.).

Все это свидетельствует о том, что введение препарата не вызывало отрицательных реакций у животных и не влияло на общее состояние организма.

**Динамика веса тела крыс,  
получавших и не получавших диабенол**

Показатели	Вес тела (в граммах) в различные сроки опыта			
	В начале опыта	2 мес.	4 мес.	6 мес.
Контроль	213,9 ±4,63	306,5±6,47	359,5±6,63	356,6±11,17
Диабенол	213,2±6,11	295,61±7,16	349,0 ±7,16	352,6± 5,56

Таблица 14.19

**Динамика поглощения корма крысами, получавшими  
и не получавшими диабенол**

Показатели	Количество поглощенного корма (в граммах/крысу/сутки) в различные сроки опыта			
	в начале опыта	2 мес.	4 мес.	6 мес.
Контроль	21,4 ±0,91	23,8±0,82	24,7 ± 1,23	23,3±0,83
Диабенол	21,3 ±0,71	22,6± 1,31	22,9 ±0,87	21,6±1,25

Таблица 14.20

**Динамика поглощения жидкости крысами, получавшими  
и не получавшими диабенол**

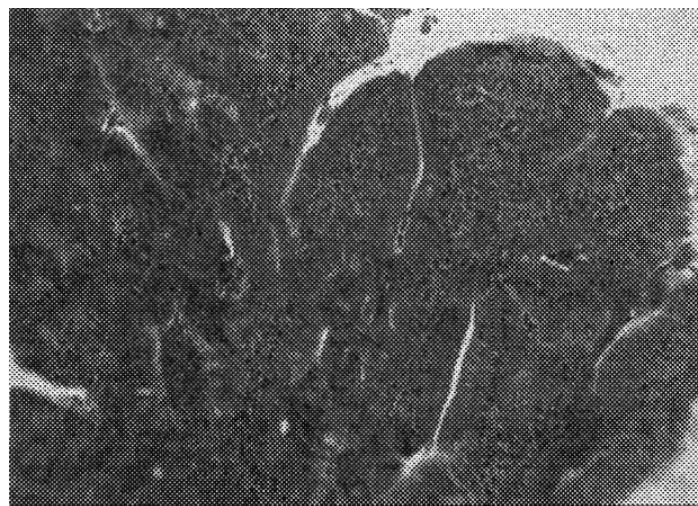
Показатели	Количество поглощенной воды (в мл /крысу/сутки) в различные сроки опыта			
	в начале опыта	2 мес.	4 мес.	6 мес.
Контроль	31,6±0,87	33,6±1,18	34,7 ±1,25	35,3± 1,58
Диабенол	31,9 ± 0,91	32,3± 1,23	33,9 ± 1,18	33,6± 1,22

До конца эксперимента дожили все животные (1,9 – в контроле; 20 – в опыте). У большинства животных возникли опухоли кишечника, преимущественно – толстой кишки (таблица 14.21.). Опухоли имели вид бугорков и узелков различных размеров, вдающихся в просвет, и при экзофитном росте, в ряде случаев, почти полностью



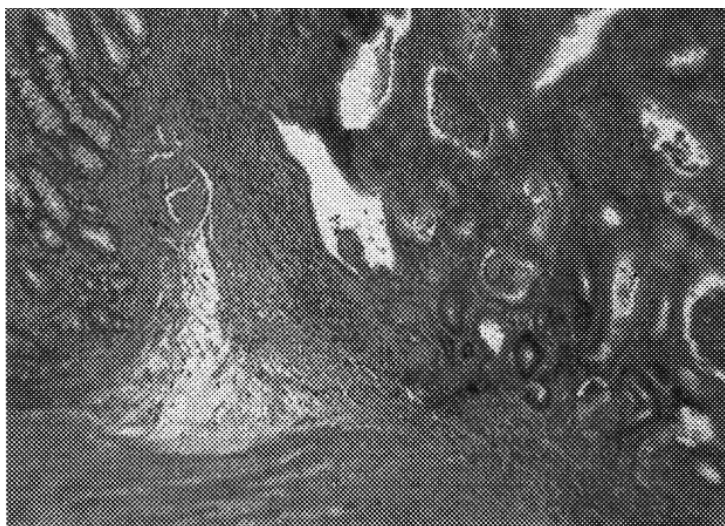
закрывающими просвет. Опухоли значительного размера инфильтрировали стенку кишки, при этом часто их поверхность изъязвлялась. В случае выраженного эндофитного роста наблюдалось прорастание опухолевой тканью всей стенки кишки с распространением в окружающие ткани и регионарным метастазированием.

При гистологическом исследовании все опухоли представляли собой злокачественные новообразования – аденокарциномы и слизистые раки с различной степенью дифференцировки и глубиной инвазии. В целом картина соответствовала описанной в литературе для опухолей кишечника у крыс, вызванных ДМГ [Pozharisski., 1990; 1979]. Злокачественные опухоли, растущие в пределах слизистой оболочки (поверхностные раки) имели в основном, высокую степень дифференцировки (рис. 14.19). С уменьшением степени дифференцировки увеличивалась глубина инвазии, и опухоли умеренной дифференцировки чаще всего прорастали в подслизистый слой (рис. 14.20). Более глубокая степень инвазии (в мышечную оболочку, серозу и окружающие ткани) была характерна для низкодифференцированных аденокарцином и слизистых раков (рис. 14.21).

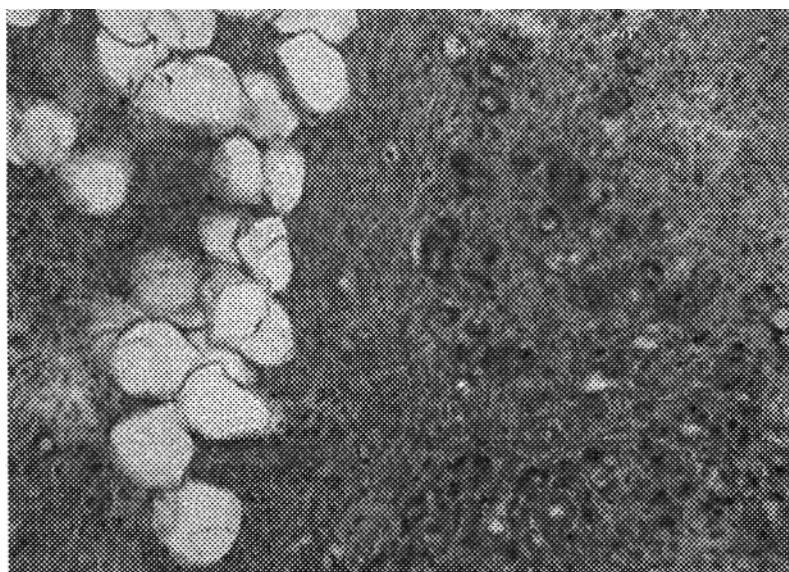


**Рис. 14.19. Поверхностный рак толстой кишки у крысы, вызванный ДМГ. Экзофитный характер роста. Гематоксилин-эозин.**

**Ув. х 200**



**Рис. 14.20. Опухоль толстой кишки у крысы, вызванная ДМГ. Аденокарцинома умеренной степени дифференцировки с инвазией в подслизистый слой. Гематоксилин-эозин. Ув. х 200**



**Рис. 14.21. Опухоль толстой кишки у крысы, вызванная ДМГ. Слизь-продуцирующий низкодифференцированный рак с инфильтрацией серозы и окружающих тканей. Гематоксилин-эозин. Ув. х 200**

Сведения о влиянии диабенола на развитие опухолей толстой кишки, индуцированных ДМГ, у крыс представлены в таблице 14.21.

Таблица 14.21

**Влияние диабенола на развитие опухолей толстой кишки, индуцированных ДМГ у крыс**

Показатель	ДМГ, контроль	ДМГ + диабенол
Количество животных	19	20
Число крыс с опухолями кишечника (%)	18 (94,7 %)	18 (90,0 %)
Толстая кишка (все отделы):		
- число крыс с опухолями (%)	18 (94,7 %)	18 (90,0 %)
- количество опухолей	105	77
- число опухолей на крысу:		
в группе	5,53 ± 0,63	3,85 ± 0,48*
среди опухоленосителей	5,83 ± 0,45	4,28 ± 0,39**
Средний размер опухолей (мм <sup>2</sup> )	81,21 ± 31,35	55,09 ± 11,50
Восходящая кишка:		*
- число крыс с опухолями (%)	17 (89,5 %)	8 (40,0 %)***
- количество опухолей	29	10
- число опухолей на крысу:		
в группе	1,53 ± 0,19	0,50 ± 0,18***
среди опухоленосителей	1,71 ± 0,14	1,25 ± 0,25
Средний размер опухолей (мм <sup>2</sup> )	57,46 ± 7,09	63,59 ± 17,89
Нисходящий отдел:		
- число крыс с опухолями (%)	17 (89,5 %)	18 (90,0 %)
- количество опухолей	63	56
- число опухолей на крысу:		
в группе	3,32 ± 0,44	2,80 ± 0,30
среди опухоленосителей	3,71 ± 0,41	3,11 ± 0,26
Средний размер опухолей (мм <sup>2</sup> )	57,44 ± 12,58	53,74 ± 14,17
Прямая кишка:		
- число крыс с опухолями (%)	9 (47,4 %)	6 (30,0 %)
- количество опухолей	10	8
- число опухолей на крысу:		
в группе	0,53 ± 0,13	0,40 ± 0,18
среди опухоленосителей	1,10 ± 0,10	1,33 ± 0,25
Средний размер опухолей (мм <sup>2</sup> )	37,6 ± 19,91	17,66 ± 3,90

Различия по сравнению с контрольной группой статистически достоверны: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,002.

Из табл. видно, что суммарная частота новообразований толстой кишки была одинаковой у контрольных и подопытных животных. Однако у крыс, получавших исследуемый препарат, развилось меньшее количество опухолей, чем в контроле. В результате множественность опухолей (как в пересчете на одну крысу в группе, так и среди опухоленосителей) под влиянием диабенола снижалась примерно на 30 %. Уменьшался и средний размер опухолей.

Большинство новообразований толстой кишки локализовалось в нисходящем отделе, что является характерным для данной модели канцерогенеза (рис. 14.21). Частота крыс с опухолями этой локализации была сходной в обеих группах. При этом отмечалась тенденция к уменьшению множественности и среднего размера опухолей у животных, получавших диабенол, по сравнению с контролем.

Наиболее выраженный тормозящий эффект диабенола обнаружен при анализе канцерогенеза в восходящем отделе толстой кишки. Частота опухолей этого отдела под влиянием диабенола снижалась более чем в 2 раза; в 3 раза снижалась множественность опухолей. Тенденция к торможению канцерогенеза прямой кишки у животных, получавших диабенол, проявлялась в уменьшении частоты опухолей, их множественности и размеров.

Нами проведено специальное изучение влияния диабенола на множественность новообразований методом кластерного анализа (таблица 14.22). Обнаружено, что при введении диабенола в 2 раза снижалось количество животных с большим числом новообразований толстой кишки (6 и более опухолей). В то же время единичные опухоли в контрольной группе не встречались.

При изучении распределения опухолей толстой кишки по размерам (таблица 14.23) удалось отметить, что в нисходящей кишке опухоли до 50 мм чаще встречались в подопытной, чем в контрольной группе (соответственно, в 71,4 % и 58,7 % случаев), тогда как более крупные новообразования – наоборот, в основном возникали у крыс, не получавших диабенол (соответствующие показатели составили 41,3 % и 28,6 %).

Таблица 14.22

**Распределение крыс с различным количеством опухолей толстой кишки в опытах с диабенолом**

Параметры	ДМГ, контроль	ДМГ + диабенол
Количество крыс	19	20
Количество крыс с опухолями толстой кишки (%)	18 (94,7 %)	18 (90,0 %)
Количество крыс (%) с:		
2 опухолями	-	2 (10 %)
3-5 опухолями	10 (52,6 %)	12 (60 %)
6 и более	8 (42,1 %)	4 (20 %)

Таблица 14.23

**Распределение по размерам опухолей толстой кишки у крыс, подвергавшихся и не подвергавшихся воздействию диабенола**

Размеры опухолей (мм <sup>2</sup> )	ДМГ, контроль	ДМГ + диабенол
Восходящая кишка: (%)		
<10	3 (10,4 %)	1 (10,0%)
11-50	15 (51,7 %)	3 (40,0 %)
51-100	6 (20,7 %)	3 (30,0%)
>100	5 (17,2 %)	2 (20,0 %)
Нисходящая кишка: (%)		
<10	9 (14,3%)	12 (21,4%)
11-50	28 (44,4%)	28 (50,0%)
51-100	19 (30,2 %)	10 (17,9%)
>100	7 (11,1 %)	6 (10,7%)
Прямая кишка: (%)		
<10	4 (40,0 %)	3 (37,5 %)
11-50	5 (50,0 %)	5 (62,5%)
51-100	0	0
>100	1 (10,0 %)	0

Результаты морфологического анализа опухолей суммированы в таблице 14.24. Характерно, что у животных, которым вводили диабенол, возникали опухоли преимущественно с экзофитным характером роста, относительная частота которых была статистически достоверно выше, чем в контроле. Обратное соотношение наблюдалось

в частоте эндофитных новообразований. Для опухолей у подопытных крыс характерной была также более высокая степень дифференцировки. Частота высокодифференцированных опухолей у этих животных была более чем в 3 раза выше, чем у интактных крыс. С учетом экзофитного характера роста и более высокой степени дифференцировки новообразований толстой кишки у подопытных крыс неслучайным является тенденция к меньшей глубине инвазии этих новообразований. Так, распространение карцином в пределах слизистой оболочки кишки при введении диабенола наблюдалось примерно в 2 раза чаще, чем в контроле. В то же время, глубокая инвазия (включая мышечную и серозную оболочку) в опухолях у контрольных крыс отмечалась чаще, чем в подопытной группе (соответственно, в 47,1 % и 31,6 %). У одной контрольной крысы наблюдались метастазы опухоли в брыжеечных лимфатических узлах.

*Таблица 14.24*

**Распределение опухолей толстой кишки крыс по характеру роста, степени дифференцировки и глубине инвазии (в % от общего числа опухолей)**

Параметры	ДМГ, контроль	ДМГ + диабенол
Характер роста:		
- экзофитный	50	76,3*
- эндофитный	50	23,7*
Степень дифференцировки:		
- высокая	14,7	47,4**
- умеренная	61,6	34,2*
- низкая	23,5	18,4
Глубина инвазии:		
- слизистая оболочка	17,6	34,2
- подслизистый слой	35,3	34,2
- мышечная оболочка	26,5	15,8
- сероза	20,6	15,8

Различия с контрольной группой (ДМГ) достоверны: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ .

Следует отметить, что наряду с опухолями толстой кишки, у одной крысы контрольной группы выявлена аденокарцинома тощей кишки, а у одного животного подопытной группы отмечена карцинома двенадцатиперстной кишки. Эти единичные случаи подчеркивают, тем не менее, селективность разработанной и использованной в данном опыте модели рака толстой кишки, вызванного ДМГ. При исследовании других внутренних органов каких-либо признаков токсического воздействия препарата не обнаружено.

В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что диабенол, не вызывая токсических изменений в организме крыс, тормозил возникновение и развитие опухолей толстой кишки, индуцированных химическим канцерогеном, что выразилось в уменьшении частоты новообразований, их множественности и размеров, преимущественно экзофитном характере роста, более высокой степени дифференцировки и меньшей глубине инвазии.

Сравнивая результаты трех серий экспериментов (на мышах NMRI, трансгенных мышах HER-2/neu и крысах LIO), можно выделить общие черты, характерные для биологического эффекта диабенола. Во всех сериях опыта длительное введение препарата в избранном режиме и дозах не приводило к токсическому эффекту. Препарат не обладал канцерогенными свойствами. Следовательно, можно сделать вывод о безопасности диабенола в условиях экспериментального применения. Результаты проведенных нами предклинических испытаний безопасности препарата, наряду с результатами других исследований его возможных токсических свойств, позволяют рекомендовать его для дальнейшего изучения в целях клинического применения.

Одновременно, в процессе проведенных нами исследований было показано, что диабенол обладает благоприятным воздействием на организм. Введение данного соединения животным тормозит возрастные нарушения репродуктивной системы, отражающиеся на таких характерных показателях эстрального цикла, как его продолжительность

и частота иррегулярных циклов. Торможение старения сопровождается у животных, получавших диабенол, увеличением продолжительности жизни, отмеченным в опытах на мышах NMRI. У мышей HER-2/neu герпротекторный эффект диабенола выявить не удалось, поскольку эти животные рано погибали от опухолей молочных желез.

Чрезвычайно интересными оказались результаты исследования возможных антиканцерогенных свойств диабенола. Этот препарат тормозил развитие как спонтанных (у мышей NMRI), так и индуцированных опухолей (рака толстой кишки у крыс, вызванного ДМГ). У мышей NMRI, получавших диабенол, отмечено замедление развития опухолей молочной железы, что приводило к увеличению среднего латентного периода, а также снижение частоты метастазов этих новообразований и уменьшение количества злокачественных лимфом. У мышей HER-2/neu значительного антиканцерогенного эффекта диабенола не отмечено, хотя выявлена тенденция к снижению метастатического потенциала опухолей молочных желез и размеров метастазов. Такой сравнительно слабый эффект препарата можно объяснить чрезвычайно высокой генетической предрасположенностью мышей данной линии к развитию рака молочной железы, обусловленной наличием онкогена HER-2/neu, на уровень экспрессии которого диабенол, видимо, не влиял. В то же время, у крыс диабенол тормозил канцерогенез толстой кишки, вызванный 1,2-диметилгидразином. Несмотря на примененную «жесткую» экспериментальную модель рака (в контроле опухоли возникали почти у 100 % животных), под влиянием диабенола значительно снижалась частота и множественность новообразований и уменьшался уровень злокачественности опухолей (определяемый по характеру роста, степени дифференцировки и глубине инвазии). В целом результаты изучения потенциальных антиканцерогенных свойств исследуемого соединения показали, что диабенол обладает широким спектром антиканцерогенной активности, что, видимо, обусловлено системным действием препарата.



Для объяснения возможных механизмов геропротекторного и антиканцерогенного эффекта диабенола необходимо обратиться к известным представлениям В.М.Дильмана [Дильман, 1987; 1994; 1979] о роли возрастных нарушений в метаболическом гомеостате в развитии ожирения, предиабета и атеросклероза. Неизбежное возрастное увеличение веса тела и содержания в нем жира он считал следствием генетически запрограммированного повышения порога чувствительности гипоталамического центра насыщения к «глюкозному и инсулиновому сигналам», причем, ведущее значение в развитии метаболических нарушений придавалось инсулину [Oilman, 1994]. В регуляции системы энергетического гомеостаза наряду с инсулином, ключевую роль играют, по мнению В.М. Дильмана, также гормон роста, глюкоза и жирные кислоты. По данным, полученным в лаборатории В.М. Дильмана, уже в среднем возрасте у людей наблюдается снижение чувствительности системы «гипоталамус-гормон роста» к ингибированию глюкозой, что как считалось, приводило затем к снижению чувствительности к инсулину, увеличению уровня жирных кислот, которые, в свою очередь, вызывали снижение с возрастом уровня в крови гормона роста. Все эти изменения, как полагал В.М. Дильман, лежат в основе развития предиабета, ожирения и условий, способствующих развитию атеросклероза.

В 2000 г. Facchini и соавт. (2000), предположили, что гиперинсулинемия может способствовать окислительному стрессу и тем самым независимо от гипергликемии ускорять старение и формирование ассоциированных с возрастом заболеваний, таких как сахарный диабет, атеросклероз, гипертоническая болезнь и рак. Гиперинсулинемия развивается вторично в связи с нарушенной способностью инсулина стимулировать метаболизм глюкозы в скелетных мышцах (резистентность к инсулину).

Известно, что наиболее эффективным методом увеличения продолжительности жизни у лабораторных животных является ограничение калорийности питания [Masoro, 2000; Mattison, 2003]. При та-

кой диете наблюдается стойкое снижение уровня глюкозы и инсулина в плазме крови, а также многих других гормонов, что позволило назвать этот метод «псевдогипофизэктомией» из-за схожести вызываемых эффектов [Everitt, 1980]. Исходя из этих данных, а также наблюдений о том, что гипергликемия и гиперинсулинемия оказывают повреждающий эффект, весьма сходный с наблюдаемым при старении, Masoro (2000) предположил, что геропротекторное действие калорийно ограниченной диеты обусловлено именно этим механизмом.

Доказано, что у пожилых людей существенно реже наблюдается резистентность к инсулину и чаще сохранена функция (β-клеток) инсулярного аппарата, чем в более молодых возрастных группах [Paolisso, 2001]. В ряде недавних работ резистентность к инсулину и гиперинсулинемия рассматриваются как новые важные факторы в развитии рака, в частности рака толстой кишки [Colangelo, 2002; Gupta, 2002], причем указывается, что разработка лекарственных средств, восстанавливающих чувствительность к инсулину, и, соответственно, снижающих уровень инсулина, может стать наиболее приоритетным направлением в профилактике рака [Gupta, 2002]. Использование миметиков калорийно ограниченной диеты, повышающих чувствительность к инсулину и снижающих уровень глюкозы в организме рассматривается как перспективное направление в современной геронтологии [Mattson, 2001].

В связи с приведенными выше данными, необходимо указать, что при изучении противодиабетической активности диабенола ранее было показана способность исследуемого препарата восстанавливать физиологический профиль секреции инсулина, снижать резистентность тканей к инсулину, улучшать утилизацию глюкозы периферическими тканями и пролонгировать глипогликемический эффект инсулина. Показано нормализующее действие диабенола на периферическую утилизацию глюкозы при использовании моделей инсулин-резистентности различного генеза (экзогенной гиперинсулинемии и ожирения у старых животных, сопровождающихся повышенным

содержанием гормона в организме), что, в первую очередь, может быть связано с улучшением чувствительности тканей к инсулину [Спасов, 1997]. Все это подтверждает предположение о том, что эффект диабенола обусловлен несколькими механизмами, как панкреотропными, так и экстрапанкреатическими. Есть основания полагать, что отмеченные механизмы могут быть ответственными за геропротекторные и антиканцерогенные свойства диабенола.

Следует отметить, что подобные свойства обнаружены ранее и у других антидиабетических препаратов. Еще в 80-е годы прошлого века с помощью антидиабетических бигуанидов (фенформин, буформин), которые повышают чувствительность тканей к инсулину, улучшают толерантность к углеводам, снижают уровень липидов и устраняют явления метаболической иммунодепрессии, также удавалось увеличить продолжительность жизни мышей и крыс и снизить у них частоту развития спонтанных и индуцированных химическими канцерогенами или ионизирующей радиацией новообразований [Анисимов, 2003; 1980, 1980а, б, в; 1982; Oilman, 1980; Anisimov, 1987, 2001, 2003].

Антидиабетические бигуаниды (фенформин, буформин, метформин) наряду с гипогликемическим действием обладают также способностью улучшать утилизацию глюкозы в тканях, снижать использование организмом жирных кислот в качестве энергетического субстрата, угнетать неоглюкогенез, снижать его биосинтез, снижать концентрацию в крови холестерина, триглицеридов и инсулина, а также биосинтез холестерина, и кроме того, уменьшать массу тела [Дильман, 1987]. Эти свойства антидиабетических бигуанидов, а также их способность устранять явления метаболической иммунодепрессии, послужили основанием для использования их в качестве геропротекторов в онкологической клинике для нормализации некоторых нарушений обмена, свойственных онкологическим больным [Oilman, 1994]. Имеются данные об антиокислительном действии антидиабетических бигуанидов [Mattson, 2001], их прямом действии на

митохондрии [Owen, 1993], антиокислительной [Gargiulo, 2002] и нейропротекторной активности, позволяющие рекомендовать бигуаниды для профилактики нейродегенеративных заболеваний [Lee, 2002]. Недавно было установлено, что буформин способен увеличивать продолжительность жизни нематоды *C. elegans* [Bakaev, 2002].

Применение обладающего антидиабетическими свойствами пиколината хрома, который увеличивает чувствительность тканей, прежде всего гипоталамуса, к инсулину, существенно увеличивало продолжительность жизни крыс и препятствовало развитию возрастной патологии [McCarty, 1994].

Результаты сопоставления эффекта диабенола и некоторых других антидиабетических препаратов на продолжительность жизни и канцерогенез экспериментальных животных даны в таблицах 14.25. и 14.26.

Таблица 14.25

### Влияние антидиабетических препаратов на продолжительность жизни мышей и крыс

Вид, линия	Воздействие	Количество животных	Продолжительность жизни, сутки			Авторы
			средняя	последних 10%	максимальная	
Мыши СЗН/Sp	Контроль	30	450 ± 23.4	631 ± 11.4	643	Oilman, Anisimov (1980)
	Фенформин	24	545 ± 39.2 (+21.1%)	810 ± 0** (+28.4%)	810 (+26%)	
Мыши NMR1	Контроль	50	346 ± 11.9	480 ± 9.2	511	Настоящий отчет
	Диабенол	50	369 ± 12.9 (+6.6%)	504 ± 6.4* (5.0%)	518	
Мыши HER-2/пей	Контроль	29	321 ± 10.4	457 ± 21.1	498	Настоящий отчет
	Диабенол	28	324 ± 10.3	444 ± 42.0	528 (+6.0%)	
Крысы ЛИО	Контроль	41	652 ± 27.3	885 ± 11.3	919	Анисимов и др., (1980 а; 1982)
	Фенформин	44	652 ± 28.7	974 ± 16.2** (+10.1%)	1009 (+9.8%)	
	Контроль	74	687 ± 19.2	925 ± 22.5	1054	Анисимов (1980 б)
	Буформин	42	737 ± 26.4 (+7.3%)	1036 ± 38.9* (+12%)	1112 (+5.5%)	

Различие с контролем достоверно: \*p < 0.05 ; \*\*p < 0.01.

**Влияние антидиабетических препаратов на канцерогенез  
у мышей и крыс [Анисимов, 2003]**

Вид	Препарат	Основная ткань-мишень	Канцероген	Наблюдаемый эффект
Мышь	Фенформин	Молочная железа	Спонтанные опухоли	Торможение
	Фенформин	Подкожная клетчатка	20-метилхолан-трен	Торможение
	Диабенол	Молочная железа	Суперэкспрессия HER-2/neu	Отсутствие эффекта
	Диабенол	Молочная железа, злокачественные лимфомы	Спонтанные опухоли	Торможение
Крыса	Буформин	Общая частота	Спонтанные опухоли	Торможение
	Фенформин	Общая частота	Спонтанные опухоли	Торможение
	Фенформин	Молочная железа	ДМБА	Торможение
	Фенформин	Молочная железа	НММ	Торможение
	Буформин	Молочная железа	ДМБА	Торможение
	Буформин	Нервная система	НММ, трансплацентарно	Торможение
	Фенформин	Нервная система, почки	НЭМ, трансплацентарно	Торможение
	Фенформин	Толстая кишка	ДМГ	Торможение
	Фенформин	Общая частота	Общее рентгеновское облучение	Торможение
Сирийский хомячок	Метформин	Поджелудочная железа	НБОПА	Торможение

*Примечание.* ДМБА – 7,12-диметилбенз(а)антрацен; ДМГ – 1,2-диметилгидразин; НБОПА – 1С-нитрозобис-(2-оксопропил)амин; НММ – N-нитрозо-метилмочевина; НЭМ – N-нитрозоэтилмочевина.

Сходство в действии этих препаратов может свидетельствовать и об общности механизмов регистрируемых эффектов. Следует отметить, что длительное использование антидиабетических средств у человека также приводило к увеличению продолжительности жизни и уменьшению риска развития злокачественных опухолей. В частности, показано увеличение выживаемости и сокращение смертности от всех причин у пациентов, получавших метформин [Scarpello, 2003];

снижение заболеваемости меланомами у получавших статины и фибраты [Dellavalle, 2003] и уменьшение риска развития рака молочной железы у пожилых женщин, принимавших статины [Cauley, 2003].

Данные литературы и результаты наших исследований свидетельствуют о перспективности использования антидиабетических бигуанидов и других антидиабетических средств, повышающих чувствительность к инсулину, как для профилактики и лечения опухолей, так и в качестве геропротекторов.

#### 14.4. Заключение

При длительном введении диабенола (9-диэтиламиноэтил-2,3-дигидроимидазо(1,2а) бензимидазола дигидрохлорида) с питьевой водой в концентрации 0,1 мг/мл низкоразовым мышам NMRI и трансгенным мышам HER-2/neu, а также крысам LIO токсического и канцерогенного эффекта препарата не отмечено. У мышей обеих линий исследуемый препарат задерживал развитие возрастных нарушений эстральной функции. У мышей NMRI диабенол влиял на динамику выживаемости, увеличивая показатели продолжительности жизни животных. При этом отмечалось торможение развития спонтанных опухолей, проявлявшееся в увеличении среднего латентного периода и снижении количества мышшей с метастазами опухолей молочных желез, а также уменьшении частоты злокачественных лимфом. У мышей HER-2/neu выявлена тенденция к снижению частоты метастазов рака молочных желез в легких и их размеров. Диабенол тормозил возникновение и развитие рака толстой кишки у крыс, вызванного 1,2-диметилгидразином, снижая частоту опухолей, их множественность, размеры. У крыс, получавших диабенол, аденокарциномы толстой кишки, индуцированные канцерогеном, отличались экзофитным характером роста, более высокой степенью дифференцировки и меньшей глубиной инвазии.

Итак, по результатам исследований, в использованной дозировке и режиме диабенол не обладает токсическими и канцерогенными свойствами, оказывая геропротекторный и антиканцерогенный эффект.

# ГЛАВА 15

## ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ

*А. А. Спасов, Л. И. Бугаева, Л. С. Мазанова*

---

При изучении новых потенциальных лекарственных препаратов важным является фрагмент оценки его токсикологических свойств. В этой связи в настоящей главе приведены данные доклинических исследований у диабенола острой и хронической токсичности, способности к кумуляции, влияния на процессы репродукции, а также аллергенные, местнораздражающие, иммуностропные и мутагенные свойства.

### **15.1. Исследования общетоксикологических свойств**

#### **15.1.1. Острая токсичность**

Исследования проводились на половозрелых крысах обоего пола. Границы среднесмертельной дозы (ЛД<sub>50</sub>) субстанции РУ-254 (диабенол) и его лекарственной формы изучали методами В.Б. Прозоровского (1962) и Litchfield и Wilcoxon [М.Я. Беленький, 1963] при однократном пероральном введении в дозах 1000, 1500, 3000, 4000, 5000 мг/кг крысам самцам; и в дозах 1200, 1500, 3000, 5000, 6000 мг/кг – крысам самкам. Наблюдения за животными велись 14 дней. Регистрировали количество погибших и выживших особей, а также следили за общим состоянием, подвижностью, нервно-мышечными и вегетотропными реакциями [Бугаева Л.И. и соавт., 2012].

В наблюдениях отмечено отсутствие различий в клинике токсических эффектов, вызываемых субстанцией РУ-254 и его лекарственной формой. В клинике отравления у крыс зарегистрировано наличие прогрессирующей седации, скованности движений, адинамия, боковое положение, акроцианоз, клонико-тонические судороги, угнетение дыхания. Гибель животных фиксировалась в течение первых 3–4 часов наблюдений в боковом положении при клонико-тонических судорогах и остановке дыхания. На следующие сутки наблюдений животные, оставшиеся в живых, принимали обычное положение, но были вялыми, со сниженной двигательной активностью и реакциями на внешние раздражители. Восстановление физической активности у данных животных прослеживалось на 3сутки наблюдений, отдаленной гибели не фиксировалось. Результаты расчета границ ЛД<sub>50</sub> субстанции и лекарственной формы диабенола, представлены таблицей 15.1.

*Таблица 15.1*

**Величины среднесмертельной дозы (ЛД<sub>50</sub>, мг/кг) субстанции  
и лекарственной формы диабенола  
при однократном пероральном введении крысам**

Исследуемое вещество	Крысы самки	Крысы самцы
Диабенол (субстанция вещества РУ-254)	2321,0 (1646,27-3273,01)	2740,9 (2017,54-3723,62)
Диабенол (лекарственная форма вещества РУ-254)	3569,5 (2730,59-4666,05)	3554,5 (2320,17-5445,33)

С учетом классификации токсичности ксенобиотиков по И.В. Саноцкому и соавт. (1975), позволяют отнести их к классу малотоксичных. При этом по сравнению с другими противодиабетическими препаратами, применяемыми в клинической практике для лечения инсулинезависимого сахарного диабета, диабенол оказался менее токсичен производного гуанидина и за исключением букар-



бана и амарила не уступает производным сульфонилмочевины I и II генерации (таблица 15.2).

Таблица 15.2

### Величины среднесмертельных доз некоторых антидиабетических препаратов при пероральном введении крысам

Название препарата	ЛД <sub>50</sub> , мг/кг	Авторы
Толбутамид	2500	Галлер Г. и др., 1973
Букарбан	10300	Галлер Г. и др., 1973
Хлорпропамид	2390	Галлер Г. и др., 1973
Гликлазид	3000	Duhault J. et al., 1972
Амарил	>10000	Donaubauer H. et al., 1993
Метформин	1000	Галлер Г. и др., 1973
Глицифен	1167	Котегов В.П., 1997

#### 15.1.2. Изучение кумулирующих свойств

Способность диабенола к кумуляции изучали при пероральном введении крысам в течение 24 дней в дозах 1/100 ЛД<sub>50</sub> (1 группа); 1/20 ЛД<sub>50</sub> (2 группа) и 1/10 ЛД<sub>50</sub> (3 группа). На протяжении всего эксперимента, не было отмечено ни одного случая гибели среди животных в 1-й и 2-й группах. При введении им на 25 день эксперимента, разрешающей дозы (равной ЛД<sub>50</sub>), в первой группе погибло по 2 особи (соответствует 20%) самцов и самок, а во второй – погибло 5 самцов и 4 самки. Данные результаты свидетельствуют об отсутствии у диабенола кумулятивных свойств в этих дозах. С другой стороны, снижение погибших животных в 1-й группе (диабенол в дозе 1/100 ЛД<sub>50</sub>), после введения им разрешающей дозы равной ЛД<sub>50</sub>, вероятно, можно расценивать как эффект привыкания к диабенолу, применяемого в низких дозах.

У животных в 3-й опытной группе к 24 дню эксперимента погибло по 5 крыс самцов и самок. После введения оставшимся в живых

разрешающей дозы вещества обнаружены гендерные различия в количестве погибших: среди крыс самцов погибло 4 особи (80 % животных), в то время как у самок – 3 особи (60 % животных), что, вероятно, можно расценивать о наличии у диабенола в дозе близкой к ЛД<sub>50</sub> способности к кумуляции.

Результаты последующего расчета Кк (коэффициент кумуляции) подтверждали ранее высказанные предположения, на основании которых сделано заключение об отсутствии кумулятивных свойств и наличия эффекта привыкания у диабенола в дозах 1/100 ЛД<sub>50</sub> и 1/20 ЛД<sub>50</sub>. В отношении Кк диабенола в дозе 1/10 ЛД<sub>50</sub>, то для крыс-самок Кк составил 2,05, для крыс-самцов – 1,55, что с учетом шкалы Л.И.Медведева и соавт. (1968) может свидетельствовать о наличии у диабенола в дозе, близкой к токсической (1/10 ЛД<sub>50</sub>) способности к кумуляции.

Таким образом, при исследовании кумулятивных свойств у диабенола установлена возможность его накопления в организме животных только в токсической дозе.

### **15.1.3. Хроническая токсичность**

#### ***15.1.3.1. Изучение хронической токсичности на крысах***

В экспериментах на белых беспородных крысах обоего пола 3,5 мес. возраста субстанцию диабенола вводили интрагастрально в течение 6 мес. в дозах: 5 мг/кг (экспериментально доказанная терапевтическая доза, Дудченко Г.П., 1989) – 1-я опытная группа; 25 мг/кг (максимальная терапевтическая доза) 2-я опытная группа; 125 мг/кг (токсическая доза) – 3-я опытная группа. Контрольная группа была интактной.

Экспериментальные исследования проведены в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP), со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарст-

венных средств» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2010, № 16, ст. 1815; № 31, ст. 4161) и требованиями Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития и ФГУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», изложенными в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (М., 2005).

В эксперименте отмечали состояние животных, прирост массы тела, потребление корма, воды. Через один, три и шесть месяцев, используя физиологические, биохимические, гематологические и патоморфологические методы, исследовали влияние субстанции диабенол на важнейшие системы организма и отдельные органы животных: нейрогенное влияние субстанции РУ-254 оценивали по спектру поведенческой активности крыс, с использованием теста «открытое поле»; влияние на периферическую кровь изучали по количеству эритроцитов и лейкоцитов, гемоглобина, цветного показателя, времени свертываемости, лейкограмме; состояние сердечно-сосудистой системы оценивали по электрокардиограмме; о функциональном состоянии печени, почек, сердца и селезенки судили по комплексу биохимических реакций (в пробах плазмы крови определяли содержание глюкозы, белка, креатинина, мочевины, трансаминаз), функциональным методам (с нагрузкой бромсульфалеином, феноловым красным и в тесте «гексеналовый сон») и патоморфологическим исследованиям (были изучены структуры тканей тимуса, сердца, легких, почек, надпочечников, селезенки, желудка, тонкого и толстого отделов кишечника, 12-перстной кишки и репродуктивных органов).

В хроническом эксперименте, по результатам наблюдений не обнаружено изменений в общем состоянии у животных в 1 и 2 опытных группах (диабенол 5 и 25 мг/кг, соответственно). Прирост массы тела был положительным, но опережал контрольные значения у крыс самцов и не различался с контролем у крыс самок. В общем состоянии животных 3-й опытной группы отмечались эффекты седации, неопрятности, потускнение шерстного покрова, снижение прироста

массы, более выраженное у крыс самцов, нежели у самок. Половые различия выявлялись и в исследованиях поведенческой активности. В тесте «открытое поле» у крыс самцов в 1-й и 2-й опытных группах регистрировались тенденции угнетения эмоционального поведения, а также вертикальной и исследовательской подвижности. У самцов в 3-й группе (диабенол в дозе 125 мг/кг) выраженность данных эффектов была достоверной. Поведенческая активность у крыс самок в опытных группах практически не изменялась, но при этом отчетливо отмечалось повышение эмоциональности и исследовательской активности.

Результаты исследования влияния субстанции диабенола на глюкозу крови и морфологическое строение поджелудочной железы крыс позволили обнаружить отсутствие значимых изменений в содержании глюкозы крови у крыс в опытных группах. Наблюдаемые колебания не имели динамики и укладывались в пределы видовой физиологической нормы. Отсутствие гипогликемического эффекта, вероятно, связано со схемой отбора проб крови для исследований, поскольку контрольные замеры биохимических показателей крови, в том числе и глюкозы, проводились через сутки после последнего введения препарата.

Вместе с тем, при проведении гистологических исследований в строении ткани поджелудочной железы обнаружены изменения в форме гипертрофии и атрофии инкреторных клеток. По литературным данным [Галлер Г. и др., 1973] в результате чрезмерного раздражения или стимуляции поджелудочной железы, в том числе и гипогликемическими средствами, возможно развитие как гипертрофии, так и дегенеративных изменений секреторных клеток поджелудочной железы. Тем не менее, зависимость характера изменений в структуре поджелудочной железы от применяемых доз диабенола, позволяет сделать предположение, что гипертрофия и гиперхромия секреторных клеток, наблюдаемая после употребления терапевтических доз препарата, по-видимому, связана с опустошением  $\beta$ -клеток

поджелудочной железы, вследствие инсулиотропного действия диабенола, а атрофия, как следствие использования его в токсической дозе.

В наблюдениях за животными, получавшими различные дозы диабенола, не было отмечено ни одного случая проявления признаков кровоточивости, хотя их появление было бы весьма вероятным при длительном применении диабенола, оказывающим влияние на систему гемостаза и наличием у него антиагрегантной активности (см. гл. 10). При этом в периферической крови не обнаружено изменений в содержании эритроцитов, являющихся своеобразными маркерами кровотечений. В этой связи результаты исследований дают основания предполагать, что осложнения в виде кровотечений, при употреблении даже достаточно высоких доз препарата, мало вероятны, тем более, что диабенол показан для применения при синдроме гипервязкости, сопровождающим течение сахарного диабета.

Биохимическими и патоморфологическими исследованиями функционального состояния печени обнаружено отсутствие изменений в органе у животных, получавших терапевтические дозы диабенола (5 и 25 мг/кг). В печени животных, получавших токсическую дозу диабенола (125 мг/кг), отмечалось полнокровие центральных вен, мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, с нарушением архитектоники печеночных балок и дисхромией ядер гепатоцитов. Встречались участки печеночной паренхимы, где клетки образовывали округлые гомогенные массы, что указывает на выключение из функции данного участка. При этом в биохимических исследованиях плазмы крови статистически значимых отклонений в активности аланиновой аминотрансферазы, которая является показателем нарушения функции печени, в том числе и в токсической дозе, отмечено не было. Однако обращает на себя внимание тот факт, что на общем фоне колебаний активности данного фермента, как в сторону повышения, так и в сторону понижения, при длительном употреблении диабенола (3 и 6 месяцев) в токсической дозе 125 мг/кг, во всех группах животных было отмечено снижение данного показателя. При изуче-

нии поглотительно-выделительной функции печени были зафиксированы достоверные, но не закономерные ухудшения показателей бромсульфалеиновой пробы (замедление процесса выведения бромсульфалеина) в дозе 125 мг/кг, что является показателем снижения активности Купферовских клеток, выполняющих фагоцитарную роль и защищающих печеночные клетки от токсических воздействий. При исследовании микросомальной активности печени, косвенным показателем которой является скорость метаболизма гексенала, у животных, получавших в течение длительного периода токсическую дозу диабенола (125 мг/кг), отмечалось удлинение гексеналового сна, что может свидетельствовать о возможности влияния диабенола на энзиматические системы цитохромов, что согласуется также и с результатами исследований (см. гл. 13). Вместе с тем выявленные изменения были обратимы и свидетельствуют об отсутствии патологического воздействия диабенола на детоксикационную функцию печени. В исследованиях, проведенных после отмены диабенола, отчетливо прослеживалось выравнивание показателей бромсульфалеиновой пробы и длительности «гексеналового сна» с контролем.

Таким образом, на основании результатов исследований, свидетельствующих об отсутствии гепатотоксического действия у диабенола в диапазоне терапевтических доз, а обратимые изменения выявлялись лишь при использовании его в высоких дозах (превышающих терапевтическую в 25 раз). Полагаем, что данные эффекты необходимо учитывать, особенно при использовании диабенола в комбинированной терапии.

Нефротоксическое действие препарата в дозах 5, 25 и 125 мг/кг в хроническом эксперименте оценивали по функциональным и морфологическим изменениям почек. Известно, что уровни содержания в крови мочевины и креатинина позволяют оценить не только нарушение функциональной активности почек, но и дают возможность дифференцировать влияние препарата на различные системы организации почек и процессы, происходящие в них. Установленное сохра-

нение концентраций креатинина на протяжении всего эксперимента у крыс, получавших диабенол в пределах видовых физиологических норм (5 и 25 мг/кг), свидетельствует в пользу отсутствия токсического действия препарата на гломерулярную систему и клубочковую фильтрацию. А отмечаемое в некоторых случаях повышение мочевины (при использовании препарата в дозе 125 мг/кг) дает основание предполагать о влиянии препарата на тубулярную систему и канальцевую реабсорбцию, что находит подтверждение при проведении гистологических исследований. Так, при нормальном состоянии клубочкового аппарата, у отдельных животных отмечаются изменения в системе канальцев, проявляющиеся сужением их просвета, вызванного гипертрофией эпителия канальцев I и II порядка с явлениями мелкозернистой дистрофии.

При исследовании влияния диабенола на сердечно-сосудистую систему не было отмечено изменений ни в электрокардиограммах животных, ни при патоморфологическом исследовании.

### ***15.1.3.2. Изучение хронической токсичности на собаках***

Эксперименты выполнены на половозрелых 24 собаках обоего пола, массой от 5 до 10 кг, размещенных в отдельных вольерах вивария ВолГМУ и прошедших двухнедельный карантин. Животные обеспечивались полноценными кормами, имели круглосуточный свободный доступ к автопоилкам. В хроническом эксперименте следили за состоянием, поведением, динамикой массы тела животных. При проведении исследований были сформированы 3 опытные и 1 контрольная группы. Субстанцию диабенола вводили перорально опытным животным в дозах 5 мг/кг (1-я опытная группа); 25 мг/кг (2-я опытная группа); 125 мг/кг (3-я опытная группа) в течение 3 месяцев. Контрольной группе животных вводили физиологический раствор. Исследования по изучению электрокардиограммы, периферической крови, биохимических показателей плазмы крови проводили через

1 и 3 месяца эксперимента и через 1 месяц после отмены введения субстанции диабенола. Патоморфологические исследования проводили по окончании 3 месяца эксперимента и через 1 месяц после отмены введения диабенола. При этом часть подопытных и контрольных животных подвергали эвтаназии (при помощи внутривенного введения этаминала натрия в виде 10 % раствора). На вскрытии у животных проводили макро и микроскопические исследования (оценивали структуры тканей сердца, легких, печени, почек, надпочечников, селезенки, гонад, желудочно-кишечного тракта).

По результатам наблюдений не обнаружено различий с контролем в состоянии опытных животных и динамики изменений массы тела, что может свидетельствовать о хорошей переносимости собаками вещества РУ-254.

В исследованиях, проведенных через 1 и 3 месяца эксперимента, в опытных группах собак не установлено достоверных различий с контролем в электрокардиографических исследованиях и в периферической крови. При этом лишь у собак самцов в 3-й опытной группе (125 мг/кг) прослеживались недостоверные, но обратимые тенденции повышения ЧСС.

В периферической крови у собак опытных групп показатели красной и белой крови изменялись не однозначно в ряду самок и самцов, но в пределах физиологической нормы.

По результатам биохимических исследований плазмы крови достоверных различий в опытных и контрольной группах не отмечено. Колебания исследуемых биохимических показателей (содержание белка, глюкозы, креатинина, мочевины и АлАт-, АсАт-трансаминаз) как в сторону увеличения, так и в сторону снижения были не достоверны и находились в пределах физиологической нормы. Наряду с этим, у собак в 3 группе (125 мг/кг) по сравнению с другими опытными группами и контрольной группой, отчетливо повышалось содержание мочевины. В экспериментах, после отмены вещества РУ-



254 значимых изменений в биохимических показателях плазмы крови собак, по сравнению с контрольными животными, не обнаружено.

Патоморфологические исследования, проведенные по окончании трехмесячного курса введения субстанции диабенола и через 1 месяц после его отмены, позволили обнаружить отсутствие изменений в исследуемых внутренних органах у собак, получавших субстанцию в дозах 5 и 25 мг/кг. Патоморфологическими исследованиями, проведенными на собаках, получавших диабенол в дозе 125 мг/кг, зафиксированы изменения в структурах печени (выраженное полнокровие, наличие мелкокапельной жировой дистрофии с явлениями кариопикноза у части гепатоцитов); в почках (полнокровие сосудов клубочков, сужение просвета почечных канальцев, появление единичных эритроцитов между петлями сосудов, просвет почечных канальцев сужен, отмечаются явления белковой дистрофии); в селезенке (гиперплазия красной и белой пульпы, сосуды микроциркуляторного русла полнокровны). Гистологические исследования строения других тканей органов у животных в 3-й группе были, практически, на уровне контрольных.

#### **15.1.4. Заключение**

Проведенные токсикологические исследования позволили установить отсутствие патологических изменений в основных гомеостатических константах (поведении, приросте массы тела, периферической крови, биохимических и патоморфологических исследованиях) животных, получавших длительным курсом диабенол в дозах 5 и 25 мг/кг. В исследованиях на животных, получавших вещество диабенол в дозе 125 мг/кг, зарегистрировано угнетение двигательного и эмоционального поведения и снижение опрятности у животных. Данные эффекты прослеживались и у собак, но в гораздо меньшей степени. При этом однонаправленными для крыс и собак оказались эффекты диабенола в токсической дозе на показатели ЭКГ (повыше-

ние ЧСС) периферической крови (снижение свертываемости) и изменений содержания уровня глюкозы. Патоморфологическими испытаниями, как у крыс, так и у собак, выявлены отчетливые, но обратимые изменения в почках, печени и селезенке, что, вероятно, может свидетельствовать о наличии неблагоприятного действия у диабенола в дозе 125 мг/кг на данные органы («орган-мишень»). Вместе с тем, на основании результатов исследований, проведенных после отмены введения животным диабенола, зафиксированы эффекты восстановления измененных функций в печени и почках, что может свидетельствовать о наличии обратимости повреждающих эффектов диабенола и отсутствии патологического влияния препарата на процессы детоксикации и реабсорбции.

## **15.2. Влияние на репродуктивную функцию**

Исследование влияния диабенола на репродуктивную функцию позволяло оценить его воздействие на все процессы воспроизведения и развития потомства, начиная от способности к оплодотворению и зачатию у животных и заканчивая состоянием развития их потомства.

### **15.2.1. Гонадотропное действие**

Гонадотропные эффекты диабенола оценивали по влиянию на функциональную активность и состояние половых желез крыс самцов (по количеству сперматозоидов, их подвижности, наличию патологических форм и способности к оплодотворению) и на состояние процессов фертильности у крыс самок (по способности к зачатию, изменению в эстральной цикличности). Половозрелым крысам обоего пола диабенол перорально вводили в дозах 25 и 125 мг/кг. Контрольным крысам вводили физиологический раствор. Продолжительность воздействия составила 2 недели для самок (приравнивается к 3-4 эстральным циклам) и 2 месяца для самцов (приравнивается к периоду сперматогенеза).

В проведенных исследованиях не обнаружено существенных изменений в половом поведении у крыс самцов и самок, получавших диабенол в дозе 25 мг/кг. У животных, получавших диабенол в дозе 125 мг/кг, половые мотивации у крыс самцов снижались, и наоборот, повышались у крыс самок. Исследованиями А.А.Спасова и соавторов (2010) показано, что в эстральной цикличности у крыс самок, получавших диабенол в дозах 25 и 125 мг/кг, нарушений не наблюдалось. При этом у самок, получавших диабенол в дозе 125 мг/кг, учащались фазы стадии эструс и метаэструс что, вероятно, можно расценивать наличием активирующего влияния вещества на механизмы обмена гонадотропинов, что сказывалось и на активации у самок полового поведения. По результатам исследования процессов сперматогенеза у самцов, получавших диабенол, значимых различий с контрольными показателями не прослеживались. В спермиограмме у крыс самцов в опытных группах выявлялись тенденции повышения общего количества сперматозоидов (наиболее выражено в группе, получавшей субстанцию в дозе 25 мг/кг) с одновременным повышением содержания патологических форм сперматозоидов. При этом время подвижности сперматозоидов у опытных групп самцов полностью соответствовало контрольным данным. Полученные результаты могут свидетельствовать об отсутствии повреждающего влияния диабенола на процессы сперматогенеза, что также согласуется с результатами морфологических исследований семяродного эпителия гонад и с данными оплодотворяющей функции самцов. Так, при оценке результатов спаривания опытных самцов с интактными самками не отмечено различий в индексе оплодотворения самок и их плодовитости, а при спаривании интактных самцов с группами крыс самок, получавших диабенол, индекс зачатия повышался, а плодовитость, до- и послеимплантационная гибель плодов практически соответствовали контрольным значениям.

По результатам проведенных экспериментов можно заключить, что субстанция диабенола (соединение РУ-254) при пероральном вве-

дении крысам в дозах 25,0 мг/кг и 125 мг/кг не оказывает патологического влияния на генеративную функцию крыс самцов и крыс самок.

### **15.2.2. Влияние диабенола на антенатальное развитие плодов**

Беременным крысам самкам соединение РУ-264 вводили в дозах 5, 25 и 125 мг/кг в периоды органогенеза, плацентации и имплантации и фетогенеза (в дозе 25 мг/кг). На 20-й день беременности крыс подвергали эвтаназии (под эфирным наркозом методом дислокации шейных позвонков), выделяли плоды крыс. В проводимых исследованиях установлена зависимость прибавки массы тела беременных крыс от вводимой дозы вещества РУ-254 и от сроков его введения беременным крысам. Так, прибавка массы тела самок, получавших вещество РУ-254 в периоды органогенеза в дозах 5 и 25 мг/кг, была на уровне контрольной группы. У крыс, получавших исследуемое вещество в дозе 125 мг/кг, прибавка массы тела оказалась ниже контрольных значений на 40%. При введении РУ-254 в дозе 125 мг/кг беременным самкам в периоды имплантации и фетогенеза не выявлялось достоверных различий с контролем в прибавке массы тела.

Таким образом, из проведенных наблюдений следует, что соединение РУ-254 в дозах 5 и 25 мг/кг не влияет на общее состояние и прирост массы тела беременных самок. Под действием данного соединения в дозе 125 мг/кг, у беременных самок не изменяется общее состояние, но прирост массы тела – снижается.

По результатам макроскопического осмотра плодов, выделенных у самок, получавших диабенол, аномалий развития и уродств не обнаружено. При этом у плодов самок, получавших диабенол в дозе 125 мг/кг, зафиксировано наличие подкожных геморрагий, разной степени выраженности (обширные у 10% плодов и мелкоточечные – у 90 %) в затылочной и лицевой части головы, а также по ходу позвоночника. Наличие мелкоточечных кровоизлияний (в верхней части туловища, по ходу позвоночника) было зафиксировано также

и у 50 % плодов, находившихся под воздействием РУ-254 в дозе 25 мг/кг. У плодов от самок, получавших РУ-254 в дозе 5 мг/кг, различий с контролем не обнаружено.

Исследования состояния внутренних органов плодов позволили также зафиксировать наличие кровоизлияний в грудном и брюшном отделах, а так же в носовой, лобной и височной частях головы, легких и печени. Частота встречаемости кровоизлияний зависела от дозы вещества и периода его антенатального воздействия. В большей степени кровоизлияния фиксировались у плодов от самок, получавших РУ-254 в дозе 125 мг/кг. В меньшей степени прослеживалась у группы плодов антенатально, получавших РУ-254 в дозе 5 мг/кг. У плодов самок, получавших РУ-254 в период органогенеза и фетогенеза, наличие мелкоточечных кровоизлияний в полость тела не различалось с контрольными показателями, но при этом у 70 % плодов выявлялись точечные кровоизлияния в печени и лобно-носовой части головы. У одного плода в области печени обнаружена обширная гематома. Несколько иная картина состояния внутренних органов плодов отмечалась у эмбрионов, находившихся под воздействием вещества РУ-254 в дозе 25 мг/кг, вводимого самкам в период имплантации и плацентации. У данной группы плодов в 80 % случаев отмечались кровоизлияния в брюшную полость, и мелкоточечные – в ткань печени. При обследовании закладки скелета у плодов не обнаружено нарушений в процессах оссификации. Количество оссифицированных точек скелета у плодов подопытных групп соответствовало контрольным.

Таким образом, можно заключить, что субстанция РУ254 при введении перорально крысам самкам в различные периоды беременности в дозах 5, 25 и 125 мг/кг не оказывает эмбриотоксического и тератогенного действия. Выявление геморрагий у выделенных эмбрионов, было наиболее существенным в группах самок, получавших диабенол в дозе токсической (125 мг/кг), тогда как их количество у плодов самок, получавших диабенол в дозах 5 и 25 мг/кг, было существенно ниже. Полученные результаты, вероятно, обусловлены

механизмом влияния на гемореологические показатели препарата (см. гл. 10). При этом у антенатально развивающихся плодов не нарушались процессы оссификаций скелета, количество оссифицированных точек у опытных плодов, практически не зависимо от дозы соединения существенно с контролем не различалось.

### **15.2.3. Действие диабенола на постнатальное развитие плодов**

При исследовании антенатально-повреждающего действия вещества РУ-254 при введении беременным самкам в дозе 25 мг/кг на постнатальное развитие потомства показано отсутствие влияния исследуемой субстанции на состояние беременных самок до родоразрешения и впоследствии в период молочного вскармливания потомства. Отмечено, что прирост массы беременных крыс в период введения субстанции РУ-254 был выше контрольных значений. Масса тела плодов крыс в 8-ми дневном возрасте в опытной группе была ниже контрольных значений, однако к 14 и 21 дню жизни их масса выравнивалась с контрольными значениями. При этом рефлекс избегания края, переворачивания на плоскости были армированы у всех крысят в равной степени к 8-му дню жизни. Последующие исследования по физическому развитию, а также поведенческой активности имнестическим реакциям крысят в опытной группе не позволили обнаружить различий с контрольными данными.

Таким образом, по результатам исследований можно заключить, что вещество РУ-254, вводимое самкам в дозе 25 мг/кг в течение всего периода беременности, не оказывает повреждающего влияния на физическое развитие потомства в постнатальный период.

### **15.2.4. Заключение**

По результатам проведенных исследований можно заключить отсутствие существенного влияния диабенола в дозе 5 мг/кг на поло-

вое поведение и генеративную функцию крыс самок и самцов. В исследованиях на крысах, получавших диабенол в дозе 125 мг, выявлены эффекты депримирующего действия на половое поведение самцов, и, наоборот, активирующего действия у самок, отсутствие повреждающего влияния на процессы фертильности.

Установлено, что диабенол не оказывает эмбриотоксического и тератогенного действия при введении в дозах 5, 25 и 125 мг/кг, не оказывает патологического влияния на процессы органо- и фетогенеза, способствует появлению наружных и внутренних геморрагий у плодов крыс получавших препарат в токсической дозе.

### **15.3. Изучение аллергенности**

Аллергенные свойства у диабенола исследовали с помощью комплекса методов (оценки кожно-раздражающего действия, анафилактической активности, в реакции гиперчувствительности немедленного и замедленного типа, сенсибилизирующих свойств в реакции иммунных комплексов), позволяющих выявить наличие возможного развития определенного типа реакций и прогнозировать вероятность развития аутоаллергических реакций при его употреблении, которые при своей крайней выраженности могут приводить к аутоаллергическим заболеваниям.

Известно, что лекарственные препараты, попадая в организм, обычно не включают иммунные механизмы, а становятся антигенами (аллергенами) только после соединения с белками тканей (в том числе и сывороточными белками) при комплексировании, меняя их конформацию и вызывая сенсибилизацию организма. При повторном поступлении в организм эти аллергены часто могут соединяться с образовавшимися антителами и/или сенсибилизированными лимфоцитами уже самостоятельно, без предварительного связывания с белками [Пыцкий В.И. и др., 1991]. Как отмечалось выше, связывание с белками, по-видимому, свойственно диабенолу (см. гл. 13), по-

этому аллергогенные свойства препарата нуждались в тщательнейшем изучении.

Результаты многократных накожных аппликаций вещества субстанции РУ-254 свидетельствуют об отсутствии кожно-раздражающего и сенсибилизирующего действия. При конъюнктивальном введении субстанция диабенола в концентрациях 5 и 125 мг/мл не вызывала раздражающего и сенсибилизирующего действия ни в одном случае. Изучаемое вещество не вызывало анафилактического шока, но у нескольких животных отмечалось почесывание и беспокойство. При этом анафилактический индекс был практически одинаковым в контрольной и в опытной группе. Также в этих группах практически не отличались реакции активной кожной анафилаксии.

Субстанция диабенола ни в одной из применяемых доз при введении морским свинкам и мышам не способствовала развитию реакций гиперчувствительности замедленного типа. Кроме того, она не инициировала реакцию иммунных комплексов. Все это является основанием судить об отсутствии у диабенола аллергенных свойств.

#### **15.4. Иммуотропные свойства**

Иммуотоксическое действие диабенола оценивали по его влиянию на массу и клеточность органов иммунной системы животных (селезенку и тимус) и разные этапы иммуногенеза (клеточное звено иммунитета, конечным продуктом которого является выработка антител).

По результатам исследований, в которых диабенол вводили в дозах, соответствующих  $1/10 LD_{50}$  и  $1/100 LD_{50}$  ( $LD_{50}$  для мышей – 285 мг/кг при внутрибрюшинном способе введения), иммунодепрессивных свойств у препарата отмечено не было. Под действием диабенола не изменялись массы селезенки и тимуса мышей. При введении диабенола в максимальной дозе наблюдалось незначительное увеличение клеточности органов иммунитета, однако эти количественные сдвиги достоверно не отличались от показателей в контрольной груп-



пе. Установлено также, что препарат не оказывал прямого токсического действия на клетки иммунной системы, так как показатели жизнеспособности клеток селезенки и тимуса в опытной и контрольной группах практически не различались. Оценивая действие диабенола на В-систему иммунитета, следует отметить, что в большой дозе препарат незначительно увеличивал число антителпродуцирующих клеток селезенки и титр гемагглютининов в сыворотке крови, однако отмеченная стимуляция В-клеток не имела статистической достоверности. При изучении воздействия диабенола на функциональную активность макрофагацитарного звена иммунитета не было выявлено его существенного влияния на фагоцитарную активность крови мышей. Фагоцитарный индекс и фагоцитарное число в опытной группе мышей не отличались от соответствующих показателей в контроле. Применение препарата не сказывалось и на числе Т-лимфоцитов селезенки.

Таким образом, по результатам проведенных исследований можно сделать вывод об отсутствии достоверного влияния диабенола в испытанных дозах на иммунную систему организма. Данный вывод основывается на отсутствии у него существенного влияния на массу и клеточность органов иммунной системы и отсутствии токсического действия на клетки селезенки и тимуса подопытных мышей. Также показано, что препарат не изменял активности В-клеток и макрофагального звена иммунитета, и не оказывал влияния на Т-систему иммунитета.

## **15.5. Влияние на мутагенез**

Впервые сформулированные Boveri и Bauer представления о том, что мутации играют важнейшую роль в происхождении большинства опухолей у человека и животных получили за последние 25 лет достаточно убедительные подтверждения. Установление роли ДНК как критической мишени для действия мутагенов и канцероген-

нов дали основания считать, что индукция мутаций является инициирующим канцерогенез событием, т.е. первой и необходимой ступенью химического канцерогенеза. Понимание роли мутаций в канцерогенезе представило возможности не только для расшифровки его молекулярных механизмов, но и послужило основой для разработки методов выявления канцерогенов внешней среды по регистрации вызываемых ими мутаций.

*По результатам исследований влияния диабенола на первичную канцерогенную активность в тесте Эймса (дозы от 0,1 до 1000 мкг/пробу), генетическая активность у препарата не обнаружена, о чем свидетельствуют данные, проведенные по двум параметрам – количество ревертантов/мкг концентрации и превышение численности прототрофных колоний бактерий в опыте над соответствующим контролем.*

Об отсутствии мутагенных свойств у диабенола свидетельствуют и результаты испытаний препарата на наличие у него цитогенетических свойств, проведенные в условиях как однократного, так и субхронического воздействия в батарее тестов: пробе на сцепленные с полом рецессивные мутации у дрозофил, цитогенетическом методе (метафазный анализ) и в тесте доминантных леталей. Проведенные исследования показали, что исследуемое соединение ни в одной из доз не индуцировало частоты aberrаций хромосом в клетках костного мозга мышей и, следовательно, мутагенной активности не проявляет.

## **15.6. Заключение**

Изучение токсикологических свойств у новых потенциальных лекарственных препаратов является неотъемлемой частью доклинических фармакологических исследований. С одной стороны данные исследования позволяют оценить степень безопасного влияния препарата на организм человека в целом, на отдельные его гомеостатические структуры и качество жизни в целом, прогнозировать возмож-

ность влияния на процессы репродукции и связанные с этим процессы созревания и развития потомства. С другой стороны данные исследования позволяют определить уровень токсичности препарата и преимущества использования в сравнении с другими средствами подобного типа действия.

В этом отношении показано, что по уровню токсичности препарат диабенол относится к разряду малотоксичных соединений, с широким диапазоном безопасного действия. Его эффективные дозы, проявляющие выраженное гипогликемическое действие, оказались равны в диапазоне 1/500 (5 мг/кг) – 1/100 (25 мг/кг) от ЛД<sub>50</sub>. В этой связи, в сравнении с другими противодиабетическими препаратами, применяемыми в клинической практике для лечения инсулинезависимого сахарного диабета, диабенол менее токсичен производного бигуанидина и не уступает (за исключением букарбана и амарила) производным сульфонилмочевины I и II генерации. Результаты исследований кумулирующих свойств показали отсутствие у диабенола в дозах 5 и 25 мг/кг способности к кумуляции. Способность к кумуляции у препарата была зафиксирована лишь в дозе токсической, равной 1/10 от ЛД<sub>50</sub>. В хронических исследованиях на крысах и собаках у диабенола в дозах 5 и 25 мг/кг показано отсутствие повреждающего действия на общее состояние животных, массу тела, поведенческую и исследовательскую активности, периферическую кровь, биохимические и патоморфологические показатели органов детоксикации и выведения. Наблюдаемые в период исследований гендерные различия в поведении животных (угнетение подвижности у самцов, наоборот, активация у самок) были транзиторными и восстанавливались в период отмены. С другой стороны нельзя сбрасывать со счета побочные и токсические эффекты диабенола в дозе 125 мг/кг, зафиксированные в хронических исследованиях. Выявлялось, что под действием препарата в данной дозе у животных снижались опрятность, эмоциональное поведение и подвижность (более выраженные эффекты зарегистрированы у самцов). При этом в периферической крови

патологических изменений не прослеживалось, а функциональными, биохимическими и патоморфологическими исследованиями выявлялось обратимое влияние на процессы детоксикации (обусловленное снижением фагоцитарной активности клеток Купфера) в печени и реабсорбирующей функции почек. Положительные эффекты у диабенола, выгодно отличающие его от ряда других гипогликемических препаратов, отмечены при изучении влияния на процессы репродукции, в которых показана возможность безопасного использования препарата в дозах 5 и 25 мг/кг. В данных исследованиях также показано, что под действием препарата у животных не нарушаются процессы фертильности, а также антенатальное и неонатальное развитие потомства. Побочное действие диабенола в большой дозе на возможность появления геморрагий у антенатально созревающих плодов согласуется с данными, освещенными в главе 10, и практически не сказывалось на отдаленное созревание потомства в онтогенезе. К 2-месячному возрасту (что является абсолютной нормой) физическое и половое созревание потомства было полностью сформировано.

Специфическими токсикологическими исследованиями показано отсутствие у диабенола аллергенных и иммунотоксических свойств. У препарата не обнаружена мутагенная активность.

# ГЛАВА 16

## КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА ДИАБЕНОЛ ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2-го ТИПА

*В. И. Петров, А. А. Спасов,  
С. В. Недогода, М. П. Воронкова*

---

Для диабенола в ходе проведения I–II фазы клинических исследований эффективности, переносимости и безопасности было установлено, что его противодиабетическое действие складывается главным образом из двух основных составляющих – сахароснижающего эффекта и влияния на гемореологические свойства крови, превосходя эффективность препарата сравнения – гликлазид, по обоим показателям [И.И. Дедов, М.И. Балаболкин и др., 2008]. Действие диабенола проявлялось в условиях инсулинорезистентности, дисфункции  $\beta$ -эндокриноцитов поджелудочной железы, синдрома повышенной вязкости крови, т.е. характерных признаков манифестации СД [De Fronzo R.A., 1992, Gribble F.M., 1988, Barnes A.J., 1987]. Было выявлено, что диабенол восстанавливает физиологический профиль секреции инсулина, снижает уровень HbA<sub>1c</sub>, подавляет агрегацию тромбоцитов, нормализует липидный обмен.

### 16.1. Дизайн исследования

На завершающем этапе исследования было проведено рандомизированное контролируемое сравнительное исследование эффективности, переносимости и безопасности препарата диабенол – III фаза клинических исследований. Целью исследования явилась оценка эф-

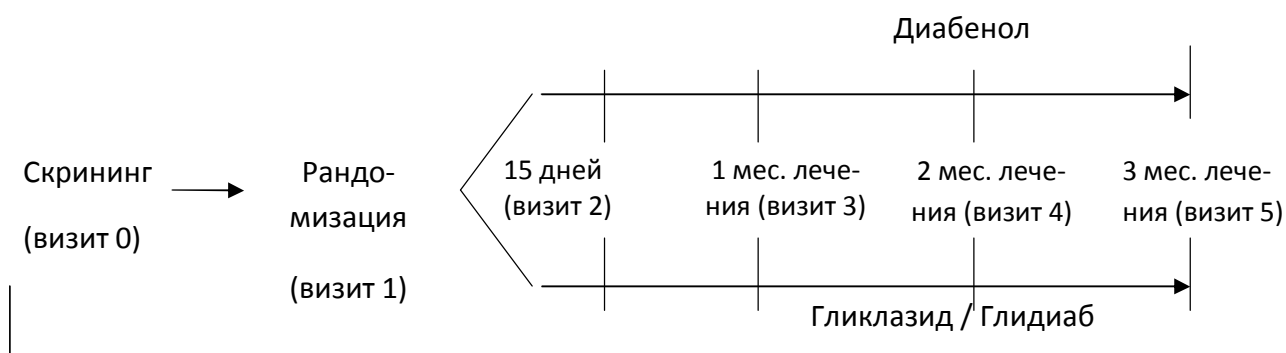
фективности, переносимости и безопасности препарата диабенол – нового гипогликемического лекарственного средства, оказывающего влияние на тромбогенный потенциал и реологические свойства крови у больных сахарным диабетом 2 типа. Исследования проводились на базе следующих учреждений [Дедов И.И., 2002].

1. ФППО ММА им. И.М Сеченова, кафедра эндокринологии и диабетологии, на базе Клинической больницы № 67 г. Москвы (руководитель – профессор, д.м.н. Балаболкин М.И.).

2. ФГУ Эндокринологический Научный Центр Ростехнологий, отделение диабетической нефропатии и гемодиализа г. Москвы (руководитель – профессор, д.м. н. Шестакова М.В.).

3. ГУЗ Областная клиническая больница № 3 г. Волгограда (руководитель – зав. центром Горбаткова И.В.).

Пациенты, отбираемые для данного исследования, находились на амбулаторном лечении под наблюдением сотрудников указанных клинических центров. Инструментальные и лабораторные исследования, запланированные по протоколу, проводились на базах указанных центров, в формате рандомизированного контролируемого сравнительного исследования по схеме, представленной на рис. 16.1.



**Рис. 16.1. Схема исследования**

В ходе первого визита пациентов оценивали соответствие кандидатов критериям включения/исключения:

Критерии включения:

- пациенты обоего пола в возрасте 30–65 лет;
- больные сахарным диабетом 2 типа;

- письменное согласие пациента на участие в исследовании.

Критерии исключения:

- больные лабильным сахарным диабетом;
- больные, имеющие поздние осложнения сахарного диабета в тяжелой форме;
- больные, находящиеся в острой стадии сопутствующих заболеваний;
- беременность и лактация.

Все пациенты знакомились с информацией об исследовании и подписывали утвержденную форму информированного согласия. После этого пациентам проводили скрининговое обследование и, в случае соответствия пациента критериям включения, исследователь проводил процедуру рандомизации пациента в одну из двух групп, получающих либо диабенол, либо гликлазид. После проведения этой процедуры пациентам назначали лечение и выдавали препарат. В дальнейшем пациенты совершали к врачу еще 4 визита – через 15 дней, через 1, 2 и 3 месяца лечения, во время которых оценивались эффективность и безопасность лечения, производился учет принятого пациентом препарата и выдача новых упаковок. Общая продолжительность участия каждого пациента в исследовании составляла 3 месяца.

В исследование были включены 180 больных сахарным диабетом 2 типа (48 мужчин и 132 женщины) с неудовлетворительной компенсацией углеводного обмена на предшествующей моно- или комбинированной пероральной сахароснижающей терапии различными препаратами, прошедшие обследование в клиниках, участвовавших в исследовании, из которых 120 больных в дальнейшем находились на лечении диабенолом, а 60 человек получали препарат сравнения гликлазид. Перед началом исследования, а также в динамике наблюдения (через 15 дней, через 1, 2 и 3 месяца приема препарата) у пациентов оценивали жалобы, качество жизни, определяли следующие лабораторные показатели в соответствии со схемой наблюдения:

- *Общий анализ крови* – гемоглобин, гематокрит, эритроциты, лейкоциты (общее число с формулой), тромбоциты.

- *Сахар крови* (натощак, через два часа после завтрака).
- *Уровень инсулина в сыворотке крови* натощак и через 2 часа после приема пищи.
- *НВА1с.*
- *Биохимический анализ крови* – креатинин, мочеви́на, АСТ, АЛТ, общий билирубин.
- *Коагулографический анализ крови* – фибриноген, протромбиновое время, тромбиновое время, АПТВ.
- *Общий анализ мочи* – удельный вес, РН, белок, сахар, эритроциты, лейкоциты, цилиндры, кетоновые тела.
- *Тромбоцитарная агрегометрия* – индукция АДФ, индукция адреналином, индукция коллагеном.
- *Вязкость крови и агрегация эритроцитов.*

В ходе исследования пациентам предлагалось принять таблетку диабенола до еды не разжевывая. Первоначальная разовая доза – 0,2 г. Суточная доза – 0,4 г. Частота применения – 2 раза в день. Продолжительность лечения для обеих групп составляла три месяца.

Включение пациента в ту или иную группу исследования (диабенол/гликлазид) производилось согласно протоколу рандомизации в соотношении 2 к 1 (2 комплекта конвертов).

Для параметрических показателей вычисляли среднее значение, ошибку среднего или стандартное отклонение. Сравнение средних осуществляли с помощью *t*-критерия Стьюдента для зависимых и независимых переменных (при нормальном распределении признака). Величина выборок в данном исследовании была достаточной для проведения адекватного статистического анализа и оценки клинической эффективности препарата.

Средний возраст пациентов, включенных в исследование, составил  $60,2 \pm 6,5$  лет. Длительность манифестации СД 2-го типа на момент включения в исследование составляла в среднем  $4,7 \pm 1,15$  года.

Исходный уровень гликированного гемоглобина составил  $8,8 \pm 0,37$  и  $9,0 \pm 0,37$  % в группах диабенола и гликлазида. Уровень глюкозы крови натощак и спустя 2 часа после приема пищи составлял



соответственно  $10,2\pm 0,47$  и  $11,9\pm 0,76$  ммоль/л в группе диабенола и  $8,5\pm 0,36/9,9\pm 0,41$  в группе гликлазид. Уровень ИРИ составил  $21,8\pm 1,95$  и  $17,06\pm 1,94$  мкЕд/мл в группах диабенола и гликлазида, соответственно.

Исходные показатели липидного обмена в группе больных с диабенолом составили: ОХ –  $6,8\pm 1,5$  ммоль/л, ЛПНП –  $3,7\pm 0,6$  ммоль/л, ЛПВП –  $0,96\pm 0,54$  ммоль/л, ТГ –  $3,4\pm 0,77$  ммоль/л, а в группе с гликлазидом – ОХ –  $6,2\pm 0,93$  ммоль/л, ЛПНП –  $1,32\pm 0,21$  ммоль/л, ЛПВП –  $3,38\pm 0,61$  ммоль/л и ТГ –  $2,5\pm 0,54$  ммоль/л.

Стоит отметить, что в ходе проведения первичного обследования у пациентов были выявлены различные сосудистые осложнения СД, в том числе: диабетическая ретинопатия была диагностирована у 76 больных (1-й степени у 48 чел, 2-й степени – у 25 и 3-й степени – у 3 чел), диабетическая полинейропатия 1-й степени у 46 пациентов. Диабетическая нефропатия на стадии микроальбуминурии была диагностирована у 13 пациентов.

## **16.2. Результаты оценки эффективности препарата диабенол**

Под влиянием проводимого лечения диабенолом отмечалось снижение показателей гликемии натощак и постпрандиальной гликемии, и через 12 недель лечения она уменьшалась на 31,3% и 26,0 %, соответственно ( $p<0,05$ ) (табл. 16.1). Эти показатели для пациентов, получавших гликлазид, в этот же временной период снизились на 20,0% и 20,2%, соответственно (табл. 16.2).

Таблица 16.1

**Влияние диабенола на индекс массы тела, показатели давления и уровень глюкозы натощак и через 2 часа после приема пищи ( $M \pm m$ )**

Показатель	Исходно	2 недели	4 недели	8 недель	12 недель
Визиты	1	2	3	4	5
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	30,0±0,65	30,2±0,95	29,9±0,90	29,8±0,90	29,6±0,79
САД, мм рт. ст.	156,4±5,49	147,0±4,42	145,8±4,04	144,3±3,37	141,7±4,09
ДАД, мм рт. ст.	93,3±3,04	90,6±4,77	89,9±4,42	89,0±4,75	86,8±3,77
ЧСС, уд/мин	75,6±1,16	74,8±1,17	74,4±0,59	74,1±0,91	74,0±0,91
Глюкоза натощак, моль/л	10,2±0,47	8,9±0,55	7,8±0,41	7,4±0,43*	7,0±0,41*
Глюкоза через 2 ч после еды, моль/л	11,9±0,76	11,0±0,58	10,4±0,47	9,5±0,41*	8,8±0,32*

\*Данные статистически значимы (t) по отношению к исходным значениям (p<0,05).

Таблица 16.2

**Влияние гликлазида на уровень глюкозы натощак и через 2 часа после приема пищи ( $M \pm m$ )**

Показатель	Исходно	12 недель лечения
Глюкоза натощак, моль/л	8,5±0,36	6,8±0,31*
Глюкоза через 2 часа после еды, моль/л	9,9±0,41	7,9±0,40*

\*Данные статистически значимы (t) по отношению к исходным значениям (p<0,05).

Влияние изучаемых препаратов на уровень гликированного гемоглобина. После приема диабенола уровень гликированного гемоглобина достоверно снижался как в группе пациентов, получавших диабенол (на 12,5%), так и в группе пациентов, получавших гликлазид (на 11,1%) (табл. 16.3).

**Влияние диабенола и гликлазида на уровень HbA1c (%)  
через 12 недель лечения (M±m)**

Группы пациентов	HbA1c (%)	
	Исходно	12 недель лечения
Группа диабенол	8,8±0,37	7,7±0,24*
Группа гликлазид	9,0±0,37	8,0±0,34*

\*Данные статистически значимы (t) по отношению к исходным значениям (p<0,05).

При сопоставлении полученных данных с результатами влияния диабенола на уровень тощачевой и постпрандиальной глюкозы можно сделать вывод о выраженном сахароснижающем действии диабенола у больных с СД типа 2.

Влияние изучаемых препаратов на уровень инсулина в сыворотке крови. В плазме крови пациентов, получавших диабенол, было отмечено повышение содержания концентрации инсулина (табл. 16.4), сопоставимое с таковым для группы пациентов, получавших гликлазид, что может свидетельствовать о стимуляции секреции эндогенного инсулина, присущее для характерных представителей производных сульфонилмочевины [Ashcroft, F.M, 2002].

**Влияние диабенола на уровень инсулина в сыворотке крови  
натощак и через два часа после приема пищи (M±m)**

Показатели	Исходно	12 недель лечения
Инсулин натощак, мкЕд/мл	9,7±0,84	9,98±1,00
Инсулин через 2 часа после еды, мкЕд/мл	21,8±0,95	24,3±0,76*

\*Данные статистически значимы (t) по отношению к исходным значениям (p<0,05).

Влияние изучаемых препаратов на гемореологические свойства крови и тромбогенный потенциал. В ходе исследования было изучено влияние диабенола и гликлазида на тромбогенный потенциал крови, параметры коагуляции и вязкость крови.

Влияние изучаемых препаратов на агрегацию тромбоцитов. При проведении экспериментов было установлено, что в группах пациентов до начала лечения и диабенолом, и гликлазидом отмечено увеличение агрегации тромбоцитов, выявленное с применением различных индукторов агрегации (табл. 16.5).

Таблица 16.5

**Влияние диабенола и гликлазида на агрегацию тромбоцитов  
(M±m)**

Индукторы	Показатели	Группа диабенол		Группа гликлазид	
		исходно	12 недель лечения	исходно	12 недель лечения
5 мкМ АДФ	ИАТ	8,21±0,73	6,22±0,69*	11,4±1,33	8,49±0,88
	ИДТ	153,6±2,85	155,4±3,43	145,1±3,55	141,8±5,71
	МН	12,0±2,06	10,38±1,53	12,8±2,77	16,5±3,53
10 мкМ Адреналин	ИАТ	6,89±0,77	6,16±0,76	6,90±0,96	6,66±0,71
	ИДТ	166,4±4,17	171,38±3,55	164,4±5,55	163,8±4,13
	МН	8,09±1,28	6,29±0,96	9,68±1,51	8,72±1,12
Коллаген	ИАТ	8,10±0,61	5,89±0,88*	8,22±1,082	6,91±0,97
	ИДТ	169,4±2,72	170,85±5,93	149,1±4,62	160,6±5,26
	МН	8,42±1,01	9,03±2,46	15,8±3,04	15,6±2,82

\*Данные статистически значимы (t) по отношению к исходным значениям (p<0,05).

После 12-недельного применения диабенол оказывал нормализующее влияние на показатель активности тромбоцитов, достоверно ингибируя АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов, снижая: ИАТ на 24,2 % (p<0,05), адреналин-индуцированную на 10,5 % (p<0,5) и коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов на 27,2 %. Также при лечении диабенолом наблюдалось увеличение ин-

декса дезагрегации тромбоцитов крови при использовании различных индукторов. В то же время, стоит отметить, что при проведении аналогичного комплекса исследований в отношении гликлазида, не смотря на зафиксированное снижение агрегации тромбоцитов и ИАТ, достоверно значимых результатов получено не было.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что диабенол при трехмесячном применении ингибирует агрегацию тромбоцитов, индуцированную всеми примененными индукторами, что свидетельствует о его влиянии на все пути активации тромбоцитов.

Влияние изучаемых препаратов на параметры коагулограммы. На фоне лечения диабенолом в плазме крови пациентов имелась тенденция к увеличению ТВ на 15,5% и АПТВ на 8,2 % (табл. 16.6). На скорость свертывания крови по внешнему пути активации или величину ПТВ диабенол оказывал нормализующее действие, достоверно увеличивая его продолжительность на 20,9 %. Содержание фибриногена в этой экспериментальной группе практически не изменялось в течение 3 месяцев лечения.

Таблица 16.6

**Влияние диабенола и гликлазида на показатели коагулограммы плазмы крови (M±m)**

Показатели	Группа дибенонл		Группа гликлазид	
	Исходно	12 недель лечения	Исходно	12 недель лечения
ТВ, с	20,6±1,24	23,8±1,70	19,2±4,44	21,9±3,65
ПТВ, с	24,4±1,40	29,5±1,76*	28,0±1,42	34,2±1,15*
АПТВ, с	41,3±1,70	44,7±2,12	43,0±5,41	46,1±3,49
ФГ г/л	4,8±0,28	4,5±0,22	5,1±0,91	4,9±0,67

*Примечание.* ФГ – фибриноген (г/л); ПТВ – протромбиновое время (с); ТВ – тромбиновое время (с); АПТВ – активированное парциальное тромбoplastинное время (с).

\*Данные статистически значимы по отношению к исходным значениям, t критерий Стьюдента (p<0,05).

В группе пациентов, принимающих гликлазид, сдвиг показателей коагуляционных тестов в сторону гипокоагуляции выражался в увеличении ТВ, ПТВ и АПТВ на 14,0 %, 22,1 % ( $p < 0,05$ ) и 7,2 %, соответственно (табл. 16.6). Содержание фибриногена в плазме образцов крови, также как и при применении диабенола, не изменялось.

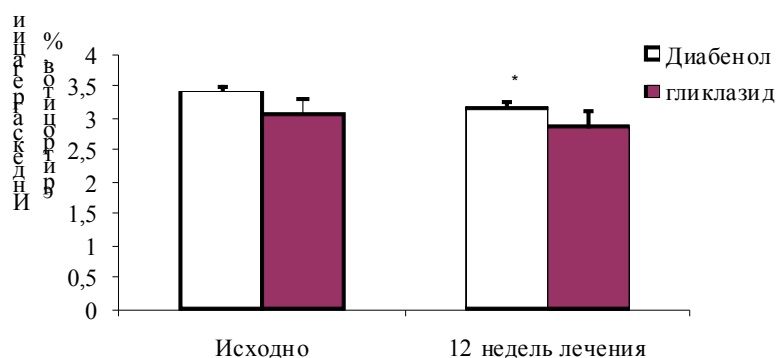
Влияние исследуемых соединений на вязкость крови. При лечении диабенолом отмечалось значительное снижение вязкости крови на всех скоростях сдвига (табл. 16.7). Так при скоростях сдвига  $300 \text{ с}^{-1}$ ,  $50 \text{ с}^{-1}$ ,  $10 \text{ с}^{-1}$ ,  $3 \text{ с}^{-1}$  показатель вязкости достоверно уменьшался на 11,6 %, 25,6 %, 12,7 % и 16,4 %, соответственно. В то же время прием гликлазида приводил к незначительному и не достоверному снижению показателей вязкости крови (табл. 16.7).

Таблица 16.7

### Влияние диабенола и гликлазида на вязкость крови ( $M \pm m$ )

Группы	Скорость сдвига, сПз			
	$300 \text{ с}^{-1}$	$50 \text{ с}^{-1}$	$10 \text{ с}^{-1}$	$3 \text{ с}^{-1}$
Группа диабенол				
До лечения	$4,3 \pm 0,06$	$7,8 \pm 1,5$	$8,6 \pm 0,1$	$14,6 \pm 0,2$
После лечения	$3,8 \pm 0,08$	$5,8 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,1$	$12,2 \pm 0,3$
p	0,0007	0,03	0,0001	0,0002
Группа гликлазид				
До лечения	$4,50 \pm 0,10$	$6,0 \pm 0,15$	$11,2 \pm 0,24$	$13,6 \pm 0,33$
После лечения	$4,27 \pm 0,06$	$5,99 \pm 0,15$	$10,09 \pm 0,16$	$12,2 \pm 0,22$
p	0,06	0,15	0,11	0,22

Изменения вязкости крови, зарегистрированные при лечении диабенолом, подтверждались достоверным снижением индекса агрегации эритроцитов (рис. 16.2).



**Рис. 16.2. Влияние препаратов диабенол и гликлазида на индекс агрегации эритроцитов. \*Данные статистически значимы (t) по отношению к исходным значениям (p<0,05)**

Влияние изучаемых препаратов на лабораторные показатели. Для определения безопасности лечения проводили оценку лабораторных показателей периферической крови и мочи (табл. 16.8, 16.9).

*Таблица 16.8*

**Влияние диабенола и гликлазида на показатели липидного обмена у больных СД 2 (M±m)**

Показатели	Группа дибенол		Группа гликлазид	
	исходно	12 недель лечения	исходно	12 недель лечения
ОХ, ммоль/л	6,8±1,50	6,3±1,50	6,2±0,93	5,19±0,95
ЛПВП, ммоль/л	0,96±1,54	0,97±0,34	1,32±0,21	1,37±0,57
ЛПНП, ммоль/л	3,7±0,60	3,4±0,62	3,38±0,61	3,01±0,57
ТГ, ммоль/л	3,4±0,77	2,7±0,70	2,5±0,54	2,0±0,64

\*Данные статистически значимы (t) по отношению к исходным значениям (p<0,05).

При исследовании морфологических показателей общего анализа крови со стороны «красной» и «белой» крови не было выявлено никаких отклонений от физиологической нормы. Кроме того, не было

отмечено влияния диабенола на функциональные показатели печени и почек. Со стороны мочевыделительной системы после трехнедельного курса приема диабенола не отмечалось усиления глюкозурии, альбуминурии, не было зафиксировано наличия форменных элементов крови и кетоновых тел.

Таблица 16.9

**Динамика показателей периферической крови и мочи на фоне лечения диабенолом и гликлазидом**

Показатель	Группа диабенол		Группа гликлазид	
	исходно	12 недель лечения	исходно	12 недель лечения
Общий анализ крови				
Гемоглобин, г/л	144,9±1,5	140,0±2,1	131,1±15,0	125,0±29,6
Ht	41,5±0,62	40,03±0,62	37,8±6,4	39,2±4,3
Эритроциты, (x10 <sup>9</sup> )/л	4,75±0,05	4,54±0,08*	4,3±0,39	4,33±0,3
Лейкоциты (x10 <sup>6</sup> )/л	7,47±0,53	6,93±0,32	5,93±0,92	5,93±1,0
Биохимические показатели				
Креатинин	97,0±3,83	105,8±3,85	90,7±17,9	98,9±27,2
Мочевина	5,93±0,29	5,93±0,31	5,18±1,16	5,37±1,3
АСТ	30,8±3,0	24,67±2,36	0,42±0,18	0,38±0,08
АЛТ	36,3±4,89	26,16±4,57	0,39±0,11	0,40±0,15
Общ. билирубин	14,9±0,93	12,81±0,52*	12,5±2,95	13,8±2,49
Общий анализ мочи				
Удельный вес	1015±1,1	1017±2,53	1016±5,7	1015±4,4
pH	кислый	кислый	кислый	кислый
Сахар	0,06±0,03	0,08±0,05	0,06±0,23	0,03±0,01
Белок	0,05±0,05	0,0±0,00	0,02±0,11	0,01±0,03
Лейкоциты, в п/зр	7,6±3,09	4,84±1,97	3,55±2,87	4,35±2,1
Эритроциты	0	0	0,05±0,23	0
Кетон. тела	0	0	0	0

\*Данные статистически значимы (t) по отношению к исходным значениям (p<0,05).

Обобщая полученные результаты можно сделать вывод о том, что терапия препаратом диабенол по безопасности лечения сопоставима с препаратом гликлазид. Лишь у 5 больных, из общего числа пациентов принимающих участие в исследовании, отмечались побоч-



ные явления, которые проявлялись у одного пациента в виде неприятных ощущений в области живота, а у двух пациентов – в виде зуда кожи, в связи с которыми больные самостоятельно прекратили прием препарата и участие в исследовании.

### 16.3. Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что под влиянием проводимого лечения диабенолом в течение 12 недель, отмечалось существенное снижение показателей как уровня глюкозы в плазме крови натощак, так и постпрандиальной гликемии, а также уровня гликированного гемоглобина, что свидетельствует о прямом сахароснижающем действии диабенола у больных с СД типа 2. При этом было отмечено, что исследуемый препарат оказался наиболее эффективен в условиях инсулинорезистентности, дисфункции бета-клеток поджелудочной железы, синдрома повышенной вязкости крови. В плазме крови пациентов, получавших диабенол, было отмечено повышение содержания концентрации инсулина, сопоставимое с таковым для группы пациентов, получавших гликлазид, что может свидетельствовать о стимуляции секреции эндогенного инсулина, присущее для характерных представителей производных сульфонилмочевины.

Кроме того, при синдроме повышенной вязкости крови, которая неизбежно формируется при длительном течении СД типа 2 при трехмесячном применении диабенола было выявлено его влияние на реологические свойства крови. Так, отмечалось достоверное снижение вязкости крови на различных скоростях сдвига, моделирующих скорость кровотока характерного как для сосудов крупного, так и мелкого калибра. Диабенол влияет на тромбогенный потенциал крови, ингибируя агрегацию тромбоцитов, индуцированную коллагеном и АДФ, что свидетельствует о влиянии изучаемого препарата на важные пути активации агрегации тромбоцитов. В ходе проведения исследования было выявлено, что диабенол также влияет и на

коагуляционный гемостаз – что свидетельствует о нормализующем действии диабенола на скорость свертывания крови по внешнему и внутреннему пути активации.

При исследовании безопасности применения диабенола не было выявлено значимых изменений со стороны общего анализа крови и мочи, а также биохимических показателей крови.

По результатам проведенного рандомизированного контролируемого сравнительного исследования эффективности, переносимости и безопасности препарата диабенол во время III фазы клинических исследований, можно сделать вывод о том, что диабенол, при применении в течение 3 месяцев оказывает достаточный сахароснижающий эффект и практически не имеет побочных эффектов, что позволяет рекомендовать его для использования в клинической практике в качестве гипогликемического средства для лечения СД типа 2, осложненного ангиопатиями.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

---

История создания лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета определялась и определяется достижениями в области фундаментальной медицины – первоначально была доказана роль поджелудочной железы и островков Лангерганса в развитии данной патологии, затем выделена и расшифрована структура инсулина, инсулинового рецептора и транспортеров глюкозы; установлена роль печени и ферментов гликогенолиза, способствующие усилению образования глюкозы, приводящей к гипергликемии и установлению молекулярных механизмов развития резистентности к инсулину, роли инкретиновой системы и транспортера  $N^+$ /глюкозного обмена в почках,  $\alpha$ -глюкозидаз кишечника.

Инсулинорезистентность в первую очередь определяется разобщением инсулиновой сигнализации на уровне белка инсулинового рецептора IRS. В основе данного явления лежит единый механизм его фосфорилирования по остатку аминокислоты серина, выполняемые разными внутриклеточными протеинкиназами. Мышцы, печень и жировая ткань являются первичными органами-мишенями развития инсулинорезистентности (Ткачук В.А., 2014). Установлено, что выраженность инсулинорезистентности коррелирует, в первую очередь, с накоплением жиров внутри клеток (Snel M, 2012). Именно внутриклеточные липиды нарушают передачу сигнала от рецептора инсулина и вызывают снижение инсулин-зависимого захвата глюкозы. Также установлена важная роль цАМФ-зависимой протеинкиназы (АМРК), которая является энергетическим «сенсором» клетки, т.к. АМРК через TORC I – первого белкового комплекса на основе mTOR является переключателем между катаболизмом и анаболизмом клетки. В 2001 году было показано, что в основе молекулярного механизма действия метформина лежит стимулирующее действие на АМРК

(Steinberg G. R, 2009). Считается, что АМРК-активирующая активность метформина и определяет его плеiotропные эффекты (Аметов А.С., 2015).

Учитывая, что в литературе (Carpio S., 1984) описано антидиабетогенное действие противоглистного средства, содержащего в гетероциклической структуре гуанидиновую группу – мебендазола (5-бензил-2-(метоксикарбонил)-аминобензимидазола), нами был проведен синтез новых циклических производных аминобензимидазола, содержащих в положении С1,2-а дополнительный цикл (имидазольный, дигидроимидазольный, тетрагидропиримидиновый или триазольный). При изучении гипогликемической активности данных соединений были получены разнонаправленные эффекты на содержание глюкозы в крови животных.

По коэффициенту информативности классов изучаемых соединений, полученных на основе прогнозной оценки с помощью информационных технологий PASS и Микрокосм (по обучающей выборке известных гипогликемических препаратов и по обучающей выборке испытанных неконденсированных и конденсированных производных аминобензимидазола) и результатам экспериментального изучения на животных, наиболее перспективными классами соединений, снижающих уровень глюкозы крови, были N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а]бензимидазолы. То есть, данные трициклические структуры, содержащие встроенную гуанидиновую группировку, оказались более активными, чем производные неконденсированного аминобензимидазола.

В последующем, при проведении подструктурного анализа и методом медианных и супремальных оценок *in silico*, выделен класс N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолов как наиболее перспективный для поиска гипогликемических соединений. То есть было установлено, что данный скаффолд более предпочтителен, чем аминобензимидазол, N<sup>1</sup>дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазол и N<sup>9</sup>имидазо[1,2-а]бензимидазол.

При проведении подструктурного анализа уровня гипогликемической активности у активного скаффолда определен химический признак (заместитель) определяющий наибольший фармакологический эффект – диэтиламиноэтил у 9 атома азота. По данным частотного анализа физико-химических параметров экспериментально изученных производных активного скаффолда, выявлен значимый признак высокой гипогликемической активности – заряд на внутреннем цикле имидазольного кольца конденсированной системы Q (Imid<sub>1</sub>)cs  $\geq -0,109$ .

Весьма интересный раздел работы был связан с изучением целесообразности изучения фармакологических свойств у наиболее активного соединения РУ-254 (диабенол) – определение лекарствоводных свойств по расчетным показателям ADME (всасывание, распределение, метаболизм, экскреция) с помощью программы DruliTo и QikProp. Установлено, что диабетол имеет более высокие количественные оценки лекарственного подобия, чем метформин и глибенкламид. То есть его расчетные фармакокинетические параметры являются более благоприятными для проведения расширенных доклинических исследований.

В опытах на белых беспородных крысах и кроликах диабетол оказывал выраженное сахароснижающее действие, в том числе и при углеводных нагрузках. Изучаемое соединение снижало гликемию как у животных с нарушенной толерантностью к глюкозе (у крыс с тяжелой формой стрептозотоцинового диабета и синдромом инсулинорезистентности), так и у животных с аллоксановым диабетом, у кроликов с острой инсулиновой недостаточностью (при введении животным антиинсулиновой сыворотки морских свинок). В опытах на собаках с удаленной поджелудочной железой диабетол не снижал уровень гликемии, но усиливал гликемическое действие экзогенно введенного инсулина.

При изучении механизма антидиабетогенного действия, у диабетолола выявлен как панкреатотропный компонент действия, так и внепанкреатический. Его панкреатотропное влияние определяется

увеличением 1-й фазы секреции инсулина, особенно в условиях глюкозной нагрузки. Соединение диабенол повышает в присутствии инсулина поглощение глюкозы мышцами диафрагмы крыс. В условиях аллоксанового диабета на крысах диабенол восстанавливал содержание гликогена, скорость гликолиза и тормозил гликогенолиз в инсулинозависимых органах и тканях (печень, поперечнополосатая мышца) и практически не влиял на эти показатели в инсулинзависимом органе – почках.

Можно предположить, что усиление инсулиотропного эффекта диабенола связано с возможным инкретиномиметическим эффектом. В исследованиях Н.Н.Золотова (2013) показана способность диабенола ингибировать фермент дипептидилпептидазу типа 4 (DPP-4), приводящую к модуляции инсулинового ответа. В наших исследованиях диабенол также ингибировал DPP-4, но в более высоких концентрациях, которые невозможно создать в организме животного. Соединение диабенол незначительно изменяло постпрандиальную гликемию при нагрузке крахмалом и не влиял при сахарной нагрузке, то есть не оказывал действия на  $\alpha$ -глюкозидазу кишечника. Акарбоза в данных исследованиях подавляла постпрандиальную гликемию.

Большой интерес представляло испытание диабенола на модели стрептозотоцин-никотинамидной интоксикации при его длительном введении. Диабенол в дозе 25 мг/кг при введении внутрь в течение 4 недель снижает более чем в 2 раза объем потребляемой жидкости, уровень гликированного гемоглобина – на 2,2 %, увеличивал содержание С-пептида, уровень гликемии снижал почти в 2 раза. Под влиянием диабенола отмечается достоверное увеличение среднего количества островков Лангерганса в селезеночном отделе и достоверное увеличение площади ядер панкреатических  $\beta$ -клеток поджелудочной железы. Изучаемое соединение не влияло на индекс апоптоза (% каспазо-3 позитивных клеток) и индекс пролиферации (PCNA-позитивные и Ki-позитивные клетки) эндокриноцитов островков Лангерганса. То есть, изучаемое соединение не оказывало действия на процессы регенерации и образования

новых клеток, продуцирующих инсулин, а предотвращало токсическое действие стрептозотоцина на  $\beta$ -клетки.

Учитывая сложный генез сахарного диабета 2-го типа для повышения эффективности антидиабетической терапии в клинической практике, активно используются комбинированные лекарственные средства (фиксированные комбинации) позволяющие проводить мультитаргентное воздействие на несколько ключевых звеньев патогенеза основного заболевания или его осложнений (Аметов А.С., 2015). В данном исследовании были определены оптимальные соотношения диабенола с метформином (1:4) и глибенкламидом (5:1) в опытах на крысах со стрептозотоцин-никотинамидным диабетом. При введении этих фиксированных комбинаций доказана их эффективность как по влиянию на уровень гликемии, динамику снижения гликированного гемоглобина, уровень С-пептида, восстановление  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, так и по показателям углеводного обмена – гликогена печени и гликогенолизу.

Очень важным аспектом генеза сахарного диабета является активация перекисного окисления липидов, продукт которого имеет важное значение в развитии дисфункции  $\beta$ -клеток и инсулинорезистентности (Балаболкин М.И., 2005). В этой связи в клинической практике схемы комбинированной терапии диабета стали включать антиоксидант – например, липоевую кислоту (Evans J.L., 2000). На первом этапе в настоящем исследовании было изучено прямое действие некоторых антидиабетических средств на свободнорадикальные процессы *in vitro*. Установлено, что диабенол является скапенджером супероксид-аниона, гидроксильного и пероксильного радикалов; росиглитазон активен только в отношении супероксид-аниона, гликлазид оказывал антирадикальное влияние в опытах сДФПГ, метформин и глибенкламид в модельных системах *in vitro* на эти процессы не влияли. Вместе с тем, установленные прямые антиоксидантные свойства некоторых изученных препаратов сложно зафиксировать *in vivo*, так как *in vitro* они оказывали действие в больших концентрациях.

В данном исследовании была определена оптимальная комбинированная смесь диабенола и липоевой кислоты (2,8:1 и 5,6:1) и изучена ее активность на модели стрептозотоцин-никотинамидной интоксикации крыс. Установлено, что данная комбинация оказывает более выраженное антидиабетическое действие, чем монотерапия диабенолом. Более важный факт данного исследования – значительно снижается содержание продуктов перекисного окисления липидов в печени, поджелудочной железе и почках продуктов перекисного окисления липидов. В поджелудочной железе при стрептозотоциновой интоксикации при сочетанном введении диабенола с липоевой кислотой активно происходит сохранение  $\beta$ -клеток.

Известно, что при диабете повышается тромбогенный потенциал крови и ее вязкость (Morel O., 2010). Данный эффект связан не только с гиперосмомолярностью крови из-за гипергликемии, но и повышением агрегируемости тромбоцитов и эритроцитов. Из применяемых в клинической практике антидиабетических средств только гликлазид оказывает прямое действие на тромбоциты (Siluk D., 2002) у остальных средств подобный эффект отмечается только при длительной терапии. Учитывая то обстоятельство, что при диабете частота тромбообразований повышена, нами изучено влияние диабенола на агрегационные свойства тромбоцитов, эритроцитов и влияние на микроциркуляцию.

Установлено, что диабенол как *in vitro*, так и в условиях целого организма оказывал антиагрегантное действие. Вероятно, данное действие на функциональную активность тромбоцитов определяется влиянием диабенола на баланс простаглицина и тромбксана  $A_2$ . Диабенол оказывал антитромбогенное действие на модели тромбоза индуцированного электрическим током сонной артерии и при системных адреналин-коллагеновых тромбозах, превосходя по активности гликлазид.

Изучаемое соединение снижает агрегируемость и повышает деформабельность эритроцитов в норме и более выражено при экспериментальном диабете. С помощью флюоресцентных зондов показа-



но, что диабенол увеличивает электроотрицательность заряда мембраны, что и определяет снижение агрегации их вследствие «электростатического распора» между ними (В.Л. Сигал, 1988), снижается микровязкость мембраны эритроцитов, что и приводит к повышению их деформабельности.

Вероятно, вследствие снижения тромбогенного потенциала и вязкости крови, диабенол усиливает выживаемость кожного лоскута у интактных и у животных с аллоксановым диабетом. Исследователи под руководством член-кор. РАН Галено-Ярошевского считают, что это могло быть связано и «с оптимизацией энергетического обмена в кожном лоскуте».

При изучении лекарственной безопасности субстанции и лекарственной формы (таблетки, содержащие 0,2 г действующего компонента) диабенола были изучены острая и хроническая токсичность, кумулятивные свойства, иммунотоксичность, влияние на канцерогнез и трансплацентарное действие. В терапевтической дозе препарата не выявлено неблагоприятных эффектов, в дозах субтоксических отмечались опустошение  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, тромбоцитарная геморрагия.

При длительном введении диабенола с питьевой водой низкоразовым мышам NMRI, трансгенным мышам HER-2/neu и крысам линии ЛЮ токсического и канцерогенного эффекта не отмечено. Установлен интересный факт – диабенол у мышей NMRI задерживал развитие возрастных нарушений экстракальной функции, увеличивал продолжительность жизни животных. Препарат тормозил появление спонтанных опухолей, уменьшал частоту злокачественных лимфом, тормозил возникновение и развитие риска толстой кишки у крыс, вызванных 1,2-диметилгидразином. Авторы данного раздела исследования во главе с член-кор. РАН В.Н. Анисимовым делают вывод, что диабенол оказывает антиканцерогенное и геропротекторное действие. То есть диабенол, содержащий в структуре молекулы гуанидиновую группу, оказывает в эксперименте, как и производные бигуанидов (метформин), противоопухолевое влияние и геропротекторное действие.

На основании данных по изучению фармакокинетики диабенола установлено, что величины периода полувыведения и среднего времени удерживания позволяют полагать, что изучаемое вещество достаточно быстро подвергается элиминации. Препарат хорошо проникает в органы и ткани, особенно с высокой степенью васкуляризации. В процессах элиминации соединения большую роль играют процессы его метаболизма.

Клинические исследования препарата диабенол проводились на 180 больных сахарным диабетом 2-го типа. Препарат назначался в твердой лекарственной форме (таблетки по 0,2 г) 2 раза в день внутрь. Схема исследования – рандомизированное контролируемое сравнительное исследование эффективности, переносимости и безопасности. В качестве препарата сравнения был выбран глидиаб (гликлизид). Диабенол, при курсовом назначении, снижал показатели гликемии натощак и постпрандиальную гликемию, к концу 3-го месяца снижал уровень гликированного гемоглобина на 1,1 %, повышал содержание инсулина после приема пищи. Диабенол снижал агрегируемость тромбоцитов, повышал деформабельность эритроцитов и снижал их агрегируемость, нормализовал коагуляционный гемостаз.

На основании клинических и лабораторных показателей больных, можно сделать вывод, что диабенол в дозе 0,4 г в сутки при назначении в течение 3 месяцев не оказывал неблагоприятных и токсических эффектов.

На основании проведенных исследований можно утверждать, что аминокбензимидазолы являются универсальной привилегированной подструктурой, которую можно использовать для поиска новых антидиабетогенных средств. Приведенная модификация, за счет создания трициклических структур, позволила выявить оптимальный скаффолд – N<sup>9</sup>-2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазол и в этом классе химических соединений найти соединения с высокой сахароснижающей активностью.

Выявленное активное соединение диабенол как в эксперименте, так и в клинических условиях повышает секрецию инсулина и снижа-

ет резистентность ткани к глюкозе. Также у диабенола есть выраженный эффект установленный в эксперименте и подтвержденный в клинических исследованиях – снижение тромбогенного потенциала и вязкости крови. Установлено, что диабенол, как и производное бигуанидов метформин, в эксперименте оказывают антиканцерогенное и геропротекторное влияние.

Таким образом, новое циклическое аминобензимидазольное производное – диабенол, содержащее гуанидиновую группу, оказывает фармакологические эффекты, характерные как для производных бигуанида (снижение гипергликемии, гликогенолиза в печени, толерантности к глюкозе, антиканцерогенные и геропротекторные действия), так и для производного сульфомочевины гликлазида (инсулиногенное, антиагрегантное и антирадикальные действия). Весьма возможно, все выявленные эффекты являются проявлением не мульти-таргентности действия, а плеотропными эффектами диабенола.

Исследования, описанные в главах 1–4, 6 и 7–10, выполнены в Волгоградском государственном медицинском университете при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-25-00139).

1. Алишева, Е.К. Методы диагностики инсулинорезистентности / Е.К. Алишева, Е.И. Красильникова, Е.В. Шляхто // Артериальная гипертензия. – 2002. – Т. 8. – № 1. – С. 29–33.

2. Аметов, А.С. Метформин – больше, чем золотой стандарт / Аметов А.С., Кондратьева Л.В., Прудникова М.А., Аметов А.С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения: учеб. пос. – 3-е изд. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2015. – т.1, с. 202–256.

3. Аметов, А. С. Альфа-липоевая кислота в лечении симптомной полиневропатии: SymptomaticDiabeticNeuropathy (SYDNEY) Trial / А.С. Аметов, И.А. Строков, А.Н. Баринов // Фарматека. – 2004. – Т. 88. – № 11. – С. 69–73.

4. Аметов, А.С. Роль  $\beta$ -клеток в регуляции гомеостаза глюкозы в норме и при сахарном диабете 2 типа / А.С. Аметов // Сахарный диабет. – 2008. – т. 41, № 4. – С. 6–12.

5. Аметов, А.С. Роль и место метформина в лечении сахарного диабета типа 2 / А.С. Аметов, И.В. Козедубова // Consilium Medicum. – 2008. – Т. 8. – № 9. – С. 28–33.

6. Аметов, А.С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения / А.С. Аметов // Учебное пособие: 3-е издание, перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015; Т.1 и 2. – 352 с. и 280 с.

7. Аметов, А.С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения: учеб. пос. / А.С. Аметов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 1032 с.: илл.

8. Андреева, Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А. А. Кишкун // Лабораторное дело. – 1988. – №11. – С. 41–43.

9. Анисимов, В.Н. Влияние фенформина на бластомогенный эффект 1,2-диметилгидразина у крыс / В.Н. Анисимов, К.М. Пожарский, В.М. Дильман // Вопросы онкологии. – 1980. – Т. 26, №8. – С. 54–58.

10. Анисимов, В.Н. Использование мутантных и трансгенных мышей для изучения механизмов старения и возрастной патологии / В.Н. Анисимов, И.Н. Алимova // Успехи геронтологии. – 2001. – №7. – С. 72–94.

11. Анисимов, В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / В.Н. Анисимов. – СПб.: Наука, 2003. – 468 с.

12. Анисимов, В.Н. Торможение буформином трансплацентарного бластомогенного эффекта N-нитрозометилмочевины у крыс / В.Н. Анисимов, В.А. Александров, Н.М. Белоус и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1980. – Т 89, № 7. – С. 88–90.

13. Анисимов, В.Н. Торможение буформином, дифенином, полипептидным экстрактом эпифиза и L-ДОФА бластомогенного эффекта 7,12-диметилбенз(а)антрацена у крыс-самок / В.Н. Анисимов, М.Н. Остроумова, В.М. Дильман // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1986. – Т. 89, № 6. – С. 723–725.

14. Анисимов, В.Н. Торможение фенформином радиационного канцерогенеза у самок крыс / В.Н. Анисимов, Н.М. Белоус, Е.А. Прокудина // Экспериментальная онкология. – 1982. – № 6. – С. 26–29.

15. Анисимов, В.Н. Торможение фенформином развития опухолей молочной железы, индуцированных у крыс N-нитрозометилмочевинной / В.Н. Анисимов, Н.М. Белоус, И.А. Васильева [и др.] // Экспериментальная онкология. – 1980. – Т 2. – № 3. – С. 40–43.

16. Анисимова, В.А. / В.А. Анисимова, М.В. Левченко, Ю.В. Кощиенко, А.Ф. Пожарский Способ получения 9-замещенных 2,3-дигидроимидазо /1,2-а/ бензимидазола или их солей // А.с. 952847 СССР. – Бюллетень изобретений. – 1982. – № 31. – С. 126.

17. Анисимова, В.А. / В.А. Анисимова, М.М. Осипова. Тез. доклада межинститутского коллоквиума «Химия азотистых гетероциклов». – Черногловка, 1995. – С. 54.

18. Анисимова, В.А. / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, А.Ф. Кучерявенко и др. // Синтез и фармакологическая активность 2-(гетарил)имидазо[1,2-а]бензимидазолов // Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т. 36. – № 10. – С. 12–17.

19. Анисимова, В.А. / В.А. Анисимова, М.М. Осипова, А.П. Галенко-Ярошевский и др. Местноанестезирующая активность 1,2-дизамещенных имидазо[1,2-а]бензимидазолов // Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т. 36. – № 8. – С. 21–24.

20. Анисимова, В.А. / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, В.А. Косолапов и др. Фармакологическая активность 2-метоксифенилзамещенных 9-диалкиламиноэтилимидазо[1,2-а]-бензимидазолов // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т. 39. – № 9. – С. 26–32.

21. Анисимова, В.А. / В.А. Анисимова, М.В. Левченко, Г.В. Ковалев и др. Синтез и фармакологическая активность некоторых 2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолов и промежуточных продуктов их синтеза // Химико-фармацевтический журнал. – 1987. – Т. 21. – №3. – С. 313–319.

22. Анисимова, В.А. / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, М.В. Левченко, Е.А. Александрова. 2-Арил-1-диалкиламиноалкилимидазо[1,2-а]бензимидазолы и их антагонизм к ионам кальция // Химико-фармацевтический журнал. – 1995. – Т. 29. – № 10. – С. 17–19.

23. Анисимова, В.А., и др. / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, И.Е. Толпыгин, А.А. Огасов, А.В. Степанов и др. Синтез и фармакологическая активность N-арилоксиэтилзамещенных 9H-2,3-дигидроимидазои 10H-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2-а] бензимидазолов // Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – Т. 40. – №9. – С. 23–26.

24. Анисимова, В.А. 3-Ацилзамещенные имидазо[1,2-а]бензимидазолы / В.А. Анисимова, А. М. Симонов // Химия гетероциклических соединений. – 1976. – № 1. – С. 121–125.

25. Анисимова, В.А. Дигидрогалогениды 9-замещенных 2,3-дигидроимидазо[1,2-а]бензимидазолы, обладающие гипогликемической активностью / В.А. Анисимова, Г.В. Ковалев, А.А. Спасов [и др]: СССР А.с. 1269474 (1986).

26. Анисимова, В.А. Местноанестезирующая активность 1,2-дизамещенных имидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазолов / В.А. Анисимова, М.М. Осипова, А.П. Галенко-Ярошевский и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – т. 36, №8. – С. 21–24.

27. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность 10-алкиламиноэтил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазолов / В.А. Анисимова, И.Е. Толпыгин, А.А. Спасов и др. // Химико-фармацевтический журнал» – 2012. – Т. 46, №6. – С. 3–8.

28. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность амидов 2,3-дигидроимидазо- и 2,3,4,10-тетрагидропиримидо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазолил-N-уксусных кислот / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, В.А. Косолапов и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т.46, №11. – С. 15–20.

29. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность некоторых 2,3-дигидроимидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазолов и промежуточных продуктов их синтеза / В.А. Анисимова, М.В. Левченко, Г.В. Ковалёв и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 1987. – Т. 21, №3. – С. 313–319.

30. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность некоторых 2,3-дигидроимидазо[1,2- $\alpha$ ]бензимидазолов и промежуточных продуктов / В.А. Анисимова, Г.В. Ковалев, А.А. Спасов и др. // Химико-фармацевтический журнал. –1987. – т. 21, №3. – С. 313–319.

31. Анисимова, В.А. Синтез и фармакологическая активность хлоридов 3-(N,N-дизамещенных)ацетамидов-1-R-2-аминобензимидазолия / В.А. Анисимова, А.А. Спасов, В.А. Косолапов и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т. 46, №9. – С. 6–10.

32. Анисимова, В.А. Способ получения производных 2-амино-1-аминоалкилбензимидазолов / В.А. Анисимова, Ю.В.Кощиченко, Б.М. Пятин [и др]: СССР А. с. № 1149592 (1984).

33. Антонова, К. В. Роль и место тиоктовой кислоты в комплексной терапии сахарного диабета / К. В. Антонова, Л. В. Недосугова // Трудный пациент. – 2008. – № 10. – С. 13–17.

34. Анциферов, М.Б. Опыт использования комбинированного сахароснижающего препарата ГлибOMET (глибенкламид + метформин) в практике лечения сахарного диабета типа 2 / М.Б. Анциферов, А.Ю. Майоров, Л.Г. Дорофеева // Фарматека. – 2006. – Т. 118. – №3. – С. 68–72.

35. Анциферов, М.Б. Синдром диабетической стопы: диагностика, лечение и профилактика / М.Б. Анциферов, Е.Ю. Комелягина. – М.: МИА, 2013. – 304 с.

36. Арзамасцев, Е.В. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств / Е.В. Арзамасцев, И.В. Березовская, О.Л. Верстакова и др. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 385–416.

37. Базоян, Н.С. Эффективность медико-социальной и психологической реабилитации больных сахарным диабетом в условиях центра специализированного курсового амбулаторного лечения: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Самара, 2004. – 24 с.

38. Балаболкин М. И. Лечение сахарного диабета и его осложнений / М. И. Балаболкин, Е. М. Клебанова, В. М. Креминская. – М., 2005 – 512 с.

39. Балаболкин, М.И. Диабетология / М.И. Балаболкин. – М.: Медицина, 2000. – 672 с.

40. Балаболкин, М.И. Значение и место Авандии в комплексной терапии больных сахарным диабетом 2 типа / М.И.Балаболкин, Е.М. Клебанова // Российский химический журнал РХО им. Д.И. Менделеева. – 2006. –Т.14, №15. – С. 1107–1116.

41. Балаболкин, М.И. Лечение сахарного диабета и его осложнений / М.И. Балаболкин, Е.М. Клебанова, В.М. Креминская. – М.: Издательство «Медицина», 2005. – 512 с. – С. 288–304.

42. Банин, В.В. Механизмы обмена внутренней среды / В.В. Банин. – М.: Изд-во РГМУ, 2000. – 276 с.

43. Баранов, В.Г. Экспериментальный сахарный диабет / Баранов В. Г. – Л., 1983.



44. Баренбойм, Г.М. Биологически активные вещества. Новые принципы поиска / Г.М. Баренбойм, А.Г. Маленков. – М.: Наука, 1986. – 363 с.
45. Баркаган, З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. – М.: «Ньюдиамед», 2001. – 296 с.
46. Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М.Л. Беленький. – Л., 1963. – 151 с.
47. Беллман, Р. Математические методы в медицине / Р. Беллман. Пер. с англ. – М.: Мир, 1987. – 200 с.
48. Бенсман, В.М. Хирургия гнойно-некротических осложнений диабетической стопы: Руководство для врачей / В.М. Бенсман. – М. ИД «МЕДПРАКТИКА-М», 2010. – 472 с.
49. Бирюкова, Р.Н. К вопросу о вычислении среднего квадратического отклонения по размаху (амплитуде) / Р.Н. Бирюкова // Гигиена и санитария. – 1962. – № 7. – С. 43–46.
50. Бобырева, Л.Е. Антиоксиданты в комплексной терапии диабетических ангиопатий / Л.Е. Бобырева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1998. – №1. – С. 74–78.
51. Болезни органов эндокринной системы. Руководство / Под ред. акад. И.И. Дедова – М.: Медицина, 2000.
52. Бугаева, Л.И. Изучение токсических свойств нового гипогликемического соединения диабенол / Е.А.Кузубова, Л.И. Бугаева, Д.Н. Реброва, А.А. Спасов // Токсикол. вестник. – 2012. – №1. – С. 62–64.
53. Буркерт, У. Молекулярная механика / Пер. с англ. / У. Буркерт, Н. Эллингджер. – М.: Мир, 1986. – 364 с.
54. Бутрова, С.А. Метаболический синдром: патогенез, клиника, диагностика, подходы к лечению / С.А. Бутрова // Русский медицинский журнал. – 2001. – Т. 9, № 2. – С. 56–60.
55. Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. Пространственно-затрудненные фенолы. – М.: Химия, 1972. – С. 290–296.
56. Васьков, К.С. Влияние некоторых производных гамма-оксимасляной и янтарной кислот на выживаемость кожного лоскута

на ножке / К.С. Васьков: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ростов-н/Д., 1989. – 23 с.

57. Введение в диабетологию / И.И. Дедов, В.В. Фадеев. – М. 1998.

58. Вейганд-Хильгетаг. Методы эксперимента в органической химии. – М.: Химия, 1968. – 944 с.

59. Вискс Г. Диабетон MR – гликлазид модифицированного высвобождения: новый селективный сульфаниламидный препарат с однократным суточным приемом как препарат первого выбора для лечения сахарного диабета 2 типа / Г. Вискс // Украинский медицинский журнал. – 2002. – №3. – С. 7–11.

60. Володькин, А.П. Реакция Манниха в ряду 4-окси-3,5-диалкилацетофенолов / А.А. Володькин, В.В. Ершов, Н.В. Портных // «Известия АН СССР». Серия: химия. – 1966. – № 4. – С. 752.

61. Воронкова, М.П. Противодиабетические свойства гимневовых кислот: Дис. д. б. н. / М. П. Воронкова. – Волгоград, 2009. – 338 с.

62. Ковалев Г. В., Анисимова В. А., Симонов А. М. и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 1979. – Т. 13, № 8. – С. 57–62.

63. Габбасов, З.А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов / З.А. Габбасов, Е.Г. Попов, И.Ю. Гаврилова, Е.Я. Позин, Р.А. Маркосян // Лаб. дело. – 1989. – №10. – С. 15–18.

64. Габбасов, З.А. Новый методический подход к исследованию агрегации тромбоцитов *in vitro* / З.А. Габбасов, Е.Г. Попов, И.Ю. Гаврилов и др. // БЭБМ. – 1989. – № 10. – С. 437–439.

65. Гаврилов, В.Б. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой / В.Б. Гаврилов, А.Г. Гаврилова, Л.М. Мажуш // Вопросы медицинской химии. – 1987. – №7. – С. 118–122.

66. Гаврилова, Е.С. Фармако-токсикологические особенности нового гипогликемического препарата диабенол: Дис. ... канд. биол. наук / Е.С. Гаврилова. – Волгоград, 1996. – 250 с.

67. Галенко-Ярошевский, П.А. Очерки фармакологии средств метаболической терапии / П.А. Галенко-Ярошевский, И.С. Чекман, Н.А. Горчакова. – М.: Медицина, 2001. – 240 с.

68. Галенок, В.А. Патогенетическая терапия гипоксии тканей, гемореологических нарушений и микроангиопатии при сахарном диабете / В.А. Галенок, В.Е. Диккер // Терапевтический архив. – 1990. – Т. 62, №12. – С. 87–90.

69. Галенок, В.А. Реополиглукин, гепарин и ПСН в комплексном лечении больных сахарным диабетом / В.А. Галенок, В.Е. Диккер, Т.А. Гусятникова // Тканевая гипоксия и ее коррекция. – Новосибирск: Наука, 1981. – С. 54–59.

70. Галенок, В.А., Гостинская Е.В., Диккер В.Е. Гемореология при нарушениях углеводного обмена. – Новосибирск, 1987. – 261 с.

71. Галлер Г., Штрауценберг С. Пероральная терапия диабета. – М., 1973. – 343 с.

72. Генес С.Г., Журова М.В., Полторак В.В. Современные представления о механизме индукции глюкозой секреции инсулина // Проблемы эндокринологии. – 1980. – Т. 25, №5. – С. 73–84.

73. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

74. Глотов, Н.В. Биометрия / Глотов Н.В., Животовский Л.А., Хованов Н.В., Хромов-Борисов Н.Н. – Л., 1982. – 264 с.

75. Голендер, В.Е. Вычислительные методы конструирования лекарств / В.Е. Голендер, А.Б. Розенблит. – Рига: Зинатне, 1978. – 238 с.

76. Горелик, А.Л. Методы распознавания: Учеб. пособие для вузов. 4-е изд., испр. / А.Л. Горелик, В.А. Скрипкин. – М., 2004. – 262 с.

77. Горовой В.И. Влияние некоторых производных бензофурана, пиперидина и карбоновых кислот на выживаемость кожи в условиях редуцированного кровообращения: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ростов-н/Д, 1991. – 21 с.

78. Гречко, О.Ю. Изучение механизмов мембранотропного действия соединения РУ-1203 на ионные каналы нейронов прудовика / О.Ю. Гречко, А.А. Спасов, А.И. Вислобоков и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – т. 153, №3. – С. 276–280.

79. Грызунов, Ю.А. Наборы реактивов для определения эффективной и общей концентрации сывороточного альбумина флуорес-

центным способом. Характеристика, использование, хранение / Ю.А. Грызунов // Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / Под ред. Ю.А. Грызунова, Г.Е. Добрецова. – М.: ИРИУС, 1994. – С. 71–77.

80. Гублер, Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов / Е.В. Гублер – Л.: Медицина, 1978. – 293 с.

81. Гурто, Р.В. Взаимосвязь фармакинетики лоратидина и гликлазида с состоянием системы энергопродукции: Авторефер. дис. канд. мед. наук. – Томск, 2005. – 27 с.

82. Дагаева Л.Н., Беликова Ф.С., Подотыкина О.И., Макарова А.В. Динамика секреции инсулина у собак с аллоксановым диабетом // Бюлетень экспериментальной биологии и медицины. – 1978. – Т. 85, №3. – С. 278–281.

83. Дарбре, А. Практическая химия белка / А. Дарбре. – М.: Мир, 1989. – 623с.

84. Дедов И.И. Новое отечественное гипогликемическое средство с гемореологическими свойствами – диабенол (клинические исследования) / М.И. Балаболкин, А.А. Спасов, В.И. Петров и др. // Материалы IV Всероссийского диабетологического конгресса 19-22 мая, 2008.

85. Дедов И.И., Шестакова М.В. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. – М., 2007. –120 с.

86. Дедов И.И., Шестакова М.В., Максимова М.А. Федеральная целевая программа «Сахарный диабет». – М., 2002.

87. Дедов, И.И. Клинические рекомендации. Эндокринология / И.И. Дедов, Г.А. Мельниченко. – М.: ГЭОТАР МЕДИА, 2008. – 304 с.

88. Дедов, И.И. Поиск новых молекул для лечения сахарного диабета – от идеи до эксперимента. Новое гипогликемическое средство с гемореологическими свойствами / И.И. Дедов, М.И. Балаболкин, А.А. Спасов и др. // Материалы 4 всероссийского диабетологического конгресса. – М., 2008. – С. 35–36.

89. Дедов, И.И. Значимость результатов исследования ADVANCE для контроля сахарного диабета в России / И.И. Дедов, М.В. Шестакова // Сахарный диабет. – 2009. – Т.12. – № 2. – С. 4–5.

90. Дедов, И.И. Сахарный диабет в России: проблемы и решения / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, Ю.И. Сунцов. – М.: Международный Форум «Объединимся для победы над диабетом», 2008. – С. 3–6.
91. Дедов, И.И. Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика / И.И. Дедов, М.В. Шестакова. – М.: «Медицина», 2011. – 808 с.
92. Дедов, И.И. Сахарный диабет: острые и хронические осложнения / И.И. Дедов, М.В. Шестакова. – М.: МИА, 2011. – 480 с.
93. Дедов, И.И. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при сахарном диабете: Пособие для врачей / И.И. Дедов. – М., 2003. – 40 с.
94. Дедов, И.И. Фармакоэкономическое моделирование отдаленных результатов лечения сахарного диабета 2 типа у пациентов, получавших современные аналоги инсулина по сравнению с терапией пероральными сахароснижающими препаратами / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, Ю.И. Сунцов [и др.] // Сахарный диабет. – 2010. – т. 46, №1. – С. 102–112.
95. Дедов, И.И. Эндокринология: национальное руководство / И.И. Дедов, Г.А. Мельниченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 1072 с.
96. Демидова, Т.Ю. Выбор пероральных сахароснижающих средств: современный взгляд на проблему / Т.Ю. Демидова // Проблемы эндокринологии. – 2012. – Т. 58, № 6. – С. 53–59.
97. Дильман В.М. О коррекции эндокринно-обменных нарушений у онкологических больных. Эффект бигуанидов (фенформина и адебита), мисклерона и дифенина / В.М. Дильман, Л.М. Берштейн, Е.В. Цырлина // Вопросы онкологии. – 1975. – Т.21, № 11. – С. 33–39.
98. Дильман, В.М. Устранение фенформинем иммунодепрессии, вызванной 1,2-диметилгидразином у крыс / В.М. Дильман, Б.Н. Софронов, В.Н. Анисимов и др. // Вопросы онкологии. – 1977. – Т. 23, №8. – С. 50–54.
99. Дильман, В.М. Четыре модели медицины / В.М. Дильман. – М.: Медицина, 1987. – 288 с.
100. Добровольский, Н.А. Анализатор вязкости крови / Н.А. Добровольский, Ю.М. Лопухин, А.С. Парфенов и др. // Реологи-

ческие исследования в медицине: Сб. науч. тр. – М.: НЦХ РАМН, 1998. – С.45–51.

101. Досон, Р. Справочник биохимика: Пер. с англ. / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс – М: Мир, 1991. – 544 с., ил.

102. Древаль, А.В. Анализ результатов перорального нагрузочного теста глюкозой с помощью простой математической модели / А.В. Древаль // Лабораторное дело. – 1985. – № 12. – С. 737–741.

103. Древаль, А.В. Взаимосвязь HbA1c и параметров перорального теста толерантности к глюкозе у больных сахарным диабетом 2 типа / А.В. Древаль, Редькин Ю.А., Богомоллов В.В. // Проблемы эндокринологии. – М., 2005. – Деп. № 53913.

104. Древаль, А.В. Нарушенный баланс глюкозы и семь подтипов сахарного диабета, выявленных с помощью внутривенного теста толерантности к глюкозе / А.В. Древаль // Проблемы эндокринологии. – 2006 – Т. 52, №6. – С. 3–10.

105. Дудченко, Г.П. Поиск и изучение антидиабетических веществ среди новых производных бензимидазола: Дис. ... канд. биол. наук / Г.П. Дудченко. – Волгоград, 1989. –165 с.

106. Дудченко, Г.П. Противодиабетическая активность производных бенз-имидазола / Г.П. Дудченко: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Волгоград, 2001. – 35 с.

107. Дудченко, Г.П. Противодиабетическая активность производных бензимидазола: Дис. ... док. биол. наук / Г.П. Дудченко. – Волгоград, 2001. – 340 с.

108. Дудченко, Г.П. Экспериментальное изучение фармакотоксикологических свойств нового гипогликемического вещества диабетол / Г.П. Дудченко, А.А Спасов, В.А. Анисимова и др. // Фундаментальные исследования как основа создания лекарственных средств: Сб. тез. 1-го съезда Рос. науч. общ-ва фарм-в. – М.: ООО Союзинформбиология «Калина» ВИНТИ РАН; – Волгоград, 1995. – С. 150.

109. Ельцов А.В., Кривожейко К.М., Венчиков А.И., Венчиков В.А. / Основные приемы статистической обработки результатов наблюдений в области физиологии. – М.: Медицина, 1974. – С. 152.

110. Ена, Я.М. Внутрисосудистое свертывание крови при сахарном диабете / Я.М. Ена, Е.А.Сушко, Т.Г.Волковская и др. // Проблемы эндокринологии. – 1991. – Т. 37, №5. – С. 64–70.
111. Ершов В.В. Пространственно-затрудненные фенолы / В.В. Ершов, Г.А. Никифоров, А.А. Володькин. – М.: Химия, 1972. – 352 с.
112. Ефимов, А.С. Диабетические ангиопатии. / А.С. Ефимов // М.: Медицина, 1989. – 288 с.
113. Ефимов, А.С. Клиническая диабетология / А.С. Ефимов, Н.А. Скробонская. – Киев: Здоров'я, 1998. – 320 с.
114. Жердев, В.П. Основные этапы доклинического и клинического изучения фармакокинетики психофармакологических средств / В.П. Жердев, И. Янку // Экспериментальная и клиническая фармакокинетика / Под ред. А.В. Вальдмана, В.П. Жердева. – М.: НИИ фармакологии АМН СССР, 1998. – С.154–160.
115. Заборовская, З.В. Лечение сахарного диабета 2 типа современными таблетированными сахароснижающими препаратами / З.В. Заборовская, А.П. Шепелькевич. – Минск, 2005.
116. Зайцев, В. Г. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антиоксидантного действия / В.Г. Зайцев, В.О. Островский, В. И. Закревский // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – Т. 66, № 4. – С. 66–70.
117. Закусов, В.В. Фармакология центральных синапсов / В.В. Закусов. – М.: Медицина, 1973. – 271 с.
118. Залевская, А.Г. Метаболическая регуляция цАМФ-зависимая протеинкиназа (АМРК): враг или союзник? / Залевская А.Г., Потракеева А.М. – М.: Медицина // Сахарный диабет. – 2008. – №4. – С. 12–17.
119. Занозина, О.В. Необходимость и достаточность использования антиоксидантов в терапии сахарным диабетом 2 типа / О.В. Занозина, Н.Н. Боровков, М.И. Балаболкин и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Прил. 1. – С. 112–118.
120. Зеленская, А.В. Реамберин и рексод. Фармакотерапевтическая коррекция редуцированного кровообращения в коже при сахар-

ном диабете / А.В. Зеленская, П.А. Галенко-Ярошевский. – Краснодар: Просвещение-Юг, 2013. – 202 с.

121. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – Изд. третье, перераб. и доп. – Киев, 1983.

122. Зефилов, Н.С. Вступительный доклад / Органический синтез и комбинаторная химия / Н.С. Зефилов // Химия в России: «Бюллетень РХО им. Д.И. Менделеева». – 1999. – №6.

123. Золотов, Н. Н. Ингибирующее дипептидилпептидазу IV средство и фармацевтическая композиция на его основе / Н.Н. Золотов, В. М. Креминская // Патент РФ 2485952 -2013.

124. Иоффе, Б.В. Рефрактометрические методы химии / Б.В. Иоффе. – Л.: Химия, 1983. – 352 с.

125. Кабак, Я.М. Практикум по эндокринологии. – М., 1968.

126. Кахановский, И.М. Клиническая оценка влияния изодибута на некоторые показатели микроциркуляции в комплексной терапии больных сахарным диабетом / И.М. Кахановский // Клиническая медицина. – 1996. – №3. – С. 56–59.

127. Кендыш, И.Н. Регуляция углеводного обмена / И.Н. Кендыш. – М., 1985. – 271с.

128. Кижаяев, Е.В. Фармакологическая защита трансплантата в условиях недостаточности артериального кровоснабжения или венозного стока / Е.В. Кижаяев, А.И. Неробеев, Б.У. Кахраманов и др. // Специализированная медицинская помощь и современные проблемы ее интеграции. – М., 1986. – С. 373–374.

129. Киясов А. П. Современные технологии морфологических исследований: Метод. пособие. – Казань, 2001. – 38 с.

130. Клебанов, Г.И. Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина: мексидола эмоксипина и проксипина / Г. И. Клебанов, О. Б. Любицкий, О. В. Васильева и др. // Вопросы медицинской химии. – 2001. – Т. 47, № 3. – С. 288–300.

131. Климов, А. Н. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения / А. Н. Климов, Н. Г. Никуличева. – СПб.: Питер, 1999. – 512 с.



132. Ковалев, Г.В. Ноотропные средства / Г.В. Ковалев. – Волгоград: Нижне-волжское. кн. изд-во, 1990. – 368 с.

133. Колесник, Ю.М. Состояние вазопрессин-, окситоцин- и кортиколиберинсинтезирующих структур гипоталамуса при экспериментальном сахарном диабете у крыс различного пола / Ю.М. Колесник, Ю.Н. Орестенко, В.А. Абрамов // Проблемы эндокринологии. – 1993. – Т. 39, №1. – С. 45–48.

134. Колуэлл, Дж.А. Сахарный диабет: новое в лечении и профилактике / Дж.А. Колуэлл; пер с англ. М.В. Шестаковой, М.Ш. Шамхаловой. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. – 288 с.: табл.

135. Кононенко, И.В. Комбинированная терапия пероральными сахароснижающими препаратами в лечении сахарного диабета 2 типа / И.В. Кононенко, О.М. Смирнова // Лечащий врач. – 2007. – № 2. <http://www.lvrach.ru/2007/02/4534783>.

136. Коржевский Д.Э. Краткое изложение основ гистологической техники для врачей и лаборантов-гистологов. – СПб., 2005. – 48 с.

137. Корн, Г. Справочник по математике для научных работников и инженеров / Пер. с англ.; под общ. ред. И. Г. Арамановича. – 6 изд., стереотип / Г. Корн, Т. Корн. – СПб.: Изд-во «Лань», 2003. – 832 с.

138. Королюк, М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова // Лабораторное дело. – 1988. – №1. – С. 16–19.

139. Корчин, В.И. Антиоксидант пробукол предотвращает развитие аллоксанового диабета и снижение активности антиоксидантных ферментов в тканях крыс / В.И. Корчин, В.З. Ланкин, Р.Д. Яркова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1992. – № 9. – С. 279–282.

140. Косолапов, В.А. Антиоксидантные свойства производного пирролобензимидазола – соединения РУ-792 – в эксперименте / В.А. Косолапов, Л.В. Ельцова, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155, №4. – С. 453–456.

141. Костенко, А.Л. Влияние гепастерила А на выживаемость кожи в условиях редуцированного кровообращения / А.Л. Костенко: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ростов-на/Д., 2000. – 22 с.

142. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцитина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // Вопросы медицинской химии. – 1990. – Т. 36, №2. – С. 88–91.

143. Котегов В.П. Противодиабетическая активность производных ароматических сульфонов и карбоновых кислот: Дисс. на соиск. уч. ст. д.м.н. – М., 1997.

144. Кочергин, П.М. Имидазо[5,1-*b*]тиазолы, имидазо[5,1-*b*]тиазолины и имидазо[5,1-*b*]тиазолидоны / П. М. Кочергин // Химия гетероциклических соединений. – 1967. – № 1. – С. 137–140.

145. Кроненберг, Г.М. Сахарный диабет и нарушения углеводного обмена / Генри М. Кроненберг, Шломо Мелмед, Кеннет С. Полонски, П. Рид Ларсен; пер. с англ.; под ред. И.И. Дедова, Г.А. Мельниченко. – М.: Рид Элсивер, 2010. – 488 с.

146. Кроненберг, Г.М. Эндокринология по Вильямсу. Сахарный диабет и нарушения углеводного обмена / Г.М. Кроненберг, Ш. Мелмед, К.С. Полонски, П.Р. Ларенс; пер. с англ. Под ред. И.И. Дедова, Г.А. Мельниченко. – М.: ООО «Рид Элсивер», 2010. – С. 47–50.

147. Кузьменко Т.А., Кузьменко В.В., Ковалев Г.В., Дудченко Г.П. Дигидрохлориды 2-алкил-4-диалкиламиноалкил-1,2,4-триазоло1,5-абензимидазолов, обладающие гипогликемической активностью // А.с. СССР 1438179. – Бюллетень изобретений. – 2014. – №18.

148. Кузьменко, В.В. 1,2,4-Триазоло[1,5-*a*]бензимидазолы: таутомерия и алкилирование / В.В. Кузьменко, Т.А. Кузьменко, А.Ф. Пожарский, В.Н. Доронькин, Н.Л. Чикина, С.С. Пожарская // Химия гетероциклических соединений. – 1989. – № 2. – С. 209–220.

149. Кучерявенко, А.Ф. Антиагрегантная активность нового производного бензимидазола / А.Ф. Кучерявенко, А.А. Спасов, В.И. Петров и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156, №12. – С. 760–762.

150. Кучерявенко, А.Ф. Антитромботическая активность нового гипогликемического соединения лимиглидола на модели клеточного тромбоза у мышей / А.Ф. Кучерявенко, А.В. Смирнов, А.А. Спасов // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. – 2015. – №1. – С. 49–52.
151. Кушнер Р. Лекарственная терапия: Избыточный вес и ожирение / Под ред. Д. Г. Бессесен, Р. Кушнер. – М.: Бином, 2004. – Гл.16. – С. 145–156.
152. Лакин, К.М. Биотрансформация лекарственных веществ / К.М. Лакин, Ю.Ф. Крылов. – М.: Медицина, 1981. – С. 68–73.
153. Ланкин, В.З. Изучение аскорбатзависимого перекисного окисления липидов тканей при помощи теста с 2-тиобарбитуровой кислотой / В.З. Ланкин, С.М. Гуревич, Е.Б. Бурлакова // Труды московского общества испытателей природы. – 1975. – Т. 52. – С. 73–78.
154. Левтов, В.А. Реология крови / В.А. Левтов, С.А. Регирер, Н.Х. Шадрина. – М., 1982. – 269 с.
155. Ленская, К.В. Инновационные направления поиска лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета типа 2 / К.В. Ленская, Н.И. Чепляева, А.А. Спасов // Вестник ВолгГМУ. – 2011. – №10. – С. 13–17.
156. Любимов, Б.И. Методические рекомендации по количественной оценке влияния препаратов на жизнеспособность тканей в условиях редуцированного кровообращения. / Б.И. Любимов, Н.Н. Самойлов, Е.В. Кижаев и др. – М., 1986. – 12 с.
157. 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.
158. Шевчук М. И., Домбровский А. В. // Журнал общей химии. – 1963. – Т. 33. – № 4. – С. 1135.
159. Майстренко, В.Н. Количественный анализ  $\alpha$ -аминосислот в моче нейрохирургических больных методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Армсорб» / В.Н. Майстренко, Р.Р. Ильясова, Ф.Х. Кудашева и др. // Вестник Башкирского университета. – 2008. – Т. 13, № 2. – С. 265–269.

160. Макаренко, И.Е. Оценка ингибирующей активности природного препарата в отношении дипептидил пептидазы 4 типа (ДПП-4) *in vivo* / И.Е. Макаренко, Н.М. Фаустова, В.Г. Макаров // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* – Т.13, спецвыпуск, 2015. – С. 105–106.

161. Макаров, Б.Г. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для коррекции сахарного диабета, ожирения и метаболического синдрома / Б.Г. Макаров, М.Н. Макарова, И.А. Проскурина [и др.] // *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая.* – М.: Гриф и К, 2012. – С. 687–701.

162. Максименко, А.В. Антитромботическая активность комплексов супероксидисмутазы с хондроитинсульфатом при артериальном поражении у крыс / А.В. Максименко, Е.Г. Тищенко, В.Л. Голубых // *Вопросы медицинской химии.* – 1999. – №6. – С. 27–32.

163. Мандель, И.Д. Кластерный анализ / И.Д. Мандель. – М.: Финансы и статистика, 1988. – 176 с.

164. Манских В. Н. Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза // *Бюллетень сибирской медицины.* – 2004. – №1. – С. 63–70.

165. Машковский, М.Д. Актуальные вопросы поиска и клинико-фармакологические исследования новых лекарственных препаратов / М.Д. Машковский // *Терапевт. архив.* – 1976. – Т. 48, № 5. – С. 3–9.

166. Меерсон, Ф.З. Роль гликолиза в энергетическом обеспечении сократительной функции гипертрофированного сердца / Ф.З. Меерсон, Л.М. Ларионов // *Кардиология.* – 1969. – Т. 9, №1. – С. 17–25.

167. Меньшиков, В.В. Лабораторные методы исследования / В.В. Меньшиков. – М., 1987. – 240 с.

168. Меньшикова, Е. Б. Окислительный стресс. Антиоксиданты и прооксиданты / Е.Б. Меньшикова, Ф.З. Ланкин, Н.К. Зенков и др. – М.: Слово, 2006. – 556 с.

169. Метаболический синдром / Под ред. Г.Е. Ройтберга. – М.: МЕД-М54 пресс-информ, 2007. – 224 с.

170. Минкин, В.И. Теория строения молекул / В.И. Минкин, Б.Я Симкин, Р.М. Миняев. – Ростов н/Д.: Феникс, 1997. – 560 с.

171. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А. Н. Миронов. – Часть 1. – М.: Гриф ИК, 2012. – С. 843–853.

172. Мкртумян, А.М. Глюкованс – идеальный комбинированный препарат для лечения сахарного диабета 2 типа / А.М. Мкртумян, Е.В. Бирюкова // Русский медицинский журнал. – 2006. – Т. 14, № 6. – С. 455–460.

173. Моин, В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах / В. М. Моин // Лабораторное дело. – 1986. – № 12. – С. 724–727.

174. Мурина, М.А. Противотромботическая активность N,N-дихлортаурина *in vivo* на модели тромбоза у мышей / М.А. Мурина, О.Д. Фесенко, В.И. Сергиенко, Н.А. Чудина, Д.И. Рощупкин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2002. – Т. 134, №7. – С. 44–47.

175. Мюллер, Р. К вопросу о гемореологическом профиле трентала / Р. Мюллер // Клиническое значение препарата трентал: Сб. мат. симп. – М., 1977. – С. 32–35.

176. Недосугова, Л. В. Применение биофлавоноида диквертина в комплексной терапии сахарного диабета типа 2 / Л. В. Недосугова // *Consilium medicum*. – 2008. – Т. 10, № 9. – С. 55–59.

177. Недосугова, Л.В. Место метформина в лечении сахарного диабета 2 типа и метаболического синдрома / Л.В. Недосугова // Русский медицинский журнал. – 2006. – Т. 14, № 13. – С. 989–992.

178. Никитин, Н.А. Поиск модуляторов монооксигеназной системы печени в ряду производных бензимидазола и ксантина: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / Н.А. Никитин. – Уфа, 2002. – 20 с.

179. Никонов, В.В. Тромбоцитарный гемостаз и антитромбоцитарная терапия при остром коронарном синдроме / В.В. Никонов, Е.И. Киношенко // Медицина неотложных состояний. – 2008. – №3 (16). – С. 109–119.

180. Новицкий, В.В. Структурно-метаболический статус и функциональные особенности эритроцитов при инсулинзависимом сахарном диабете у детей. / В.В. Новицкий, М.В. Колосова, Е.Б. Кравец и др. // Бюл. эксп. биологии и медицины. – 1999. – Т. 128, №9. – С. 347–350.

181. Ордынцева, А.П. 1-Диэтиламиноэтил-2-имино-3-(2-оксиэтил) бензимидазолина хлорид, обладающий противоцистодным действием при экспериментальном гименолепидозе / А.П. Ордынцева, В.А. Анисимова, А.П. Шепелев [и др.]: СССР А. с. № 1626623 от 8.10.1990.

182. Орловский, М.А. Экспериментальные исследования сахарного диабета 1 типа: причины меж- и внутривидовых различий резистентности к диабетогенным факторам (обзор литературы и собственных исследований) / М.А. Орловский // Журн. АМН України. – 2006. – Т. 12, №2. – С. 255–268.

183. Островский, О.В. Противоишемические свойства нового антиоксидантного средства эноксифола / О.В. Островский, А.А.Спасов, В.А. Косолапов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2003. – Т. 66, №4. – С. 17–20.

184. Панин, Л.Е. Энергетические аспекты адаптации / Л.Е.Панин. – Л., 1978. – 192 с.

185. Панкратова, М. А. Окислительный стресс у больных сахарным диабетом типа 2 с различной длительностью заболевания и разной степенью компенсации углеводного обмена / М. А. Панкратова, С. В. Пирожков, М. И. Балаболкин // Сахарный диабет. – 2006. – Т. 31, № 3. – С. 12–17.

186. Петров, В.И. Сверхмалые дозы антител к С-концевому фрагменту  $\beta$ -субъединицы рецептора инсулина – новый класс сахароснижающих средств / В.И. Петров, Н.В. Рогова, А.Ю. Рязанова [и др.] // Бюллетень ВНЦ РАМН. – 2009. – №3. – С. 19–22.

187. Петров, В.И. Фармакоэкономический анализ эффективности комплексной терапии больных с сахарным диабетом 2-го типа / В.И. Петров, Н.В. Рогова, Д.О. Михайлова // Вестник ВолгГМУ. – 2010. – Т. 33, № 1. – С. 28–32.

188. Пиотровский, В.К. Метод статистических моментов и интегральные модельно-независимые параметры фармакокинетики / В.К. Пиотровский // Фармакология и токсикология. –1986. – Т. 49, №5. – С. 118–127.

189. Питерс-Хармел Э., Матур Р. Сахарный диабет: Диагностика и лечение / Пер. с англ. – М., Практика, 2008. – 496 с.

190. Пожарский, А.Ф. Практические работы по химии гетероциклов / А.Ф. Пожарский, В.А. Анисимова, Е.Б. Цупак. – Ростов-н/Д.: Изд-во Ростов. ун-та, 1988. – 158 с.

191. Покровский, М.В. Методические подходы для количественной оценки развития эндотелиальной дисфункции при L-NAME-индуцированной модели дефицита оксида азота в эксперименте / М.В. Покровский, В.И. Кочкаров, Т.Г. Покровская // Кубанский научно-медицинский вестник. – 2006. – № 10 (91). – С. 72–77.

192. Полторацк, В.В. Профилактика сахарного диабета 1 типа: патофизиологическое обоснование, стратегия и клиническая реализация / В.В. Полторацк, Н.И. Горбенко, Е.А. Сакало // Украинский медицинский часопис. – 2001. – т. 22, №2. – С. 83–91.

193. Портных, Н.В. Ацилирование 2,6-дитретбутилфенола / Н.В. Портных, А.А. Володькин, В.В.Ершов // «Известия АН СССР». Серия: химия. – 1966.– № 12. – С. 2243–2244.

194. Правила лабораторной практики (GLP) при проведении доклинических исследований в Российской Федерации разработаны в Соответствии с Федеральным законом «О лекарственных средствах» №86-ФЗ от 22.06.1998 (Собрание законодательства Российской Федерации от 29 июня 1998 г., № 26, ст. 3006; от 13 января 2003 г. №2 ст. 167; от 10 января 2000 г., №2, ст. 126; от 7 января 2002 г. (Часть I), №1, ст. 2) и положением о Министерстве здравоохранения Российской Федерации, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 29.04.2002 №284 (Собрание законодательства Российской Федерации, 6 мая 2002 г., №18, ст. 1771). Приложение утверждено приказом Министерства Здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 №267.

195. Программа ИТ «Микрокосм»: Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2011618547 / П.М. Васильев, А.Н. Кочетков (Россия). – № 201616643; заявл. 02.09.2011; зарег. 31.10.2011., опубл. 20.03.2012 RU ОБПБТ. – №1 (78)– 1 с.

196. Прозоровский, В.Б. Использование метода наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности / В.Б. Прозоровский // Фармак. и токсикология. – 1962. – Т. 25, № 1. – С. 115–119.

197. Прозоровский В.Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований. / Фармакол. и токсикол. – 1962. – Т. 25, № 1. – С. 115–120.

198. Пылев Л.Н. Методические указания по изучению канцерогенных свойств фармакологических веществ и лекарственных средств / Л.Н. Пылев, В.С. Трусов, А.Б. Сыркин и др. // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: ИИА «Ремедиум», 2000. – С. 61–65.

199. Пыцкий В.И., Адрианова Н.В., Артомасова А.В. // Аллергические заболевания / В.И.Пыцкий. – М.: «Триада-Х», 1999. – 470 с.

200. Рогова, Н.В. Влияние транскраниальной электростимуляции эндорфинергических структур мозга на уровень инсулина у больных сахарным диабетом 2-го типа / Н.В. Рогова, О.В. Лукасик // Вестник ВолгГМУ. – 2007. – Т. 22, № 2. – С. 80–83.

201. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / 3-е изд., доп. и перераб.; под общ. ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. – Казань, 2004. – 456 с.

202. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунатян, А.Н.Васильева и др. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 944.

203. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / В.П. Фисенко, Е.В. Арзамасцев, Е.В.Бабаян и др. – М.: ИИА «Ремедиум», 2000. – 398 с.

204. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. чл.-



корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. Изд. 2-е, перераб., доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.

205. Сакаев, М.Р. Изучение влияния некоторых синаптотропных веществ на тромбоцитарную активность: дис. к. б. н.: 14.00.25 / Сакаев М. Р. – СПб., 2000. – 115 с.

206. Салтыков, Б.Б. Диабетическая микроангиопатия / Б.Б. Салтыков. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.

207. Самойлов, Н.Н. Таблицы значений средней ошибки и доверительного интервала средней арифметической величины вариационного ряда / Н.Н. Самойлов. – Томск: Издательство Томского университета, 1970. – 63 с.

208. Саноцкий, И.В. // Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений / И.В. Саноцкий, И.П. Уланова. – М.: Медицина, 1975. – 327 с.

209. Сахарный диабет: диагностика, лечение, профилактика / Под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой. – М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2011. – 808 с.

210. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ №2006613275. PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) / Д.А. Филимонов, В.В. Поройков, Т.А. Глориозова, А.А. Лагунин (Россия). – №2006612815; заявлено 17.08.2006; зарегистрировано 15.09.2006.

211. Северин, С. Е. Практикум по биохимии: учеб. пос. / Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с: ил.

212. Сергиенко, В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. / Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 256 с.

213. Середенин, С.Б. Доказательство нейропротекторных свойств афобазола на экспериментальной модели фокальной ишемии головного мозга / С.Б. Середенин, О.В. Поварова, О.С. Медведев [и др.] // Новости науки и техники. Серия: медицина, психиатрия. – 2007. – №2. – С. 24.

214. Середенин, С.Б. Механизм антиишемического действия афобазола / С.Б. Середенин, И.Б. Цорин, М.Б. Вититнова и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – № 55(6). – С. 760–763.

215. Середенин, С.Б. Современная фармакотерапия эмоционально-стрессовых расстройств / С.Б. Середенин, Т.А. Воронина // Вестник эстетической медицины. – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 32–40.

216. Сигал В.Л. Электрокинетический заряд эритроцитов и его роль в обеспечении структурных свойств крови // Гематология и трансфузиология. – 1988. – №4. – С. 40–44.

217. Симонов, А.М. VI. Получение производных имидазо[1,2-а]бензимидазола из 1-алкил-, 1-аралкил-2-иминобензимидазолин-3-уксусных кислот и их эфиров / А.М. Симонов, В.А. Анисимова, Т.А. Борисова // Химия гетероциклических соединений. – 1973. – №1. – С. 111–114.

218. Смирнов А.Н. Элементы эндокринной регуляции: научное издание; под ред. акад. РАМН В.А. Ткачука. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 352 с., ил.

219. Смирнова, Л.А. Фармакокинетика производных бензимидазола как основа для создания новых лекарственных препаратов и оптимальных схем фармакотерапии / Л.А. Смирнова: Автореф. дис. д-ра мед. наук. – Волгоград, 2004. – 26 с.

220. Смирнова, Л.А. Физико-химические свойства и количественное определение биологически-активных соединений, производных бензимидазола / Л.А. Смирнова, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // Национальный конгресс «Человек и лекарство» – Харьков, 2000. – Т. 12, № 1. – С. 188–194.

221. Смирнова, О. М. Комбинированная терапия сахарного диабета типа 2 / О.М. Смирнова // Проблемы эндокринологии. – 2005. – Т. 51. – № 3. – С. 7–10.

222. Смирнова, О. М. Глюкованс: преимущества терапии сахарного диабета типа 2 фиксированной комбинацией / О. М. Смирнова // ConsiliumMedicum. – 2006. – Т. 8, № 9. – С. 23–28.

223. Снигур Г.Л. К вопросу стандартизации патогистологической диагностики сахарного диабета / Снигур Г.Л., Смирнов А.В. // Вестник ВолгГМУ. – Вып. 3 (35). – С. 112–115.

224. Соколовский, В.В. Гистохимические исследования в токсикологии / В.В. Соколовский. – Л.: Медицина, Ленинградское отделение, 1971. – 176 с.

225. Спасов А.А. Антидиабетические свойства Гимнемы лесной (обзор) / Спасов А.А., Самохина А.Е., Буланов А.Е // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т.42, №11. – С. 1014.

226. Спасов, А.А. Антитромботическая активность гипогликемических средств / А.А. Спасов, А.Ф. Кучерявенко, М.В. Чепурнова, Ленская К.В. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2011. – №2(38). – С. 95–98.

227. Спасов А.А. Диабенол – новое противодиабетическое вещество с гемобиологическими свойствами / А.А. Спасов, Е.С. Гаврилова // Вестник ВМА. – 1997. – № 3. – С. 47–51.

228. Спасов А.А. Инкретин (физиология, патология, фармакология) / Спасов А.А., Воронкова М.П., Буланов А.Е // Вопросы биологической и фармацевтической химии. – 2009. – №4. – С. 3–7.

229. Спасов А.А. Создание гипогликемических препаратов с антиагрегантными свойствами на основе конденсированных производных бензимидазола / А.А. Спасов, Г.П. Дудченко, А.Ф. Турчаева и др. // ВМА. – 1995. – №1. – С. 33–36.

230. Спасов А.А. Спектр фармакологической активности и токсикологические свойства производных бензимидазола / А.А. Спасов, И.Н. Ёежица, Л.И. Бугаева и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 1999. – т. 33, №5. – С. 232–243.

231. Спасов А.А. Фармакодинамические и фармакокинетические свойства соединения РУ-254 / А.А. Спасов, Г.П. Дудченко, Л.А. Смирнова, Е.С. Гаврилова // Вестник ВМА. – 1999. – №5. – С. 34–36.

232. Спасов А.А. Фармакокинетика некоторых производных бензимидазола / А.А. Спасов, Л.А. Смирнова, И.Н. Ёежица и др. //

Вопросы медицинской химии. – Волгоград, – 2001. – Т. 47, № 4. – С. 233-258.

233. Спасов, А.А. Фторфенилпроизводные конденсированных производных бензимидазолов, селективные каппа агонисты / А.А. Спасов, О.Ю. Гречко, Н.В. Елисеева и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – т. 73. – с. 83.

234. Спасов, А.А. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 / А.А. Спасов, М.П. Воронкова, Г.Л. Снигур и др. // Биомедицина. – 2011. – № 3. – С. 12–18.

235. Спасов, А.А. (ред.) P2Y<sub>1</sub>-рецепторы. Молекулярно-биологические, химические и фармакологические аспекты / А.А. Спасов, Д.С. Яковлев, Т.М. Букатина. – Lambertacademic Publishing, Германия, 2013. – 197 с.

236. Спасов, А.А. Антидиабетогенные свойства Гимнемы лесной (обзор) / А.А. Спасов, А.Е. Буланов, М.П. Самохина // Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 42, №11. – С. 10–14.

237. Спасов, А.А. Антисеротониновая активность производных трициклических бензимидазольных систем / А.А. Спасов, М.В. Черников, Д.С. Яковлев и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2006. – т. 40, №11. – С. 23–26.

238. Спасов, А.А. Антитромбогенная активность антиоксидантных соединений / А.А. Спасов, А.Ф. Кучерявенко, В.А. Косолапов и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – т. 155, №6. – с. 740–742.

239. Спасов, А.А. Влияние гипогликемических средств на гемореологические параметры крови / А.А. Спасов, А.Ф. Кучерявенко, О.А. Салазникова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2009. – Т. 72, №5. – С. 31–34.

240. Спасов, А.А. Влияние производного бензимидазола, проявляющего гипогликемическую активность, на процессы репродукции крыс самок / А.А. Спасов, Е.А. Кузубова, Л.И. Бугаева и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т.73, № 10. – С. 31–33.

241. Спасов, А.А. Гипогликемический потенциал производных бензимидазола / А.А. Спасов, К.В. Ленская, П.М. Васильев // Химико-фармацевтический журнал. – 2015. – Т. 49. – № 8. – С. 3–7.

242. Спасов, А.А. Гистаминовые рецепторы: молекулярно-биологические и фармакологические аспекты / А.А. Спасов, М.В. Черников, П.М. Васильев. – Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2007. – 152 с.

243. Спасов, А.А. Количественное определение лекарственных препаратов производных бензимидазола методом ВЭЖХ / А.А. Спасов, Л.А.Смирнова, В.А. Анисимова // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – №9. – С. 43.

244. Спасов, А.А. Методические рекомендации по доклиническому изучению пероральных лекарственных средств для лечения сахарного диабета / А.А. Спасов, М.П. Воронкова, Г.Л. Снигур и др. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.:Гриф и К., 2012. – С. 672–686.

245. Спасов, А.А. Научные подходы к комбинированной терапии сахарного диабета типа 2 / А.А. Спасов, М.В. Чепурнова // Вестник ВолгГМУ. – 2011. – №1. – С. 8–12.

246. Спасов, А.А. Некоторые аспекты механизма действия новых гипогликемических веществ / А.А. Спасов, Г.П. Дудченко, Т.А. Калякина // Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической фармакологии». – СПб., 1999. – С. 12–17.

247. Спасов, А.А. Новое отечественное гипогликемическое средство с гемореологическими свойствами – Диабенол (экспериментальное исследование) / А.А. Спасов, В.И. Петров, В.А. Анисимова [и др.] // Материалы IV Всероссийского диабетологического конгресса. – М., 2008. – С. 336.

248. Спасов, А.А. Поиск антигистаминовых веществ среди имидазо- и тиазолбензимидазолов / А.А.Спасов, М.В. Черников, В.А. Анисимова и др. // Химико-фармацевтический журнал. – 2000. – т. 34, №2. – С. 6–10.

249. Спасов, А.А. Создание гипогликемических препаратов с антиагрегантными свойствами на основе конденсированных производных бензимидазола / А.А. Спасов, Г.П. Дудченко, А.Ф. Турчаева, С. Г. Ковалев, и др. // Вестник ВМА. – 1995. – №1. – С. 33–36.

250. Спасов, А.А. Спектр фармакологической активности и токсикологические свойства производных бензимидазола / А.А. Спасов, И.Н. Иёжица, Л.И. Бугаева, В.А. Анисимова // Химико-фармацевтический журнал. – 1999. – Т. 33, №5. – С. 6–17.

251. Спасов, А.А. Структура и биологическая роль NHE1. Фармакологическая регуляция его активности / А.А. Спасов, Н.А. Гурова, М.В. Харитовнова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – т. 76. – С. 43–48.

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

253. Стаценко, М.Е. Поражение сердца у больных сахарным диабетом 2-го типа: факторы риска и механизмы развития / М.Е. Стаценко, С. В. Туркина // Вестник ВолгГМУ. – 2010. – Т. 33, № 1. – С. 9–14.

254. Строков, И.А. От тиаминa к бенфотиамину: современные подходы в лечении диабетической полиневропатии / И.А. Строков, К.И. Строков, Т.В. Солуянова // Фарматека. – 2006. – № 7. – С. 57–61.

255. Таран, А.С. Методы оценки дипептидилпептидаза-4 ингибирующей активности *in vitro* / А. С. Таран, Н. И. Чепляева // Научно-медицинский журнал. – Волгоград, 2014. – №1. – С. 26–29.

256. Ткачук, В.А. Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину / В.А. Ткачук, А.В. Воротников // Сахарный диабет. – 2014. – № 2. – С. 29–40.

257. Ткачук, В.А. Клиническая биохимия / В.А. Ткачук, В.Н. Бочков. – 2-е изд., испр. и доп. – М., 2004. – 512 с.

258. Тодоров, И.Н. Митохондрии: окислительный стресс и мутации митохондриальной ДНК в развитии патологий процессе старе-

ния и апоптозе / И. Н. Тюдоров // Российский химический журнал. – 2007. – Т. L1, № 11. – С. 93–106.

259. Тронько, Н.Д. Радионуклидная диагностика диабетических ангиопатий / Н.Д. Тронько, А.С. Ефимов, В.Н. Славков и др. // Журнал АМН Украины. – 2002. – Т.8, № 3. – С. 522–534.

260. Туманов, В.П. Культивирование эпидермоцитов экспериментальных животных и человека / В.П. Туманов, К.Ш. Матевосян, Л.С. Басагина и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1987. – №7. – С. 110–113.

261. Тюренков И.Н. Десять новых мишеней для разработки лекарственных средств для лечения СД2 и метаболического синдрома / Тюренков И.Н., Куркин Д.В., Волотова Е.В. и др. // Сахарный диабет. – 2015. – №1. – С. 101–109.

262. Узбеков, Г.А. Определение аминного азота в белках и аминокислотах калориметрическим нингидридным методом / Г.А.Узбеков // Вопросы медицинской химии. –1958. – Т.4. – С. 69.

263. Узбекова, Д.Г. Кравковы: два поколения ученых из Рязани / Д.Г. Узбекова. – М.: Верге, 2014 – С. 155–162.

264. Ульямз, Г. Руководство по диабету / Г. Ульямз, Д. Пикап. – М.: Медпресс-информ, 2003. – С. 5–12.

265. Фархутдинов, Р.Р. Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и медицине / Р.Р. Фархутдинов, В. А. Лиховских. – Уфа, 1995. – 110 с.

266. Федотов В.П., Гебель Г.Я., Соколов Я.А., Честухин В.В. Исследование содержания гормона роста и инсулина в плазме крови человека, оттекающей от различных органов // Проблемы эндокринологии. – 1973. – Т. 19, №4. – С. 6–9.

267. Филимонов, Д.А. Прогноз спектра биологической активности органических соединений / Д.А. Филимонов, В.В. Поройков // Рос. хим. журн. РХО им. Д. И. Менделеева. – 2006. – Т. 50, №2. – С. 66–75.

268. Функциональные методы исследования в эндокринологии / З.И. Цюхно, В.Н. Славнов, Н.И. Панченко и др. – Киев: Здоровье, 1981. – 240 с.

269. Хропова, Т.Н. Влияние производных имидазобензимидазола, обладающих антиоксидантными и гемореологическими свойствами, на выживаемость кожи в условиях редуцированного кровообращения / Т.Н. Хропова: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Старая Купавна, 2004. – 20 с.

270. Чазова, И.Е. Метаболический синдром / И.Е. Чазова, В.Б. Мычка // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2003. – № 3. – С. 32–38.

271. Чёгёр, С.И. Транспортная функция сывороточного альбумина / С.И. Чёгёр. – Бухарест: Изд-во акад. соц. республики Румынии, 1975. – С. 60–68.

272. Чепляева, Н. И. Антиоксидантная активность пероральных сахароснижающих средств / Н. И. Чепляева, А. А. Спасов, В. А. Косолапов // Проблемы эндокринологии. – 2011. – Т. 57, № 4. – С. 21–24.

273. Чернов, Ю.Н. Особенности патогенеза и возможные пути фармакологической коррекции инсулинзависимого сахарного диабета / Ю.Н. Чернов, А.Н. Пашков, М.В. Васин и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1999. – Т. 62, № 3. – С. 60–66.

274. Чернух, А.М. Микроциркуляция / А.М. Чернух, П.Н. Александров, О.В. Алексеев. – 2-е изд. – М.: Медицина, 1984. – 429 с.

275. Чистяков, Д.А. Гены антиоксидантной защиты и предрасположенность к сахарному диабету / Д.А. Чистяков, К.В. Савостьянов, Р.И. Туракулов // Сахарный диабет. – 2000. – Т. 3. – С. 2–7.

276. Шадурский, К.С. К вопросу об организации поиска лекарственных препаратов / К.С. Шадурский // Химико-фармацевтический журнал. – 1977. – Т. 11, № 8. – С. 48–53.

277. Шестакова, М.В. Сахарный диабет: острые и хронические осложнения / М.В. Шестакова, Е.Г. Старостина, А.С. Северина [и др.]; под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой. – М.: Медицинское информационное агентство, 2011. – 477 с.: ил.

278. Шварц, В. Применение ингибиторов дипептидилпептидазы-4 для лечения сахарного диабета 2-го типа / В. Шварц // Проблемы эндокринологии. – 2008. – Т. 54, № 4. – С. 39–45.



279. Шолохов, В.М. Способ количественной оценки влияния лекарственных средств и других факторов на жизнеспособность ишемизированного кожного лоскута / В.М. Шолохов, Б.И. Любимов, В.Н. Самойлов и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1986. – Т. 101, № 3. – С. 375–376.

280. Шолохов, В.М. Фармакологическая регуляция реконструктивных и восстановительных операций / В.М. Шолохов: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1986. – 40 с.

281. Шубина, А.Т. Метаболический синдром: возможности применения метформина / А.Т. Шубина, И.Ю. Демидова, Н.А. Чернова, Ю.А. Карпов // Русский медицинский журнал. – 2001. – Т.2, № 9. – С. 77–81.

282. Шумаков, В.И. Фармакологическая защита трансплантата / В.И. Шумаков, Н.А. Онищенко, В.И. Кирпатовский. – М.: Медицина, 1983. – 230 с.

283. Юрина, М.А. Аллоксановый диабет – модель свободнорадикальной патологии / М.А. Юрина, О.А. Адейкина // Сб. материалов Всероссийской научно-практической конференции. Секция 1–3. – Сургут, 2002. – С. 275–277.

284. Янькова, В.И. Антиоксидантное действие гепатопротектора максара при экспериментальном диабете / В.И. Янькова, И.Л. Иванова, С.А. Федореев и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – Т. 65, № 4. – С. 33–36.

285. Acharya, J.D. Islets and their antioxidant defense / J.D. Acharya, S. S. Ghaskadbi // Islets. – 2010. – Vol. 2. – № 4. – P. 225–235.

286. Adewole, S.O. Protective effect of quercetin on the morphology of pancreatic  $\beta$ -cells of streptozotocin treated diabetic rats / S.O. Adewole, E.A. Caxton-Martins, J.A.O. Ojewole // Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med. – 2007. – Vol. 4. – № 1. – P. 64–74.

287. Afkhami-Ardekani, M. Effect of vitamin C on blood glucose, serum lipids and serum insulin in type 2 diabetes patients / M. Afkhami-Ardekani, A. Shojaoddiny-Ardekani // Indian J. Med. Res. – 2007. – Vol. 126. – №5. – P. 471–474.

288. Ahmad, I. Naturforsch. N-Arylsulfonyl-benzimidazolones as Potential Hypoglycemic Agents / I. Ahmad [et al.] // Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen. – 2002. – Vol. 57. – P. 349–354.

289. Ahmed, N. Роль конечных продуктов гликирования в патогенезе осложнений сахарного диабета / N. Ahmed, P. J. Thornalley // РМЖ. – 2009. – Т. 17. – № 9. – С. 643–651.

290. Alice, Y.Y. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus / Y.Y. Alice, I. Cheng, G. Fantus // CMAJ. – 2005. – Vol. 172, №2. – P. 213–226.

291. Androne, L. In vivo effect of lipoic acid on lipid peroxidation in patients with diabetic neuropathy / L. Androne, N. A. Gavan, I. A. Veresiu, R. Orasan // InVivo. – 2000. – Vol. 14. – № 2. – P. 327–330.

292. Anisimov, V.N. Carcinogenesis and Aging / V.N. Anisimov. – Vol. 2. CRC Press, Boca Raton: CRC Press, 1987. – 148 p.

293. Anisimov, V.N. InsulinIGF-1 signaling pathway driving aging and cancer as a target for pharmacological intervention / V.N. Anisimov // Exp. Gerontol. – 2003. – Vol. 19, №38. – P. 1041–1049.

294. Anisimov, V.N. Life span extension and cancer risk: myths and reality / V.N. Anisimov // Exp. Gerontol. – 2001. – Vol. 36. – P. 1101–1136.

295. Anisimov, V.N. Melatonin and colon carcinogenesis: I. Inhibitory effect of melatonin on development of intestinal tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats / V.N. Anisimov, I.G. Popovich, M.A. Zabezhinski // Carcinogenesis. – 1997. – Vol. 18. – P. 1549–1553.

296. Anisimov, V.N. Spontaneous tumors in outbred LIO rats / V.N. Anisimov, G.B. Pliss, M.G. Loganssen, et al. // J. Exp.Clin.Cancer Res. – 1989. – Vol. 6. – P. 264–262.

297. Arulmurugan, S. Synthesis and potential cytotoxic activity of some new benzoxazoles, imidazoles, benzimidazoles and tetrazoles / S. Arulmurugan, H.P. Kavitha // Acta Pharmaceutic. – 2013. – №63. – P. 253–264.

298. Ashcroft F.M., Gribble F.M. Sulfonilurea stimulation of insulin secretion: lessons from studies of cloned channels // J. Diabetes Compl. – 2000. – №12. – P. 2182–2188.

299. Goswami B. Pharmacological activities of benzimidazole derivatives – an overview / B. Goswami [et al.] // *Int. J of Sci. inn. and discov.* – 2012. – Vol. 2(1). – P. 121–136.

300. Bailey, C. . Earlier intervention in type 2 diabetes: the case for achieving early and sustained glycaemic control / C.J. Bailey, S. Del Prato, D. Eddy, et al. // *Int. J. Clin. Pract.* – 2005. – Vol. 59, № 11. – P. 1309–1316.

301. Bailey, C.J Metformin / C.J. Bailey, R.C.Tumer // *N. Engl. J. Med.* – 1996. – 334. – P. 574–579.

302. Bain, S.C. Treatment of type 2 diabetes mellitus with orally administered agents: advances in combination therapy / S.C. Bain // *Endocr. Pract.* – 2009. – Vol. 15, № 7. – P. 750–762.

303. Bajpai, N. Open labelled, prospective, non-comparative, multicentric post marketing experience for evaluation of efficacy and safety of Glizid-M in type 2 diabetes / N. Bajpai, A. P. Singh, A. Chatterjee // *Ind. Pract.* – 2005. – Vol. 58. – № 6. – P. 1202–1208.

304. Bakaev, V.V. Effect of 1-butylbiguanide hydrochloride on the longevity in the nematoda *Caenorhabditis elegans* / V.V. Bakaev // *Biogerontology.* – 2002. – V.3. Suppl. 1. – P. 23–24.

305. Barker, H.A. Isolation and Properties of Crystalline Cobamide Coenzymes Containing Benzimidazole or 5,6-Dimethylbenzimidazole / H. A. Barker, R. D. Smyth, H. Weissbach, et al. // *J. Biol. Chem.* – 1960. – Vol. 235, №2. – P. 480–488.

306. Barnes A.J. Oughton J., Kohner E.M. Blood rheology and the progression of diabetic retinopathy: a prospective study. *Clin Hemorheol.* – 1987. – №7. – P. 460.

307. Barrett, A.J. Laboratory Randbook / A.J. Barrett, A. Lisosomes. // Ed. J.T. Dingle. Amsterdam, 1977. – P. 40–105.

308. Beisswenger, P. Metformin inhibition of glycation processes / P. Beisswenger, D. Ruggiero-Lopez // *Diabetes Metab.* – 2003. – Vol. 29, № 4. – P. 6S95-6S103.

309. Bergans, N. Molecular mode of inhibition of glycogenolysis in rat liver by the dihydropyridine derivative, BAY R3401: inhibition and inactivation of glycogen phosphorylase by an activated metabolite /

N. Bergans, W. Stalmans, S. Goldmann [et al.] // *Diabetes*. – 2000. – Vol. 49, №9. – P. 1419–1426.

310. Bergmeier, W. Novel molecules in calcium signaling in platelets / W. Bergmeier, L. Stefanini // *J. Thromb Haemost.* – 2009. – №1. – P. 187–190.

311. Bhaskar, V. A fully human, allosteric monoclonal antibody that activates the insulin receptor and improves glycemic control / V. Bhaskar, I.D. Goldfine, D.H. Bedinger [et al.] // *Diabetes*. – 2012. – Vol. 61, №5. – P. 1263–1271.

312. Bickerton, G.R. Quantifying the chemical beauty of drugs / G.R. Bickerton, G.V. Paolini, J. Besnard, S. Muresan, A.L. Hopkins // *Nat. Chem.* – 2012. – Vol. 4. – №2. – P. 90–98.

313. Biewenga, G. Lipoic acid favors thiolsulfinate formation after hypochlorous acid scavenging: a study with lipoic acid derivatives / G. Biewenga, J. de Jong, A. Bast // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1994. – Vol. 312, № 1. – P. 114–120.

314. Biewenga, G.P. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid / G.P. Biewenga, G. R. Haenen, A. Bast // *Gen. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 29, № 3. – P. 315–331.

315. Black, E. Structure-based design of protein tyrosine phosphatase-1B inhibitors / E. Black, J. Breed, A.L. Breeze [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2005. – Vol. 15 – P. 2503–2507.

316. Blocka, K. Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes / K. Blocka, Y. Gorina, H. E. Abbouda // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106, № 34. – P. 14385–14390.

317. Bomhard, E. Spontaneous tumors in NMRI mice from carcinogenicity studies / E. Bomhard, U. Mohr // *Exp. Pathol.* – 1989. – Vol. 36. – P. 129–145.

318. Bondensgaard, K. Recognition of Privileged Structures by G – Protein Coupled Receptors / K. Bondensgaard // *J. Med. Chem.* – 2004. – 47. – P. 888–899.

319. Bonnefont-Rousselot, D. Consequences of diabetic status on the oxidant/antioxidant balance / D. Bonnefont-Rousselot, J.P. Bastard,

M.C. Jaudon, J. Delattre // *Diabetes Metab.* – 2000. – Vol. 26, № 3. – P. 163–176.

320. Born, G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal / G.V.R. Born // *Nature.* – 1962. – Vol. 194. – P. 927.

321. Bottino, R. Response of Human Islets to Isolation Stress and the Effect of Antioxidant Treatment / R. Bottino, A.N. Balamurugan, H.Tse // *Diabetes.* – 2004. – Vol. 53. – P. 2559–2568.

322. Brenk, R. Lessons learnt from assembling screening libraries for drug discovery for neglected diseases / R. Brenk, A. Schipani, D. James, [et al.] // *ChemMedChem.* – 2008. – Vol. 3, № 3. – P. 435–444.

323. Broto, P. Molecular structures: perception, autocorrelation descriptor and SAR studies: system of atomic contributions for the calculation of the n-octanol/water partition coefficients / P. Broto, G. Moreau, C. Vandycke // *Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ther.* – 1984. – Vol. 19, №1. – P. 71–78.

324. Byme M.M., Sturis J. Insulin secretion in humans: plesiologic regulation and alterations in disease states // *Diabetes Mellitus, A Fundamental and Clinical Text. 2 Edi.* / Leroith D., Taylor S.I., Olefsky J.M., Lippincot. Raven. – New York, 1996.

325. Bywater, R.P. Privileged structures in GPCRs / R.P. Bywater // *Ernst Schering Foundation Symposium Proceedings.* – 2006. – Vol. 2. – P. 75–91.

326. Sharpe, R.S. Shadbolt Phenacylthioimidazolines and 3-aryl-5, 6-dihydroimidazo [2, 1-b] thiazoles with antidepressant activity // *J. Med. Chem.* – 1971. – V. 14, №10. – P. 977–982.

327. Caprio, S. Improvement of metabolic control in diabetic patients during mebendazole administration: a preliminary studies / S. Caprio, T.K. Ray, G. Boden, et al. // *Diabetologia.* – 1984. – №27. – P. 52–55.

328. Carling D. The AMP-activateol protein kinase cascade: aunifying system for energy cjntrol / Carling D. // *Trends Biochem. Sci.* – 2004. – №29. – P. 18–24.

329. Caswell, A.H. Selectivity of cation chelation to tetracyclines: evidence for special conformation of calcium chelate / A. Caswell, J.D. Hutchison // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1971. – Vol. 43(3). – P. 625–630.

330. Cauley, J.A. Lipid-lowering drug use and breast cancer in older women: a prospective study / J.A. Cauley, J.M. Zmuda, L.Y. Lui et al. // *J. Womens Health*. – 2003. – Vol. 12. – P.749–756.

331. Ceolotto, G. Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism / G. Ceolotto, A. Gallo, I. Papparella, et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2007. – Vol. 27, №12. – P. 2627–2633.

332. Ceriello, A. Antioxidant anti-inflammatory treatment in type 2 diabetes / A. Ceriello, R. Testa // *Diabetes Care*. – 2009. – Vol. 32. – P. S232–S236.

333. Ceriello, A. The metabolic memory: is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? /A. Ceriello, M.A. Ihnat, J.E.Thorpe // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2009. – V. 94. – P. 410–415.

334. Chao, E.C. SGLT2 inhibition – a novel strategy for diabetes treatment / E.C. Chao, R.R. Henry // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2010. – Vol. 9, №7. – P. 551–559.

335. Chena, D. A nonpeptidic agonist of glucagon-like peptide 1 receptors with efficacy in diabetic db/db mice / D. Chena, J. Liaoa, N. Lia [et al.] // *PNAS*. – 2007. – Vol. 104, №3. – P. 943–948.

336. Cheng, A.Y.Y. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus / A.Y.Y. Cheng, I.G. Fantus // *CMAJ*. – 2005. – Vol. 172. – № 2. – P. 387–397.

337. Chitre, M.M. Treatment Algorithms and the Pharmacological Management of Type 2 Diabetes / M.M. Chitre, S. Burke // *Diabetes Spect.* – 2006. – Vol. 19, № 4. – P. 249–255.

338. Chougale, A. Optimization of alloxan dose is essential to induce stable diabetes for prolonged period / A. Chougale, S. Panascar, P.Gurao // *Asian J. of Biochemistry*. – 2007. – №2. – P. 402–408.

339. Colangelo, L.A. Colorectal cancer mortality and factors related to the insulin resistance syndrome / L.A. Colangelo, S.M. Gapstur, P.H. Gann, et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2002. – Vol. 11. – P. 385–391.

340. Colomer, J. Identification and inhibitory properties of a novel Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin antagonist / J. Colomer, A. Allison, E. Schmitt // *Biochemistry.* – 2010. – №49. – P. 4244–4254.

341. Coman, O.A. Beta 3 adrenergic receptors: molecular, histological, functional and pharmacological approaches / O.A. Coman, H. Paunescu, I. Ghita [et al.] // *Romanian Journal of Morphology and Embryology.* – 2009. – Vol. 50, №2. – P. 169–179.

342. Cox, D.R. *Analysis of Survival Data* / D.R. Cox, D. Oakes. London: Chapman & Hall, 1996.

343. Crino, A. A randomized trial of nicotinamide and vitamin E in children with recent onset type 1 diabetes (IMDIAB IX) / A. Crino, R. Schiaffini, S. Manfrini // *European Journal of Endocrinology.* – 2004. – Vol. 150. – P. 719–724.

344. Croasdell G. American Diabetes association – 70th scientific sessions – research on novel therapeutics. / Croasdell G. // *Drugs.* – 2010. – Sept; 13 (9). – P. 588–600.

345. Cunningham, J. J. The glucose/insulin system and vitamin C: implications in insulin-dependent diabetes mellitus / J. J. Cunningham // *J. Am. Coll. Nutr.* – 1998. – Vol. 17. – № 2.– P. 105–108.

346. Dabbs, D.J. *Diagnostic Immunohistochemistry*, 4th Edition, Elsevier. 2014. – 960 p.

347. Da Ros, R. Molecular targets of diabetic vascular complications and potential new drugs / R. da Ros, R. Assaloni, A. Ceriello // *Curr. Drug Targets.* – 2005. – Vol. 6, № 4. – P. 503–509.

348. Dang, Q. Fructose-1,6-bisphosphatase Inhibitors. 2. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationship of a Series of Phosphonic Acid Containing Benzimidazoles that Function as 50 – Adenosinemonophosphate (AMP) / Q. Dang, S. Kasibhatla, W. Xiao [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 53(1). – P. 441–451.

349. De Simone, R.W. Privileged Structures: applications in drug discovery / R.W. De Simone, K.S. Currie, S.A. Mitchell, et al. // Combinatorial chemistry and high Throughput screening. – 2004. – №7. – P. 473–479.

350. De Souza Silva, F.M. Effects of metformin on glucose metabolism of perfused rat livers / F.M. De Souza Silva, M.H. Rocha Alves da Silva, A. Bracht, et al. // Mol. Cell. Biochem. – 2009. – Vol. 340, № 1–2. – P. 283–289.

351. DeFronzo R.A., Bonadonna R.C., Ferranini A. Patogenesis of NIDDM // A balanced overview. Diabetes care. – 1992. – №15. – P. 318–368.

352. Dellavalle, R.P. Melanoma chemoprevention: a role for statins or fibrates? / R.P. Dellavalle, M.K. Nicholas, L.M. Schilling // Am. J. Ther. – 2003. – Vol. 10. – P. 203–210.

353. DeSimone, R.W. Privileged Structures: Applications in Drug Discovery / R.W. DeSimone, K.S. Currie, S.A. Mitchell, et al. // Comb. Chem. High Throughput Screen. – 2004. – Vol. 7, №5. – P. 473–494.

354. Dewar, M.J.S. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model / M.J.S. Dewar, E.G. Zebisch, E.F. Healy, J.J.P. Stewart // J. Amer. Chem. Soc. – 1985. – Vol. 107, № 13. – P. 3902–3909.

355. Dharmalingam, M. Liraglutide: A review of its therapeutic use as a once daily GLP-1 analog for the management of type 2 diabetes mellitus / M. Dharmalingam, U. Sriram, M.P. Baruah // Indian J. Endocrinol. Metab. – 2011. – Vol.15, №1. – P. 9–17.

356. Dias, A.S. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats / A.S. Dias, M. Porawski, M. Alonso, et al. // J. Nutr. – 2005. – Vol. 135. – №10. – P. 2299–2304.

357. Dilman, V.M. Ageing, metabolic immunodepression and carcinogenesis / V.M. Dilman // Median. Ageing and Develop. – 1978. – Vol. 8, № 3. – P. 153–173.

358. Dilman, V.M. Development, Aging and Disease. A Neu Rationale for an Intervention Strategy / V.M Dilman. – Chur: Harwood Academic Publ., 1994. – 387 p.



359. Dilman, V.M. Effect of treatment with phenoformin, dyphenyl-hydantoin or L-DOPA on life span and tumor incidence in C3H/Sn mice / V.M. Dilman, V.N. Anisimov // *Gerontology*. – 1980. – Vol. 26. – P. 241–245.

360. Dilman, V.M. Hypothalamic mechanisms of ageing and of specific age pathology-1. Sensitivity threshold of hypothalamo-pituitary complex to homeostatic stimuli in the reproductive system / V.M. Dilman, V.N. Anisimov // *Exp. Gerontol.* – 1979. – Vol. M. – P. 161–174.

361. Dilman, V.M. Inhibition of DMBA-induced carcinogenesis by phenformin in the mammary gland of rats / V.M. Dilman, L.M. Berstein, M.A. Zabezhinski, et al. // *Arch.Geschwulstforsch.* – 1978. – Vol. 48. – P.1–8.

362. DiMinno, G. Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol / G. DiMinno, M.J. Silver // *J. Pharmacol Exp Ther.* – 1983. – №225(1). – P. 57–60.

363. Dintenfass, L. Modifications of blood rheology during aging and agrelated pathological conditions / L. Dintenfass // *Aging (Milano)*. – 1989. – Vol. 1. – №2. – P. 99–125.

364. Drug Likeness Tool (DruLiTo): Официальный сайт National Institute of Pharmaceutical Education and Research (NIPER S.A.S.), 2015 – URL: [http://www.niper.gov.in/pi\\_dev\\_tools/DruLiToWeb/DruLiToindex.html](http://www.niper.gov.in/pi_dev_tools/DruLiToWeb/DruLiToindex.html).

365. Drzewoski, J. The role of metabolic memory in the natural history of diabetes mellitus / J. Drzewoski, J. Kasznicki, Z. Trojanowski // *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej*. – 2009. – V. 119. – № 7–8. – P. 493–499.

366. Duckworth, W. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes / W. Duckworth, C. Abraira, T. Moritz, et al. // *N. Eng. J. Med.* – 2009. – Vol. 360. – №2. – P. 129–139.

367. Duhault, J. The pharmacology of S 1702, a new highly effective oral antidiabetic drug with unusual properties / J. Duhault, M. Baulanger, L. Beregi // *Aezneim. Forsch.* – 1972. – V. 22. – P. 1682–1685

368. Dungan, K.M. Effects of therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus with a peptide derived from islet neogenesis associated protein (INGAP) / K.M. Dungan, J.B. Buse, R.E. Ratner // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2009. – Vol. 25, №6. – P. 558–65.

369. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1997.

370. Evans B.E. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystinin antagonists / B.E. Evans, K.E. Rittle, M.G. Bock, et al. // *J. Med. Chem.* – 1988 Dec. – №31 (12). – P. 2235–46.

371. Evans, J.L. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes / J. L. Evans, I. D. Goldfine, B. A. Maddux, G. M. Grodsky // *Endocr. Rev.* – 2002. – Vol. 23. – № 5. – P. 599–622.

372. Evans, J. L. Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes / J.L. Evans, I.D. Goldfine // *Diabetes Technol. Ther.* – 2000. – Vol. 2. – №3. – P. 401–413.

373. Everitt, A.V. The effects of hypophysectomy and continuous food restriction, begun at ages 70 and 400 days, on collagen aging, proteinuria, incidence of pathology and longevity in the male rat / A.V. Everitt, N.J. Seedsman, F. Jones // *Mech. Ageing Dev.* – 1980. – Vol. 12. – P. 161–172.

374. Facchini, F.S. Hyperinsulinemia: the missing link among oxidative stress and age-related diseases? / F.S. Facchini, N.W. Hua, G.M. Reaven, et al. // *Free Radicals Biol. Med.* – 2000. – Vol. 29. – P. 1302–1306.

375. Fei, F. New substituted benzimidazole derivatives: a patent review / F. Fei, Z. Zhou // *Expert Opin Ther Pat.* – 2013. – Vol. 23, №9. – P. 1157–1179.

376. Felig, P. Influence of endogenous insulin secretion on splanchnic glucose and amino acid metabolism in man / P. Felig, J. Wahren // *J. Clin. Invest.* – 1971. – Vol. 50, №8. – P. 1702–1711.

377. Fisman, E.Z. A cardiologic approach to non-insulin antidiabetic pharmacotherapy in patients with heart disease / E.Z. Fisman, A.Tenenbaum // *Cardiovasc. Diabet.* – 2009. – Vol. 8, №38. – P. 1–13.

378. Foretz, M. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via decrease in hepatic energy state / M. Foretz, S. Hebrard, J. Leclerc, et al. // *J. Clin. Invest.* – 2010. – Vol. 120, №7. – P. 2355–2369.

379. Francke, S. TAK-677 (Dainippon/Takeda) / S. Francke // *Curr. Opin. Investig. Drug.* – 2002. – Vol. 11, №3. – P. 1624–1628.

380. Friedewald, W. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge / W. Friedewald, R. Levy, D. Fredrickson // *Clin. Chem.* – 1972. – Vol. 18, № 6. – P. 499–502.

381. Fujimoto, K. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic  $\beta$ -cell survival / K. Fujimoto, K.S. Polonsky // *Diabetes Obes. Metab.* – 2009. – Vol. 11(Suppl 4.). – P. 30–37.

382. Furie, B. Thrombus formation in a living mouse / B. Furie, B.C. Furie // *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* – 2006. – №35(1-2). – P. 1–4.

383. Fushiki, T. An extract of *Gymnema sylvestre* leaves and purified gymnemic acid inhibits glucose-stimulated gastric inhibitory peptide secretion in rats / T. Fushiki, A. Kojima, T. Imoto // *J. Nutr.* – 1992. – Vol. 122. – P. 2367–2373.

384. Gallagher, M.P. Making progress: preserving beta cells in type 1 diabetes / M.P. Gallagher, R.S. Goland, C.J. Greenbaum // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2011. – Vol. 1243. – P. 119–134.

385. Gallwitz, B. The evolving place of incretin-based therapies in type 2 diabetes / B. Gallwitz // *Pediatr Nephrol.* – 2010. – Vol. 25. – P. 1207–1217.

386. Gargiulo, P. Metformin decreases platelet superoxide anionproduction in diabetic patients / P Gargiulo, D. Caccese, P. Pignatelli et al. // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2002. – Vol. 18. – P. 156–159.

387. Gart, J.J. Statistical methods in cancer research / J.J. Gart, D. Krewski, P.N. Lee. – IARC Sci.Publ., № 79. – Lyon: IARC, 1986.

388. Gasteiger, J. Chemoinformatics: A Textbook / Eds.: J. Gasteiger, T. Engel. // Weinheim (Germany): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003. – 649 P.

389. Gauss System and Graphic Manual. Maple Valley: Aptech Systems, Inc., 1994.

390. Ghose, A.K. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases / A.K. Ghose, V.N. Viswanadhan, J.J. Wendoloski // J. Com. Chem. – 1999. – Vol. 1. – № 1. – P. 55–68.

391. Ghose, A.K. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases / A.K. Ghose, V.N. Viswanadhan, J.J. Wendoloski // J. Com. Chem. – 1999. – Vol. 1. – №1. – P. 55–68.

392. Ghose, A.K. Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions / A.K. Ghose, G.M. Crippen // J. Chem. Inf. Comput. Sci. – 1987. – Vol. 27, № 1. – P. 21–35.

393. Gibaldi, M. Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics / M. Gibaldi – Philadelphia: Lea&Febiger, 1991. – P. 24–32.

394. Giordanetto F. Direct AMR-activated protein kinase activators: a review of evidence from the patent literature / Giordanetto F., Karis D. // Expert opinion. Ther. Patents. – 2012. – № 22 (12). – P. 1467–1477.

395. Glavind, J. Antioxidants in animal tissue / J. Glavind // Acta.Chem. Scand. – 1963. – V. 17, № 13. – P. 1635–1640.

396. Golbidi, S. Diabetes and alpha lipoic acid / S. Golbidi, M. Badran, I. Laher // Front. Pharmacol. – 2011. – Vol. 2. – P. 69.

397. Goldstein, B. J. Insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets / B.J. Goldstein, K. Mahadev, X. Wu // Diabetes. – 2005. – Vol. 54, №2. – P. 311–321.

398. Golenhofen, K. Membrane potential and contraction of vascular smooth muscle (portal vein) during application of noradrenaline and high potassium, and selective inhibitory effects of iproveratril (verapamil) / K. Golenhofen, N. Hermstein, E. Lammel // *Microvascular Research*. – 1973. – №5. – P. 73–80.

399. Gorin, Y. Nox as a target for diabetic complications / Y. Gorin, K. Block // *Clin. Sci. (Lond)*. – 2013. – Vol. 125, № 8. – P. 361–382.

400. Gorrell, M.D. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders / M.D. Gorrell // *Clinical Science*. – 2005. – Vol. 108. – P. 277–292.

401. Graham, D.J. Risk of Acute Myocardial Infarction, Stroke, Heart Failure, and Death in Elderly Medicare Patients Treated With Rosiglitazone or Pioglitazone / D.J. Graham, R. Ouellet-Hellstrom, T.E. MaCurdy // *JAMA*. – 2010. – Vol. 304, №4. – P. 411–418.

402. Gratacap, M. The new tyrosine-kinase inhibitor and anticancer drug dasatinib reversibly affects platelet activation in vitro and in vivo / M. Gratacap, V. Martin, M. Valera // *Blood*. – 2009. – №9. – P.1884–1892.

403. Green, B.D. Incretin hormone mimetics and analogues in diabetes therapeutics / B.D. Green, P.R. Flatt // *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*. – 2007. – Vol. 4(21). – P. 497–516.

404. Gribble F.M., Tuckler S.J., Seino S., Ashcroft F.M. Tissue specificity of sulfonylureas: studies on cloned cardiac and B-cell KATP channels // *Diabetes*. – 1998. – №47. – P. 1412–1418.

405. Grundy S.M., Benjamin I.J., Burke G.L., et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the AHA // *Circulation*. – 1999. – № 100. – P. 1134–1146.

406. Gu, W. Long-Term Inhibition of the Glucagon Receptor with a Monoclonal Antibody in Mice Causes Sustained Improvement in Glycemic Control, with Reversible  $\beta$ -Cell Hyperplasia and Hyperglucagonemia / W. Gu, H. Yan, K.A. Winters [et al.] // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2009. – Vol. 331, №3. – P. 871–881.

407. Guerrero-Romero, F. Complementary therapies for diabetes: the case for chromium, magnesium, and antioxidants / F. Guerrero-Romero, M. Rodriguez-Moran // Arch. Med. Res. – 2005. – Vol. 36, № 3. – P. 250–257.

408. Guglielmi, G. Electrothrombosis of saccular aneurysms via endovascular approach. Part 2: Preliminary clinical experience / G. Guglielmi, F. Viñuela, J. Dion, G. Duckwiler // J Neurosurg. – 1991. – 75(1). – P. 8–14.

409. Gupta, K. Insulin: a novel factor in carcinogenesis / K Gupta, G. Krishnaswamy, A. Karnad // Am. J. Med. Sci. – 2002. – V. 323. – P. 140–145.

410. Gupta, R. Emerging Drug Candidates of Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV) Inhibitor Class for the Treatment of Type 2 Diabetes / R. Gupta, S.S. Walunj, R.K. Tokala // Current Drug Targets. – 2009. – Vol. 10. – P. 71–87.

411. Guzik, T.J. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase / T. J. Guzik, S. Mussa, D. Gastaldi, et al. // Circulation. – 2002. – Vol. 105, № 14. – P. 1656–1662.

412. Hagedom, I. Arterial thrombus formation. Novel mechanisms and targets / I. Hagedom, T. Vogtle, B. Nieswandt // Hemostaseologie. – 2010. – №30(3). – P. 127–135.

413. Halliwell, B. Vitamin E and the treatment and prevention of diabetes: a case for a controlled clinical trial / B. Halliwell // Singapore Med. J. – 2002. – Vol. 43, № 9. – P. 479–484.

414. Hanefeld, M. One-year glycemic control with a sulfonylurea plus pioglitazone versus a sulfonylurea plus metformin in patients with type 2 diabetes / M. Hanefeld, P. Brunetti, G. H. Schernthaner, et al. // Diabetes Care. – 2004. – Vol. 27. – № 1. – P. 141–147.

415. Harmon, J.S. Beta-Cell-specific overexpression of glutathione peroxidase preserves intranuclear MafA and reverses diabetes in db/db mice / J.S. Harmon, M. Bogdani, S. D. Parazzoli // Endocrinology. – 2009. – Vol. 150, № 11. – P. 4855–4862.

416. Harrower A. Gliclazid modified release: from once-daily administration to 24-hour blood glucose control // *Metabolism*. – 2000. – №49. – P. 7–11.

417. Herling, A.W. Pharmacodynamic profile of a novel inhibitor of the hepatic glucose-6-phosphatase system / A.W. Herling, H.J. Burger, D.Schwab // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 274. – P. G1087–G1093.

418. Holman, R.R. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes / R.R. Holman, S.K. Paul, M. A. Bethel, et al. // *N. Eng. J. Med.* – 2008. – Vol. 359. – № 15. – P. 1577–1589.

419. Holstein, A. Lower incidence of severe hypoglycemia in patients with type 2 diabetes treated with glimepride versus glibenclamide / A. Holestein, A. Plaschke, E. H. Egberts // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2001. – Vol. 17, №6. – P. 467–473.

420. Horton, D.A. The Combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures / D.A. Horton, G.T. Bourne, M.L. Smythe, et. al. // *Chem. Rev.* – 2003. – № 103. – P. 893–930.

421. Houston, J.B. Progress towards prediction of human pharmacokinetic parameters from in vitro technologies / J.B. Houston, A. Galetin // *Drug Metab. Rev.* – 2003. – Vol. 35, № 4. – P. 393–415.

422. Hu, Y. Effects of nicotinamide on prevention and treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats / Y. Hu, Y. Wang, L. Wang [et al.] // *Clin. Med. J. (Engl.)*. – 1996. – Vol. 109, №11. – P. 819–822.

423. Hundal, R.S. Mechanism by which metformin reduces glucose product in type diabetes / R.S. Hundal, M. Krssak, S. Dufour, et al. // *Diabetes*. – 2000. – Vol. 49, №12. – P. 2063–2069.

424. Iida, K.T. Effect of thiazolidinediones and metformin on LDL oxidation and aortic endothelium relaxation in diabetic GK rats / K.T. Iida, Y. Kawakami, M. Suzuki, et al. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2003. – Vol. 284, № 6. – P. E1125–E1130.

425. Inzucchi, S. E. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus / S.E. Inzucchi, D.G. Maggs, G.R. Spotlett, et al. // *N. Engl. J. Med.* – 1998. – Vol. 338, № 13. – P. 867–872.

426. Ishii, H. Platelets, coagulation, and fibrinolysis in atherosclerosis formation / H. Ishii, M. Yoshida // *Nippon Rinsho*. – 2011. – №69(1). – P. 50–54.

427. Ishikawa, M. Discovery of novel 2-(pyridine-2-yl)-1H-benzimidazole derivatives as potent glucokinase activators / M. Ishikawa [et al.] // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2009. – №19. – P. 4450–4454.

428. Islam, M.S. Nongenetic model of type 2 diabetes: a comparative study / M.S. Islam, H. Choi // *Pharmacology*. – 2007. – Vol. 79, №4. – P. 243–249.

429. IUPAC (1999) Glossary of terms used in combinatorial chemistry // *Pure appl. Chem.* 71: 2349–2365.

430. Jabbour, S.A. The Importance of Reducing Hyperglycemia While Preserving Insulin Secretion-The Rationale for Sodium-coupled Glucose Co-transporter 2 Inhibition in Diabete / S.A. Jabbour // *US Endocrinology*. – 2009. – Vol. 5. – P. 75–78.

431. Jagtap, P.G. Discovery of Potent Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Inhibitors from the Modification of Indeno[1,2-c]isoquinolinone / P.G Jagtap, E. Baloglu, G.J. Southan [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2005. – Vol. 48. – P. 5100–5103.

432. Jennings, L.K. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis / L.K. Jennings // *Thromb Haemost.* – 2009. – №102(2). – P. 248–57.

433. Jialal, I. The effect of a-tocopherol on monocyte proatherogenic activity / I. Jialal, S. Devaraj, N. Kaul // *J. Nutr.* – 2001. – Vol. 131, № 2. – P. S389–S394.

434. Jiang, T. The protective role of Nrf2 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy / T. Jiang, Z. Huang, Y. Lin, et al. // *Diabetes*. – 2010. – Vol. 59, № 4. – P. 850–860.

435. Johansen, J.S. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice / J.S. Johansen, A.K. Harris, D.J. Rychly, A. Ergul // *Cardiovasc. Diabetol.* – 2005. – Vol. 4, № 1. – P. 5.



436. Johnson, T.O. Protein tyrosine phosphatase 1b inhibitors for diabetes / T.O. Johnson, J. Ermolieff, M.R. Jirousek // Drug discovery. – 2002. – Vol. 1. – P. 696–709.

437. Kakemi, M. Pharmacologic effects of metformin in relation to its disposition in alloxan diabetic rats / M. Kakemi, H. Sasaki, K. Saeki, et al. // J. Pharm. Dyn. – 1983. – Vol. 6, № 2. – P. 71–87.

438. Kaneto, H. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis / H. Kaneto, N. Katakami, M. Matsuhisa, T. A. Matsuoka // Mediators Inflamm. – 2010. – Vol. 6, №2. – P. 141–166.

439. Karunakaran, U. A systematic review of oxidative stress and safety of antioxidants in diabetes: focus on islets and their defense / U. Karunakaran, K.G. Park // Diabetes Metab. J. – 2013. – Vol. 37, № 2. – P. 106–112.

440. Kawabata, T. Alpha-lipoate can protect against glycation of serum albumin, but not low density lipoprotein / T. Kawabata, L. Packer // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1994. – Vol. 203, № 1. – P. 99–104.

441. Kawahito, S. Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress / S. Kawahito, H. Kitahata, S. Oshita // World J. Gastroenterol. – 2009. – Vol. 15, № 33. – P. 4137–4142.

442. Kerns, E.H. Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization / E.H. Kerns, L. Di // Burlington (USA): Academic Press (Elsevier Inc.), 2008. – 552 P.

443. Kiliskiran, A.B. Thrombocytopenia associated with antithrombotic therapy in patients with cardiovascular diseases: diagnosis and treatment / A.B. Kiliskiran, A. Oto, O. Ozcebe // Am J. Cardiovasc. Drugs. – 2008. – №5. – P. 327–339.

444. Kim, D. Exenatide reduzierte HbA1c und gewicht uber 82 wochen bei patienten mit typ-2 diabetes / D. Kim, M.E. Troufman // Diabetes Stoffwechsel. – 2007. – №14(2). – P.161.

445. Kim, R.M. Discovery of potent, orally active benzimidazole glucagon receptor antagonists / R.M. Kim, J. Chang, A.R. Lins [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2008. – Vol. 18(13). – P. 3701–3705.

446. Kimmel, B. Oral agents for type 2 diabetes: an update / B. Kimmel, E. M. Inzucchi // Clin. Diabetes. – 2005. – Vol. 23. – № 2. – P. 64–76.

447. King L.S., Ostrum G. K. Selective Bromination with Copper (II) Bromide // J. Org. Chem. – 1964. – V. 29. – P. 3459–3461.

448. Kinoshita, H. Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists restore impaired vasorelaxation via ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by high glucose / H. Kinoshita, T. Azma, H. Iranami, et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2006. – Vol. 318. – № 1. – P. 312–318.

449. Kirpichnicov, D. Metformin / D. Kirpichnicov, S.I. McFarlane, J.R. Sowers // Ann. Intern. Med. – 2002. – Vol. 137. – № 1. – P. 25–33.

450. Krentz, A.J. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus / A. J. Krentz, C. J. Bailey // Drugs. – 2005. – Vol. 65. – № 3. – P. 385–411.

451. Kumar G.L., et al. (2009) Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods. 5th Edition. Dako North America, Carpinteria, California.

452. Kumar Vats, R. Emerging targets for diabetes / R. Kumar Vats, V. Kumar, A. Kothari [et al.] // Current science. – 2005. – Vol. 88, №2. – P. 241–249.

453. Kurz, K.D. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride / K.D. Kurz, B.W. Main, G.E. Sandusky // Thromb.Res. – 1990. – № 15. – P. 269–280.

454. Laborit A. Регуляция обменных процессов / A. Laborit. – М.: Медицина, 1970. – 384 с.

455. Lamson, D.W. Mitochondrial factors in the pathogenesis of diabetes: a hypothesis for treatment / D.W. Lamson, S.M. Plaza // Altern. Med. Rev. – 2002. – Vol. 7, № 2. – P. 94–111.

456. Larsen, S.D. Synthesis and biological activity of analogues of the antidiabetic/antiobesity agent 3-guanidinopropionic acid: Discovery of a novel aminoguanidinoacetic acid antidiabetic agent / S.D. Larsen, M.A. Connell, M.M. Cudahy [et al.] // J. Med. Chem. – 2001. – Vol. 44. – № 8. – P. 1217–1230.

457. Lee J. Phenformin suppresses calcium responses to glutamate and protects hippocampal neurons against excitotoxicity / J. Lee, S.L. Chan, M.A. Lane. // *Exp.Neurol.* – 2002. – V.175. – P.161–167.

458. Lenzen, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes / S. Lenzen // *Diabetologia.* – 2008. – Vol. 51. – P. 216–226.

459. Levien, T.L. New Drugs in Development for the Treatment of Diabetes / T.L. Levien, D.E. Baker // *Diabetes Spectrum.* – 2009. – Vol. 22. – P. 92–106.

460. Lewell, X.Q RECAP – retrosynthetic combinatorial analysis procedure: a powerful new technique for identifying privileged molecular fragments with useful applications in combinatorial chemistry // *J Chem Inf Comput Sci.* – 1998. – № 38(3). – P. 511–522.

461. Lin, C.C. Recent progress in pharmacokinetic applications of capillary electrophoresis / C.C. Lin, Y.T. Li, S.H. Chen // *Electrophoresis.* – 2003. – Vol. 24, № 22–23. – P. 4106–4115.

462. Lipinski, C.A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings // C.A. Lipinski, Franco Lombardo, Beryl W. Domini, et. al. // *Drug Delivery Rev.* – 1997. – Vol. 23, № 3. – P. 25.

463. Lipinski, C.A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney // *Adv. Drug Delivery Rev.* – 1997. – Vol. 23. – № 1–3. – P. 3–25.

464. Lipinski, C.A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings // C.A. Lipinski, Franco Lombardo, Beryl W. Domini, et al. // *Drug Delivery Rev.* – 2001. – Vol. 40, № 3. – P. 26.

465. Long, Y.C. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation / Y.C. Long, J.R. Zierath // *J. Clin. Invest.* – 2006. – Vol. 116. – P. 1776–1783.

466. Lopes, R. Antiplatelet agents in cardiovascular disease / R. Lopes // *J. Thromb. Thrombolysis.* – 2011. – №3. – P. 306–309.

467. Lu, S.C. Regulation glutathione synthesis / S.C. Lu // *Mol. Aspects Med.* – 2009. – Vol. 30. – № 1–2. – P. 42–59.

468. Lyu, D. Increased bleeding tendency and decreased susceptibility to thromboembolism in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(3) / D. Lyu, J.R. Glenn, A.E. White, et al., A. Hara, C.Y. Xiao, et al. // *Circulation.* – 2001. – №104. – P. 1176–1180.

469. Lyu, D. The role of prostanoid receptors in mediating the effects of PGE(20 on human platelet function / D. Lyu, J.R. Glenn, A.E. White, et al. // *Platelets.* – 2010. – №5. – P. 329–342.

470. Ma, T.K. Impact of genetic and acquired alteration in cytochrome P450 system on Pharmacologic and clinical response to clopidogrel / T.K. Ma, Y.Y. Lam, V.P. Tan et al. // *Pharmacol. Ther.* – 2010. – №2. – P. 249–259.

471. MacIntyre, D.E. Localisation and stimulation of prostacyclin production in vascular cells / D.E. MacIntyre, J.D. Pearson, J.L. Gordon // *Nature.* – 1978. – Vol. 271. – P. 549–551.

472. Mahadev, K. Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes / K. Mahadev, X. Wu, A. Zilbering, et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – № 52. – P. 48662–48669.

473. Mangoni, A.A. Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications / A.A. Mangoni, S.H. Jackson // *J Clin Pharmacol.* – 2004. – Vol. 57, №1. – P. 6–14.

474. Manna, R. Nicotinamide treatment in subjects at high risk of developing IDDM improves insulin secretion / R. Manna, A. Migliore, L.S. Martin [et al.] // *Br. J. Clin. Pract.* – 1992. – Vol. 46. – P. 177–179.

475. Manrique, C. Aspirin and diabetes Melitus: revisiting an old player / C. Manrique, G. Lastra, J. Palmer, et al. // *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* – 2008. – №1. – P. 37–42.

476. Marre, M. Improved glycemic control with metformin-glibenclamide combined tablet therapy (Glucovance) in type 2 diabetic patients inadequately controlled on metformin / M. Marre.,

H. Howlett, P. Lehert, T Allavoine // *Diabet. Med.* – 2002. – Vol. 19, №8. – P. 673–680.

477. Martin, W.H. Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo / W.H. Martin, D.J. Hoover, S.J. Armento [et al.] // *PNAS.* – 1998. – Vol. 95, №4. – P. 1776–1781.

478. Maruyama, Y. Free vertical abdominal fasciocutaneous flap / Y. Maruyama, H. Osafune // *Br. J. Plast. Surg.* – 1987. – Vol. 40, № 1. – P. 27–30.

479. Masiello, P. Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamid / Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M., Manteghetti M., Hillaire-Buys D., Novelli M., Ribes G. // *Diabetes.* – 1998. – Vol. 47. – P. 224–229.

480. Masiello, P. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide / P. Masiello, C. Broca, R. Gross, et al. // *Diabetes.* – 1998. – V. 47. – P. 244–229.

481. Mason, J. S. New 4- point pharmacophore method for molecular similarity and diversity applications: overview of the method and applications, including a novel approach to the design of combinatorial libraries containing privileged substructures // *J. Med. Chem.* – 1999, Aug 26. – №42(17). – P. 3251–64.

482. Masoro, E.J. Caloric restriction and ageing: an update / E.J. Masoro // *Exp. Gerontol.* – 2000. – Vol. 35. – P. 299–305.

483. Matschinsky, F.M. Assessing the potential of glucokinase activators in diabetes therapy / F.M. Matschinsky // *Nature Reviews Drug Discovery.* – 2009. – Vol. 8. – P. 399–416.

484. Matschinsky, F.M., Porte D. Glucokinase activators (GKAs) promise a new pharmacotherapy for diabetics F1000 / F.M. Matschinsky // *Medicine Reports.* – 2010. – Vol. 43, №2. – P. 1776–1783.

485. Matthaei, S. Association of metformin's effect to increase insulin-stimulated glucose transport with potentiation of insulin-induced translocation of glucose transporters from intracellular pool to plasma mem-

brane in rat adipocytes / S. Matthaei, A. Hamann, H. H. Klein, et al. // *Diabetes*. – 1999. – Vol. 40, №7. – P. 850–857.

486. Mattison, J.A. Calorie restriction in rhesus monkeys / J.A. Mattison, M.A. Lane, G.S. Roth // *Exp. Gerontol.* – 2003. – V. 38. – P. 35–46.

487. Mattson, M.P. Progress in the development of caloric restriction mimetic dietary supplements / M.P. Mattson, W. Duan, J. Lee et al. // *J. Anti-Aging Med.* – 2001. – Vol. 4. – P. 225–232.

488. McCarty, M.F. Longevity effect of chromium picolinate – 'rejuvenation' of hypothalamic function? M.F. McCarty // *Medical Hypotheses*. – 1994. – Vol. 3. – P. 253–265.

489. Meijer, L. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3 / L. Meijer, M. Flajolet, P. Greengard // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2004. – Vol. 25, №9. – P. 471–480.

490. Merz, K.M. *Drug Design: Structure- and Ligand-Based Approaches* / Ed. K.M. Merz, D. Ringe, C.H. Reynolds. – N.-Y.: Cambridge University Press, 2010. – 274 P.

491. Minoura, H. Pharmacological characteristics of a novel nonthiazolidinedione insulin sensitizer, FK614. / H. Minoura [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 494, № 2, 3. – P. 273–281.

492. Mishra, A. Synthesis and antimicrobial activity of some newer benzimidazole derivatives-anoverview / A. Mishra, V. Gautam, A. Gupta [et al.] // *J. Phar. Res.* – 2010. – Vol. 3, №2. – P. 371–378.

493. Montesano, R. (Ed.) *Long-term and Short-term Assays for Carcinogens: a Critical Appraisal* / R. Montesano, H. Bartsch, H. Vainio, et al. – IARC Sci. Publ. № 83. – Lyon: IARC, 1986. – 664 p.

494. Morel O. Diabetes and the platelet: toward new therapeutic paradigms for diabetic atherothrombosis / O.Morel, L. Kessler, P.Ohimann // *Atherosclerosis*. – 2010. – №2. – P. 367–376.

495. Morel, O. Diabetes and the platelet: toward new therapeutic paradigms for diabetic atherothrombosis / O. Morel, L. Kessler, P. Ohimann // *Atherosclerosis*. – 2010. – №2. – P. 367–376.

496. Moscardó, A. Residual cyclooxygenase-1 activity and epinephrine reduce the antiplatelet effect of aspirin in patients with acute myocar-

dial infarction / A. Moscardó , M.T. Santos , M.P. Fuset , M. Ruano, J. Vallés // *Thromb.Haemost.* – 2011. – №105(4). – P. 663–669.

497. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – Vol. 65, №1. – P. 55–63.

498. Muellenbach, E.A. Interactions of the advanced glycation end product inhibitor pyridoxamine and the antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid on insulin resistance in the obese Zucker rat / E.A. Muellenbach, C.J. Diehl, M.K. Teachey, et al. // *Metabolism.* – 2008. – Vol. 57, №10. – P. 1465–1472.

499. Muller, S. Action of metformin on erythrocyte membrane fluidity in vitro and vivo / S. Muller, S. Denet, H. Candiloros, et al. // *Europ. J. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 337, № 1. – P. 103–110.

500. Najeed, S.A. Differential effect of glyburide (glibenclamide) and metformin on QT dispersion: a potential adenosine triphosphate sensitive K<sup>+</sup> channel effect / S.A. Najeed, I.A. Khan, J. Molnar, J.C. Somberg // *Am J Cardiol.* – 2002. – №10. – P.1103–6.

501. Nathan, D.M. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and European Association for the Study of Diabetes / D.M. Nathan, J.B. Buse, M.B. Davidson, et al. // *Diabetes Care.* – 2009. – № 1. – P. 193–203.

502. Nebert, D.W. Clinical importance of the cytochromes P450 / D.W. Nebert, D.W. Russell // *The Lancet.* – 2002. – Vol. 360, № 12. – P. 1155–1162.

503. Newell K.J., Sawka B.W., Rudrick B.F., Dirman D.K. GEWF solution: an inexpensive, simple, and effective aid for the retrieval of lymph nodes from colorectal cancer resections // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2001. – №125. – P. 642–645.

504. Noda, Y. Gliclazide scavenges hydroxyl and superoxide radicals: an electron spin resonance study / Y. Noda, A. Mori, E. Cossins, L. Packer // *Metabolism.* – 2000. – Vol. 49, № 2. – Suppl 1. – P. 14–16.

505. Norton, L. Sodium-Glucose Co-transporter 2 Inhibition – A Novel Strategy for Glucose Control in Type 2 Diabetes / L. Norton,

R.A. De Fronzo, M.A. Abdul-Ghani // *US Endocrinology*. – 2010. – Vol. 6. – P. 42–47.

506. O'Moore-Sullivan, T.M. Thiazolidinediones and type 2 diabetes: new drugs for an old disease / T.M. O'Moore-Sullivan, J.B. Prins // *MJA*. – 2002. – Vol. 116. – P. 381–386.

507. Omiecinski, C.J. Concise Review of the Cytochrome P450s and their Roles in Toxicology / C.J. Omiecinski, R.P. Remmel, V.P. Hosagrahara // *Toxicological sciences*. – 1999. – Vol. 48. – P. 151–156.

508. Oprea, T.I. Property distribution of drug-related chemical databases / T.I. Oprea // *J. Comput-Aided. Mol. Des.* – 2000. – V. 14, №3. – P. 251–264.

509. Overton, H.A. GPR119, a novel G protein-coupled receptor target for the treatment of type 2 diabetes and obesity / H.A. Overton, C.T. Fyfe M., C. Reynet // *British Journal of Pharmacology*. – 2008. – Vol. 153. – P. S76–S81.

510. Owen, M.R. The mechanisms by which mild respiratory chain inhibitors inhibit hepatic neoglucogenesis / M.R. Owen, A.P. Halestrap // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1993. – Vol. 1142. – P. 11–22.

511. Owen, O.E. Mebendazole and insulin secretion from isolated rat islets / O.E. Owen, R.H. Smith, S. Caprio [et al.] // *Metabolism: clinical and experimental*. – 1985. – Vol. 34(6). – P. 567–570.

512. Pacher, P. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. emerging new therapeutical strategies / P. Pacher, I. G. Obrosova, J. G. Mabley, C. Szabó // *Curr. Med. Chem.* – 2005. – Vol. 12, № 3. – P. 267–275.

513. Padayatty, S.J. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention / S.J. Padayatty, A. Katz, Y. Wang, et al. // *J. Am. Coll. Nutr.* – 2003. – Vol. 22, № 1. – P. 18–35.

514. Padwal, R. A systematic review of drug therapy to delay or prevent type 2 diabetes / R. Padwal, S. R. Majumdar, J. A. Johnson, et al. // *Diabetes Care*. – 2005. – Vol. 28, № 3. – P. 736–744.

515. Paolisso, G. Glucose tolerance and insulin action in healthy centenarians / G. Paolisso, A. Gambardella, S. Ammendola et al. // *Am. J. Physiol.* – 1996. – Vol. 270. – P. E890–E896.



516. Patane, G. Exposure to glibenclamide increases rat beta cells sensitivity to glucose / G. Patane, S. Piro, M. Anello, et al. // *Br. J. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 129. – №5. – P. 887–892.

517. Patane, G. Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose: a direct metformin effect on pancreatic beta-cells / G. Patane, S. Piro, A.M. Rabuazzo, M. Anello, et al. // *Diabetes.* – 2001. – Vol. 49. – №5. – P. 735–740.

518. Perloff, M.D. Midazolam and triazolam biotransformation in mouse and human liver microsomes: Relative Contribution of CYP3A and CYP2C / M.D. Perloff, L.L. von Moltke, M.H. Couret, et al. // *Pharmacology.* – 2000. – Vol. 292, № 2. – P. 618–628.

519. Pia, J. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function / J. Pia, Q. Zhang, J. Fu, et al. // *Toxicology and Applied Pharmacology.* – 2010. – Vol. 244. – №1. – P. 77–83.

520. Pickavance, L.C. Therapeutic index for rosiglitazone in dietary obese rats: separation of efficacy and haemodilution / L.C. Pickavance, M. Tadayyon, P. S. Widdowson, et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 128. – №7. – P. 1570–1576.

521. Pinon, J.F. In vivo study platelet aggregation in rats / J.F. Pinon // *J. Pharmacol. Meth.* – 1984. – Vol. 12. – P. 79–84.

522. Pitocco, D. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications / D. Pitocco, M. Tesauro, R. Alessandro, G. Ghirlanda, C. Cardillo // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14, №11. – P. 21525–21550.

523. Pittenger, G.L. The role of islet neogenesis-associated protein (INGAP) in pancreatic islet neogenesis / G.L. Pittenger, D. Taylor-Fishwick, A.I. Vinik // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2009. – Vol. 10, №1. – P. 37–45.

524. Pittenger, G.L. The role of islet neogenesis-associated protein (INGAP) in pancreatic islet neogenesis / G.L. Pittenger, D. Taylor-Fishwick, A.I. Vinik // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2009. – Vol. 10, №1. – P. 37–45.

525. Polanski, J. Privileged structures – Dream or Reality: Preferential organization of azanaphthalene scaffold / J. Polanski, A. Kurezyk, A. Bak, et. al. // Current medical chemistry. – 2012. – № 19. – P. 1921–1945.

526. Polanski, J. Privileged structures – Dream or Reality: Preferential organization of azanaphthalene scaffold / J. Polanski, A. Kurezyk, A. Bak, et. al. // Current medical chemistry. – 2012. – №19. – P. 1921–1945

527. Polanski, J. Privileged structures – Dream or Reality: Preferential organization of azanaphthalene scaffold / J. Polanski, A. Kurezyk, A. Bak, et. al. // Current medical chemistry. – 2012. – № 19. – P. 1921–1945.

528. Pongnimitprasert, N. Atherosclerosis and NADPH Oxidase / N. Pongnimitprasert // Silpakorn University Science and Technology Journal. – 2009. – Vol. 3, № 1. – P. 13–24.

529. Pozharisski, K.M. Experimental intestinal cancer research with special reference to human pathology / K.M. Pozharisski, A.J. Likhachev, V.F. Klimashevski, et al. // Adv.Cancer Res. – 1979. – Vol. 30. – P. 165–237.

530. Pozharisski, K.V. Tumours of the intestines, in: / K.V. Pozharisski, V.S. Turusov, U.Mohr (eds.) – Tumours of the Rat, 2nd Edition, Pathology of Tumours in Laboratory Animals. – Vol. 1 IARC, Lyon, 1990. – № 99. – P.159–197.

531. Pozzilli, P. Vitamin E and nicotinamide have similar effects in maintaining residual beta cell function in recent onset insulin-dependent diabetes (the IMDIAB IV study) / P. Pozzilli, N. Visalli, M.G. Cavallo // European Journal of Endocrinology. – 1997. – Vol. 137. – P. 234–239.

532. Puzyn, T. Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications / Ed. T. Puzyn, J. Leszczynski, M.T.D. Cronin // Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics, Vol. 8. – Dordrecht (Netherlands): Springer Science + Business Media B.V., 2010. –414 p.

533. QikProp: Rapid ADME predictions of drug candidates: Официальный сайт компании Schrödinger, LLC, 2015. – URL:<http://www.schrodinger.com/QikProp>.

534. North, R.J., Day A.R. A study of some 1-alkyl-2,3-dihydroimidazo[1,2- $\alpha$ ] benzimidazoles // *J. Heterocycl. Chem.* – 1969. – V. 6, №5. – P. 655–662.

535. Rahba, S. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation / S. Rahba, R. Natarajan, K. Yerneni, et al. // *Clin. Chim. Acta.* – 2000. – Vol. 301, № 1–2. – P. 65–77.

536. Rahbar, S. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts / S. Rahbar, J.L. Figarola // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* – 2003. – Vol. 419. – P. 63–79.

537. Ramasamy, R. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation / R. Ramasamy, S. J. Vannucci, S. S. Yan, et al. // *Glycobiology.* – 2005. – Vol. 15, №7. – P. 16R–28R.

538. Ranganath, L.R. The entero-insular axis: implications for human metabolism / L.R. Ranganath // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2008. – Vol. 46(1). – P. 43–56.

539. Re, R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re, N. Pellegrin, A. Proteggente // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – V. 26, №9–10. – P. 1231–1237.

540. Regnier, M. Studies on guinea pig skin cell cultures. 3. Minimum cell numbers for establishment / M. Regnier, M. Prunieras // *Acta. Derm. Venerol. (Stockh.)*. – 1974. – Vol. 84. – P. 339–342.

541. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy: The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 342. – № 6. – P. 381–389.

542. Rizzo, M. R. Evidence for anti-inflammatory effects of combined administration of vitamin E and C in older persons with impaired fasting glucose: impact on insulin action / M.R. Rizzo, A.M. Abbatecola, M. Barbieri, et al. // *J. Am. Coll. Nutr.* – 2008. – Vol. 27, №4. – P. 505–511.

543. Robertson R.P., Harmon J., Tran POT, Poitout V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity and chronic oxidative stress in type 2 diabetes // *Diabetes*. – 2004. – №53 (suppl 1). – P. 119–124.

544. Robertson, R.P. Pancreatic islet  $\beta$ -cell and oxidative stress: the importance of glutathione peroxidase / R.P. Robertson, J.S. Harmon // *FEBS Lett.* – 2007 – Vol. 581, № 19. – P. 3743–3748.

545. Robertson, R.P.  $\beta$ -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes / R.P. Robertson, J. Harmon, P.O. Tran, V. Poitout // *Diabetes*. – 2004. – Vol. 53. – Suppl. 1. – P. S119–S124.

546. Robertson, R.P. Pancreatic islet  $\beta$ -cell and oxidative stress: the importance of glutathione peroxidase / R.P. Robertson, J.S. Harmon // *FEBS Lett.* – 2007. – Vol. 581(19). – P. 3743–3748.

547. Ross, A.S., Incretin agents in type 2 diabetes / A.S. Ross // *Can. Fam. Physician*. – 2010. – Vol. 56. – P. 639–648.

548. Ruhe, R.C. Use of antioxidant nutrients in the prevention and treatment of type 2 diabetes / R.C. Ruhe, R.B. McDonald // *J. Am. Coll. Nutr.* – 2001. – Vol. 20. – Suppl. 5. – P. S363–S369.

549. Ryu, S.K. Augmented sphingosylphosphorylcholine-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitization of mesenteric artery contraction in spontaneously hypertensive rat / D.S. Ahn, Y.E. Cho, S.K. Choi, Y.H. Kim, K.G. Morgan, Y.H. Lee // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* – 2006. – № 373. – P. 30–36.

550. Sakurai, H. A New Concept: The Use of Vanadium Complexes in the Treatment of Diabetes Mellitus / H.A Sakurai // *The Chemical Record*. – 2002. – Vol. 2. – P. 237–248.

551. Salvadori, S. Role of benzimidazole (Bid) in the delta agonist preuropeptide H-Dmt-tic-NH-CH<sub>2</sub>-bid (UFP-502) / S. Salvadori, S. Fiorini, C. Trapella, [et al.] // *Bioorg Med Chem.* – 2008. – Vol. 16. – P. 3032–3038.

552. Sandler, S. Stimulation of cell replication in transplanted pancreatic islets by nicotinamide treatment / S. Sandler, A. Andersson // *Transplantation*. – 1988. – Vol. 46. – P. 30–31.

553. Sase, K. Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase / K. Sase, T. Michel // Trends Cardiovasc. Med. – 1997. – Vol. 7, № 1. – P. 28–37.

554. Scarpello, J.H. Improving survival with metformin: the evidence base today J.H. Scarpello // Diabetes Metab. – 2003. – Vol. 29. – P. 36–43.

555. Schaeffer, J. Platelet free calcium concentrations measured with fura- are influenced by the transmembrane sodium gradient / J. Schaeffer, M.P. Blaustein // Cell Calcium. – 1989. – №10. – P. 101–113.

556. Schaeffer, P. Effect of SR58611A, a potent beta-3 adrenoceptor agonist, on cutaneous wound healing in diabetic and obese mice / P. Schaeffer, A. Bernat, M. Arnone [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2006. – Vol. 529(1–3). – P. 172–178.

557. Shaikh, I. Synthesis and In-vivo Evaluation of Carbonyl-amide Linkage Based New Benzimidazole Derivatives / I. Shaikh, K. Hosamani, H. Seethamareddy [et al.] // Arch pharm. Chem. Life sciences. – 2012. – Vol. 345. – P. 65–72.

558. Sharma, R. Novel Dual-acting peroxisome proliferator-activated receptor Alpha and Gamma Agonists / R. Sharma // Journal of Clinical and Diagnostic Research. – 2008. – Vol. (2). – P. 659–667.

559. Shingalapur, R.V. Derivatives of benzimidazole pharmacophore: Synthesis, anticonvulsant, antidiabetic and DNA cleavage studies / R.V. Shingalapur, [et al.] // Eur. J. Med. Chem. – 2010. – Vol. 45. – P. 1753–1759.

560. Sieradzki, J. Application of gliclazide MR in uncontrolled diabetes type 2 – the treatment phase results of DINAMIC 2 study (V) / J. Sieradzki, T. Kasperska-Czyzyk, W. Grzeszczak, Z. Badaczy // Diabetologia Praktyczna. – 2003. – Vol. 4, № 2. – P. 133–136.

561. Sikora, A. Gliclazide – oral hypoglycaemic drug with pleiotropic mechanism of action / A. Sikora, J. Btasiak, J. Drzewosk // Diabetologia Doswiadczalna i Kliniczna rok. – 2006. – Vol. 6, № 1. – P. 1–5.

562. Siluk D. Antiaggregatory activity of hypoglycaemic sulphonylureas / D. Siluk, R. Kralisz, P. Haber, et al. // Diabetologia. – 2002. – №7. – P. 1034–1037.

563. Singh, U. Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes / U. Singh, I. Jialal // *Nutr. Rev.* – 2008. – Vol. 66, № 11. – P. 646–657.

564. Smith, J.B. Malondialdehyde formation as an indicator of prostaglandin production by human platelet / J.B. Smith, C.M. Ingerman, M.J. Silver // *J. Lab. Clin. Med.* – 1976. – Vol. 88, №1. – P. 167–176.

565. Snel M. Ectopic Fat and Insulin Resistance; Pathophysiology and Effect of Diet and Lifestyle Interventions / Snel M. Jonrer J.T., Schoones J., Lamb H., et al. // *Int. J. of Endocrin.* – 2012. – № 2012. – P. 1–18.

566. Somsák, L. Glucose Analog Inhibitors of Glycogen Phosphorylases as Potential Antidiabetic Agents: Recent Developments / L. Somsák, V. Nagya, Z. Hadady, et al. // *Curr. Pharm.* – 2003. – Vol. 9(15). – P. 1177–1189.

567. Spada, A. Metformin role in the treatment of type 2 diabetes in 2008 / A. Spada, J. Philippe // *Rev. Med. Suisse.* – 2008. – Vol. 4. – №160. – P. 1392–1394, 1396–1397.

568. Sparks, R. Benzothiazole benzimidazole (S)-isothiazolidinone derivatives as protein tyrosine phosphatase-1B inhibitors / R. Sparks, P. Polam, W. Zhu [et al.] // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2007. – Vol. 17(3). – P. 736–740.

569. Spasov, A.A. Potential of pharmacological modulation of level and activity of incretins in diabetes mellitus type 2 / A.A. Spasov, N.I. Chepljaeva // *Biochemistry, Moscow, Supplement Series B: Biom. Chem.* – 2014. – №8(4). – P. 293–301.

570. Srinivasan, K. Animal models in type 2 diabetes research: an overview Department of Pharmacology & Toxicology, National Institute of Pharmaceutical Education & Research (NIPER) Mohali India / K. Srinivasan, P. Ramarao // *Indian J Med Res.* – 2007. – P. 451–472.

571. Srivatsan, R. Antioxidants and lipid peroxidation status in diabetic patients with and without complications / R. Srivatsan, S. Das, R. Gadde, et al. // *Arch. Iran. Med.* – 2009. – Vol. 12. – № 2. – P. 121–127.

572. Steinberg G.R. AMPK in Health and Disease. / Steinberg G.R., Kemp B.E. // *Physiol Rev.* – 2009. – №89. – P. 1025–1078.

573. Stolar, M.W. Managing Type 2 Diabetes: Going Beyond Glycemic Control / M.W. Stolar, B.J. Hoogwerf, S.M. Gorshow [et al.] // *J. Manag. Care Pharm.* – 2008. – Vol. 14(5). – P. S2–S19.

574. Stranges, S. Effects of long-term selenium supplementation on the incidence of type 2 diabetes: a randomized trial / S. Stranges, J.R. Marshall, R. Natarajan // *Ann. Intern. Med.* – 2007. – Vol. 147, №4. – P. 217–223.

575. Surh, Y.-J. Oxidative stress, inflammation and health / Y.-J. Surh, L. Parcer, editors. – California, CA: Taylor & Francis, 2005. – 660 p.

576. Suzuki, M. Effects of combined pioglitazone and metformin on diabetes and obesity in Wistar fatty rats / M. Suzuki, H. Odaka, N. Suzuki, et al. // *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* – 2002. – Vol. 29, №4. – P. 269–274.

577. Svans J.L. Depha-Lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes / J.L. Evans, I.D Goldfine // *Diabetes Technol. Ther.* – 2000. – Vol. 2, №3. – P. 401–412.

578. Szabo, C. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors Ameliorate Nephropathy of Type 2 Diabetic Leprdb/db Mice / C. Szabo, A. Biser, R. Benko [et al.] // *Diabetes.* – 2006. – Vol. 55(11). – P. 3004–3012.

579. Szeto, H.H. Cell-permeable, mitochondrial-targeted, peptide antioxidants / H.H. Szeto // *The AAPS Journal.* – 2006. – Vol. 8, №2. – P. E277–E283.

580. Takahashi, K. The design and optimization of a series of 2-(pyridin-2-yl)-1H-benzimidazole compounds as allosteric glucokinase activators / K. Takahashi, N. Hashimoto, C. Nakama [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 17(19). – P. 7042–7051.

581. Takasaki, K. Effects of combination treatment with dipeptidylpeptidase IV inhibitor and sulfonylurea on glucose levels in rats / K. Takasaki, T. Nakajima, K. Ueno, et al. // *J. Pharmacol. Sci.* – 2004. – Vol. 95. – № 2. – P. 291–293.

582. Tanaka, T. Z-335, a new thromboxane A<sub>2</sub> receptor antagonist, prevents arterial thrombosis induced by ferric chloride in rats / T. Tanaka, R. Sato, T. Kurimoto // *Eur. J. Pharmacol.* – 2000. – №401. – P. 413–418.

583. Thakare, P.B. Synthesis and antiulcer, antisecretory activity of some new substituted 2-(pyrimidinylsulfinyl) benzimidazole derivatives / P.B. Thakare, A.J. Ansari // IJRPBS. – 2011. – Vol. 2, №2. – P. 695–700.

584. Thomas, L. (R)-8-(3-amino-piperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydro-purine-2,6-dione (bi 1356), a novel xanthine-based dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, has a superior potency and longer duration of action compared with other dipeptidyl peptidase-4 inhibitors / L. Thomas, m. Echard, e. Langkopf, et al. // J. Pharmacol. Exper. Ther. – 2008. – №325(1). – P.175–182.

585. Thomas, M.C. Advanced glycation end products and diabetic nephropathy / M.C. Thomas, J.M. Forbes, M.E. Cooper // Am. J. Ther. – 2005. – Vol. 12, №6. – P. 562–572.

586. Thompson, K.H. Vanadium treatment of type 2 diabetes: A view to the future / K.H. Thompson, J. Lichter, C. Le Be // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2009. – Vol. 103. – P. 554–558.

587. Tiwari, A.K. Antioxidants: new-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders / A.K. Tiwari // Curr. Sci. – 2004. – Vol. 86, № 8. – P. 1092–1100.

588. Trivedy, N.A. Effect of shilajit on blood glucose and lipid profile in alloxan-induced diabetic rats / N.A. Trivedi, B. Mazumdar, J.D. Bhatt, K.G. Hemavathi // Indian J. Pharmacol. – 2004. – Vol. 36, №6. – P. 373–376

589. Turk, Z. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications / Z. Turk // Physiol. Res. – 2010. – Vol. 59, №2. – P. 147–56.

590. Turusov, V. Tumours of the Mouse / V. Turusov, Mohr U. (eds.) – 2nd Edition, Pathology of Tumours in Laboratory Animals, Vol. 2. – IARC Sci. Publ., № 111. – Lyon: IARC, 1994. – 776 p.

591. Turusov, V. Tumours of the Rat / V. Turusov, MohrU. (eds.) – 2nd ed., Pathology of Tumours in Laboratory Animals, Vol. 1. – IARC Sci.Publ., № 99. – Lyon: IARC, 1990. – 739 p.

592. Ueno, M. Role of Platelets and Antiplatelet Therapy in Cardiovascular Disease / M. Ueno, M. Kodali , A. Tello-Montoliu, et al. // J. Atheroscler Thromb. – Vol. 18, №6. – P. 431–442.



593. Ukkola, O. Protein tyrosine phosphatase 1B: a new target for the treatment of obesity and associated co-morbidities / O. Ukkola, M. Santaniemi // *Journal of Internal Medicine*. – 2002. – Vol. 251. – P. 467–475.

594. Van de Laar, F.A. Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus/ F.A. van der Laar, P.L. Lucassen, R.P. Akkermans, et al. // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2005. – №2. – CD00363.

595. Van de Laar, F.A. Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes / F.A. van de Laar // *Vasc. Health. Risk. Manag.* – 2008. – Vol. 4, № 6. – P. 1189–1195.

596. Van de Peer, Y. Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites / Y. Van de Peer, De Wachter R. // *Comput Appl Biosci.* –1997. – №13. – P. 227–230.

597. Van Der Vies, J. Two methods for the determination of glycogen in liver / J. van Der Vies // *Biochem. J.* – 1954. – Vol. 57, №3. – P. 410–413.

598. Van Gaal, L. Miglitol combined with metformin improves glycaemic control in type 2 diabetes / L. van Gaal, M. Maislos, G. Scherhaner, et al. // *Diabetes Obes. Metab.* – 2001. – Vol. 3, №5. – P. 326–331.

599. Vassiliev, P.M. Consensus Drug Design Using IT Microcosm / P.M. Vassiliev, A.A. Spasov, V.A. Kosolapov, [et al.] // *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.

600. Veber, D.F. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates / D.F. Veber, S.R. Johnson, H.Y. Cheng, [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2002. – Vol. 45. – № 12. – P. 2615–2623.

601. Venkatakrisnan, K. Five distinct human cytochromes mediate amitriptyline N-demethylation in vitro: dominance of CYP 2C19 and 3A4 / K. Venkatakrisnan, D.J. Greenblatt, L.L. von Moltke, et al. // *J Clin Pharmacol.* – 1998. – Vol. 38, № 2. – P. 112–121.

602. Vinodkumar, R. Synthesis, anti-bacterial, anti-asthmatic and anti-diabetic activities of novel N-substituted-2-(4-phenylethynyl-phenyl)-1H-benzimidazoles and N-substituted 2[4-(4,4-dimethyl-thiochroman-6-yl-ethynyl)-phenyl]-1Hbenzimidazoles / R. Vinodkumar [et al.] // European journal of Medicinal Chemistry. – 2008. – Vol. 43. – P. 986–995.

603. Virally, M. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives / M. Virally, J.F. Blickle, J. Girard, et al. // Diabetes Metab. – 2007. – Vol. 33, №4. – P. 231–244.

604. Wallace, M.B. Structure-based design and synthesis of benzimidazole derivatives as dipeptidyl peptidase IV inhibitors / M.B. Wallace, J. Feng, Z. Zhang [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2008. – Vol. 18(17). – P. 2362–2367.

605. Wang, Q. Glibenclamide activates translation in rat pancreatic beta cells through calcium-dependent mTOR, PKA and MEK signaling pathways / Q. Wang, H. Heimberg, D. Pipeleers, Z. Ling // Diabetologia. – 2008. – Vol. 51, №7. – P. 1202–1212.

606. Warrington, J.S. Effect of Age on In Vitro Midazolam Biotransformation in Male CD-1 Mouse Liver Microsomes / J.S. Warrington, J.W. Poku, L.L. von Moltke, et al. // Pharmacology. – 2000. – Vol. 292, №3. – P. 1024–1031.

607. Wei, M. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes / M. Wei, L. Ong, M.T. Smith, F.B. Ross, K. Schmid, A.J. Hoey, D. Burstow, L. Brown // Heart, lung and circulation. – 2003. – Vol. 12. – №1. – P. 44–50.

608. Willms-Kretschmer, K. Electron microscopic study of vascular injury / K. Willms-Kretschmer, G. Majno // Am. J. Pathol. – 1969. – Vol. 54. – P. 327–333.

609. Wilson, D.P. Structure-Based Optimization of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitors: From the Active Site to the Second Phosphotyrosine Binding Site / D.P. Wilson, Z.K. Wan, W.X. Xu [et al.] // J. Med. Chem. – 2007. – Vol. 50. – P. 4681–4698.

610. Woodgett, J.R. Physiological Roles of Glycogen Synthase Kinase-3: Potential as a Therapeutic Target for Diabetes and Other Disor-

ders / J.R. Woodgett // Current Drug Targets – Immune, Endocrine & Metabolic Disorders. – 2003. – Vol. 3. – P. 275–284.

611. Wright, C.J. Manipulation of gene expression by oxygen: A primer from bedside to bench / C.J. Wright, P.A. Dennery // *Pediatr.Res.* – 2008. – Vol. 66. – № 1. – P. 3–10.

612. Wu, C. Reduction of Hepatic Glucose Production as a Therapeutic Target in the Treatment of Diabetes / C. Wu, D.A. Okar, J. Kang [et al.] // *Current Drug Targets Immune, Endocrine & Metabolic Disorders.* – 2005. – Vol. 5. – P. 51–59.

613. Wu, C.C. 2-(2-Br-Phenyl)-8-methoxy-benzoxazinone (HPW-RX2), a direct thrombin inhibitor with a suppressive effect on thromboxane formation in platelets / C.C. Wu, T.W. Wang, W.Y. Wang // *Eur. J. of Pharmacol.* – 2005. – Vol. 527. – P. 37–43.

614. Wu, J.H. Effects of  $\alpha$ -tocopherol and mixed tocopherol supplementation on markers of oxidative stress and inflammation in type 2 diabetes / J. H. Wu, N. C. Ward, A. P. Indrawan, et al. // *Clin. Chem.* – 2007. – Vol. 53. – №3. – P. 511–519.

615. Xu, X. Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NFE2L2) is a novel therapeutic target for diabetic complications / X. Xu, P. Luo, Y. Wang, et al. // *J. Int. Med. Res.* – 2013. – Vol. 41, №1. – P. 13–19.

616. Yamada, H. Lymphocyte and plasma vitamin C level type 2 diabetic patients with and without diabetes complications / H. Yamada, K. Yamada, M. Waki, K. Umegaki // *Diabetes Care.* – 2004. – Vol. 27. – № 10. – P. 2491–2492.

617. Yonemura, Y. Amelioration of diabetes mellitus in partially depancreatized rats by poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors: evidence of islet B-cell regeneration / Y. Yonemura, T. Takashima, K. Miwa [et al.] // *Diabetes.* – 1984. – Vol. 33. – P. 401–404.

618. Yoshida, S. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline antiplatelet protein a saliva protein from a malaria vector mosquito / S. Yoshida, T. Sudo, M. Niimi et al. // *Blood.* – 2008. – №4. – P. 2007–2014.

619. Yuhki, K. Prostaglandin I2 and its metabolites / K. Yuhki, F. Kojima, H. Kashiwagi, F. Ushikubi // *Nippon Rinsho*. – 2010. – №7. – P. 29–32.

620. Yuhki, K. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases / K. Yuhki, H. Kashiwagi, F. Kojima // *Int. Angiol.* – 2010. – №29(2). – P. 19–27.

621. Zhang, L. Metformin and phenformin activate AMP-activated protein kinase in the heart by increasing cytosolic AMP concentration / L. Zhang, H. He, J.A. Balschi // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 293, № 1. – P. H457-H466.

622. Zhou, G. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action / G. Zhou, R. Myers, Y. Li, et al. // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 108, №8. – P. 1167–1174.

623. Zhou, S.S. Nicotinamide overload may play a role in the development of type 2 diabetes / S.S. Zhou, D. Li, W.P. Sun // *World J. Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 43(15). – P. 5674–5684.

624. Ziegler, D. Oral treatment with  $\alpha$ -lipoic acid improves symptomatic diabetic polyneuropathy: the SYDNEY 2 trial/ D. Ziegler, A. Ametov, A. Barinov, et al. // *Diabetes Care*. – 2006. – Vol. 29, №11. – P. 2365–2370.

625. Ziegler, D. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid A 7-month multicenter randomized controlled trial (ALADIN III Study) / D. Ziegler, M. Hanefeld, K. J. Ruhnau, et al. // *Diabetes Care*. – 1999. – Vol. 22, №8. – P. 1296–1301.

626. Zitelli, J.A. Burow's grafts / J.A. Zitelli // *J. Amer. Acad. Dermatol.* – 1987. – Vol. 17, (2p1). – P. 271–279.

## CONCLUSION

---

The history of drug discovery for diabetes mellitus has been shaped and is still determined by the developments in the field of fundamental medicine. Starting from identification of the role of pancreas and Langerhans islets in the disease pathogenesis, to isolation and structure determination of insulin, insulin receptor, glucose transporters, and establishment of the role of hepatic glycogenolysis and enzymes that participate in gluconeogenesis, the molecular mechanisms of the insulin resistance, the role of incretin system, kidney  $\text{Na}^+$ /glucose transporters, and intestinal  $\alpha$ -glucosidase.

Insulin resistance on a cellular level primarily depends on insulin signaling uncoupling at the level of insulin receptor substrate (IRS). The molecular basis of this phenomenon is multi-site serine phosphorylation of IRS by different intracellular protein kinases. Muscle, liver and adipose tissue are the primary target organs of insulin resistance (Tkachuk V.A., 2014). It was established that the severity of insulin resistance mainly correlates with the accumulation of intracellular fat (Snel M., 2012). Intracellular lipid deposits disrupt insulin signal transduction pathway, thus reducing insulin-dependent glucose uptake. Another key regulator is AMP-activated protein kinase (AMPK), which serves as an energy «sensor» of the cell and a central regulator of both lipid and glucose metabolism. AMPK has also been implicated in a number of species as a critical modulator of aging through its interactions with mTOR and sirtuins. In 2001, metformin, a drug widely used to treat type 2 diabetes, was shown to activate AMPK in intact cells and *in vivo* (Steinberg G.R., 2009). It is believed that AMPK activation contributes to pleiotropic effects of metformin (Ametov A.S., 2015).

Considering the antidiabetic action of anthelmintic containing a guanidine group mebendazole (5-benzyl 2-methoxycarbonyl-amino-

benzimidazole) (Caprio S., 1984), we carried out the synthesis of novel cyclic aminobenzimidazole derivatives bearing an additional cycle (imidazole, dihydroimidazole, tetrahydropyrimido- or triazole) at position C1,2-*a*. During the study of hypoglycemic activity of these compounds we obtained divergent effects on blood glucose in animals.

Studied compounds were computer ranked according to predictive assessment by PASS and Microcosm information technologies (employing the training set of known hypoglycemic agents and the training sample of tested benzimidazole derivatives), and the results of an experimental studies on animals were used in conjunction. As a result, *N*<sup>9</sup>-2,3-dihydroimidazo [1,2-*a*]benzimidazoles and 2,3,4,10-tetrahydropyrimido[1,2-*a*]benzimidazoles were selected as the most promising class of hypoglycemic compounds. Thus, tricyclic structures featuring a masked guanidine moiety proved to be more active than aminobenzimidazole counterparts.

Later, after the substructure analysis using median and supremal assessments *in silico*, it was shown that *N*<sup>9</sup>-2,3-dihydro[1,2-*a*]benzimidazole class should be considered as the most promising in search for hypoglycemic compounds, comparing to aminobenzimidazole, *N*<sup>1</sup>-dihydro-imidazo[1,2-*a*]benzimidazole and *N*<sup>9</sup>-imidazo[1,2-*a*]benzimidazole scaffolds.

During the substructure analysis of the hypoglycemic activity amid active scaffold derivatives we defined key structural feature (residue) that defines the highest pharmacological effect – diethylaminoethyl substituent at *N*<sup>9</sup>. According to the frequency analysis of physico-chemical parameters of the experimentally studied active scaffold derivatives, a significant prerequisite of a high hypoglycemic activity is the charge on the inner imidazole ring of the condensed aromatic system Q (Imiol<sub>1</sub>)cs  $\geq -0,109$ .

A very interesting part of the work has been associated with the feasibility of pharmacological studies issue of the most active compound RU-254 (diabenol), i.e. evaluation of a drug-like properties according to ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion) using DruliTo program. It was established that diabenol has higher quantitative assessment of drug likeliness than metformin and glyburide. That is, calculated pharmacokinetic parameters favor the advanced preclinical studies.

In experiments on white rats and rabbits diabenol showed pronounced glucose-lowering effect, including carbohydrate loading conditions. Blood glucose was reduced in animals with impaired glucose tolerance (in rats with severe streptozotocin diabetes and insulin resistance syndrome) and in animals with alloxan induced diabetes, in rabbits with acute insulin deficiency (administration of anti-insulin guinea pig serum). In experiments on dogs with a removed pancreas diabenol did not reduce blood glucose levels *per se*, but promoted hypoglycemic effect of the exogenous insulin.

During the course of diabenol mode of action study, we have identified both pancreatic and extra pancreatic components. Its effect on pancreas is determined by the increase of the 1st phase of insulin secretion, especially in response to the glucose loading. Diabenol increases insulin-stimulated glucose uptake in rat diaphragm. In a model of alloxan diabetes in rats diabenol restored glycogen content, rate of glycolysis and reduced glycogenolysis in insulin-dependent organs and tissues (liver, skeletal muscles) and had virtually no effect on these parameters in insulin-independent organ – kidney.

It could be hypothesized that insulinotropic effect of diabenol is implemented through incretinomimetic properties. In previous studies (Zolotov N.N., 2013) it was shown that diabenol inhibits DPP-4 and therefore modulates insulin response. In our studies diabenol also inhibited DPP-4, but at higher concentrations, which cannot be achieved in the animal tissues. Diabenol slightly alter postprandial hyperglycemia upon a starch load, but not after a sugar load. Therefore, it has no effect on intestinal  $\alpha$ -glucosidase. Acarbose in the same conditions suppressed postprandial hyperglycemia.

Chronic administration of diabenol in a streptozotocin-nicotinamide rat model provided results of great interest. Dose of 25 mg/kg diabenol when administered orally for 4 weeks reduced the amount of fluid consumed more than 2 times, the blood glucose level almost 2 times, the level of glycated hemoglobin by 2.2%, and increased the level of C-peptide. Also, diabenol significantly increased the average number of Langerhans is-

lets and the area of pancreatic  $\beta$ -cells nuclei. At the same time, compound studied had no effect on apoptosis index (% of caspase-3 positive cells) and proliferation index (PCNA-positive and Ki-positive cells) of Langerhans islets. That is, diabenol does not influence regeneration and formation of new insulin producing cells, but prevents toxic effect of streptozotocin on  $\beta$ -cells.

Given the complex pathogenesis of type 2 diabetes, combinational drugs (fixed combinations) are widely used in clinical practice to allow multitarget impact on several key elements of the underlying disease and its complications, thus improving the outcome of antidiabetic therapy (Ametov A.S., 2015). The present study determined the optimal dosage ratio of diabenol-metformin (1:4) and diabenol-glibenclamide (5:1) in the streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes rat model. Introduction of these fixed combinations proved to be effective in terms of reducing blood glucose levels and glycated hemoglobin, increasing C-peptide levels, restoring pancreatic  $\beta$ -cells as well as in terms of carbohydrate metabolism – liver glycogen deposits and glycogenolysis.

A very important aspect of the diabetes development is activation of lipid peroxidation, which greatly contributes to  $\beta$ -cell dysfunction and peripheral insulin resistance (Balabolkin M.I., 2005). In this regard, the clinical practice of diabetes treatment was widened to include antioxidants, such as lipoic acid (Evans J.L., 2000). Consequently, on early stages of the study we explored the direct effect of some antidiabetic agents on free radical processes *in vitro*. It was established that diabenol scavenges superoxide anion, hydroxyl and peroxy radicals, while rosiglitazone is active only against superoxide anion, gliclazide provided antiradical effect in experiments with DPPH, metformin and glibenclamide showed no activity in these *in vitro* model systems. However, direct antioxidant properties of the studied drugs are difficult to capture *in vivo*, since they exhibit those effects at higher *in vitro* concentrations.

This study has determined the optimal combination of diabenol with lipoic acid (2.8:1 and 5.6:1), and its activity was studied on a rat model of streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes. It was found that this com-



bination provides a more pronounced antidiabetic effect than diabenol monotherapy. The more important result of this study is a significant reduction of the liver, pancreas and kidney lipid peroxidation products. Also, administration of diabenol-lipoic acid combination actively preserved pancreatic  $\beta$ -cells in streptozotocin-treated animals.

It is known that diabetes mellitus is associated with increased thrombogenic capacity and viscosity of blood (Morel O., 2010). This condition is defined not only by blood hyperosmolarity due to hyperglycemia but also by increased erythrocyte and platelet aggregation. Since among antidiabetic agents used in clinical practice only gliclazide has a direct effect on platelets (Siluk D., 2002), the remaining drugs exert similar effect only during long time treatment. Given the fact that diabetes increases the occurrence of thrombotic events, we studied the diabenol effect on platelet aggregation, red blood cells and overall impact on microcirculation.

We have found that diabenol exhibits antiagregative properties both *in vitro* and in whole organism. This effect on the functional activity of platelets is likely influenced by diabenol through prostacyclin and thromboxane  $A_2$  system. Diabenol rendered antithrombogenic activity on the model of thrombosis induced by electric shock of the carotid artery and on systemic adrenaline-collagen thrombosis, exceeding the activation induced by gliclazide.

The studied compound decreases aggregation and increases deformability of red blood cells under normal conditions and, more profoundly, in experimental diabetes. With the aim of fluorescent probes it is shown that diabenol increases the electronegativity of the membrane, which determines the reduction of aggregation due to «electrostatic thrust» between them (Sigal V.L., 1988), reduced microviscosity of red blood cells' membrane, which in turn increases their deformability.

Probably, due to lower thrombogenic potential and blood viscosity diabenol enhances skin graft survival in intact animals and in alloxan diabetes model. Researchers under supervision of RAS corresponding member Galenko-Yaroshevskiy believe that it could be associated with «the optimization of energy metabolism in the skin graft».

During the drug safety study of diabenol substance and dosage form (tablets containing 0.2 g of active ingredient) acute and chronic toxicity were examined along with cumulative properties, immunotoxicity, cancerogenesis, and transplacental action. The therapeutic dose of the drug did not produce adverse effects, while subtoxic doses were found to empty pancreatic  $\beta$ -cells and induce platelet hemorrhage.

No toxic and cancerogenic effects were observed during chronic administration of diabenol in NMRI mice with low cancer incidence, HER-2/neu transgenic mice, and LIO rats. Noteworthy, diabenol in NMRI mice retards the development of age-related extral functions disorders and increases life span of animals. The drug inhibited the occurrence of spontaneous tumors, reduced the incidence of malignant lymphomas, hindered the emergence and development of colon cancer induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. The authors of this study section, headed by corresponding member of Russian Academy of Sciences V.I. Anisimov, concluded that diabenol exhibits anticancerogenic and geroprotective action. That is, diabenol, which molecule comprise guanidine moiety, has experimentally proven antitumor and geroprotective effects, as well as biguanide derivative metformin.

Pharmacokinetics study of diabenol revealed that the half-life and the average retention times suggest that studied substance quickly undergoes elimination. The drug penetrates well into the organs and tissues, especially in those with a high degree of vascularization. The elimination of diabenol is highly dependent on biotransformation processes.

Clinical trials on diabenol enrolled 180 type 2 diabetes patients. The drug was administered orally in a solid form (0.2 g tablets) two times a day. The study design was randomized controlled comparative study of the efficacy, tolerability, and safety. Glidiab (gliclazide) was chosen as a reference drug. Upon chronical administration diabenol reduced fasting and postprandial blood glucose, reduced glycated hemoglobin level by 1.1 %, and increased postprandial plasma insulin level by the end of the 3rd month. Also, diabenol decreased platelets aggregation, increased erythro-

cytes deformability and reduced their aggregation, and normalized coagulation hemostasis.

According to the clinical monitoring of patients, it can be concluded that administration of 0.4 g diabenol per day during 3 months had no adverse or toxic effects.

On the research basis it can be argued that aminobenzimidazole could serve as an universal privileged structure, which can be used to identify novel antidiabetogenic agents. Presented modification to render tricyclic structures assisted to discover *N*<sup>9</sup>-2,3-dihydro[1,2-*a*]benzimidazole as the optimal scaffold in this class of chemical compounds bearing high glucose lowering activity.

Active substance diabenol under experimental and clinical conditions increases insulin secretion and peripheral tissue glucose utilization. Also, diabenol markedly reduces thrombogenic potential and viscosity of blood, which was confirmed both experimentally and clinically. It was established that diabenol analogously to biguanide derivative metformin exhibits anticancerogenic and geroprotective activity in experiment.

Thus, novel cyclic 2-aminobenzimidazole derivative diabenol containing guanidine moiety demonstrates pharmacological effects characteristic for biguanides (reduction of hyperglycemia, hepatic glycogenolysis, glucose tolerance, anticancerogenic, and geroprotective action) and those characteristic for sulfonylurea derivative gliclazide (insulinogenic, antiplatelet, and antiradical action). Quite possibly, the identified effects are not a manifestation of multitarget action, but indicate pleiotropic effects of diabenol.

The studies described in chapters 1–4, 6 and 7–10 were performed in the Volgograd State Medical University with the financial support of the Russian Science Foundation (project № 14-25-00139).

*Для заметок*

*Для заметок*

*Научное издание*

**Антидиабетогенный потенциал бензимидазолов:  
химия, фармакология, клиника**

Редактирование и верстка *Н.Н. Золиной*  
Художественное оформление обложки *Е. А. Могутиной*

Директор Издательства ВолгГМУ *Л.К. Кожевников*

Санитарно-эпидемиологическое заключение  
№ 34.12.01.543. П 000006.01.07 от 11.01.2007 г.  
Подписано в печать 26.09.2016. Формат 60x84/16  
Усл.печ. л.31,85. Уч.-изд. 29,22 л. Бумага офсетная. Гарнитура Times New Roman  
Тираж 150 экз. Заказ

Волгоградский государственный медицинский университет  
400131 Волгоград, пл. Павших борцов, 1

Издательство ВолгГМУ  
400006 Волгоград, ул. Дзержинского, 45

---

*«Фармацевтическая индустрия, являющаяся одним из важнейших элементов системы здравоохранения, стоит на пороге коренных изменений. В наибольшей степени эти изменения должны быть связаны с формированием инновационной составляющей, развитием импортозамещения и ростом производительности труда. Инновационный сценарий развития событий предполагает... решить проблему лекарственного обеспечения населения России в существующих условиях и на долгосрочную перспективу. Конечной целью всех этих инициатив является создание устойчивой национальной индустрии, способной обеспечить население Российской Федерации доступными, эффективными и безопасными лекарствами в необходимых количествах. Важнейшим элементом Стратегии должна быть направленность на создание нового поколения инновационных лекарств».*

*Из Стратегии развития  
российской фармацевтической  
промышленности до 2020 года*

---