

На правах рукописи

ЗАХАРЬЯЩЕВА ОЛЬГА ЮРЬЕВНА

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

14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Волгоград – 2020

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

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

Спасов Александр Алексеевич

Научный консультант:

Доктор биологических наук, старший
научный сотрудник НЦИЛС ВолгГМУ

Васильев Павел Михайлович

Официальные оппоненты:

Заслуженный деятель науки РФ, доктор
медицинских наук, профессор, заведующая
лабораторией психофармакологии ФГБНУ
НИИ фармакологии имени В.В. Закусова,

Воронина Татьяна Александровна

Доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой фармакологии и
клинической фармакологии ФГАОУ ВО
Белгородского государственного
национального исследовательского
университета, директор НИИ
Фармакологии живых систем НИУ
«БелГУ»

Покровский Михаил Владимирович

Ведущее учреждение: «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной
медицины имени Е.Д. Гольдберга» Федерального государственного бюджетного научного
учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской
академии наук»

Защита диссертации состоится «__»_____2020 г. в _____ч. на заседании
Диссертационного Совета Д 208.008.02 ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный
медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу
400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.

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

Автореферат разослан «__»_____2020 г.

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор биологических наук

Любовь Ивановна Бугаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

В современной клинической практике используются следующие группы препаратов, рекомендованные алгоритмами и протоколами лечения пациентов с СД2: бигуаниды, тиазолидиндионы, препараты сульфонилмочевины, глиниды, ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4), агонисты рецепторов глюкагонподобного пептида-1 (ГПП-1), ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа, ингибиторы альфа-глюкозидаз, инсулины [Krentz A.J., 2018]. В последние десятилетия количество сахароснижающих препаратов неуклонно растет; вместе с тем, процесс выбора препарата в реальной клинической практике только усложняется [Аметов А.С., 2017]. Препараты из вышеперечисленных групп используются как в моно-, так и в комбинированной терапии, однако, имеют ряд общих недостатков: гипогликемия; повышение массы тела; желудочно-кишечные расстройства; другие метаболические нарушения – лактат-ацидоз и B_{12} -дефицитная анемия [Тюренок И.Н., 2015].

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

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

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

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

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

Для решения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выполнить консенсусный прогноз наличия ГК-активирующей активности среди библиотеки доступных химических соединений *in silico*.
2. Изучить влияние спрогнозированных веществ на активность глюкокиназы *in vitro*.
3. Исследовать гипогликемические свойства наиболее активных соединений на интактных животных при пероральной нагрузке глюкозой.
4. Определить влияние соединений NP-001 и NP-006 на процессы пролиферации α - и β -клеток поджелудочной железы при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете.
5. Оценить антидиабетическую активность соединений NP-001 и NP-006 при 21-дневном введении мышам линии C57BL/6J с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа.
6. Исследовать влияние соединений NP-001 и NP-006 на механизмы развития поздних осложнений сахарного диабета.
7. Определить лекарственное подобие, выполнить прогноз фармакокинетических и токсикологических свойств, а также определить острую токсичность соединений NP-001 и NP-006.

Научная новизна исследования. В результате консенсусного виртуального скрининга *in silico* и экспериментального тестирования *in vitro* из 14 изученных скаффолдов выявлены наиболее активные в отношении глюкокиназы – производные бифенилоксида, биспиридина, пиридина, пиримидина, хинолина, тиазолидиндиона и тиазолобензимидазола. Для 6 исследуемых классов химических структур (дiazепинобензимидазолы, имидазобензимидазолы, биспиридины, тиазолобензимидазолы, триазолопиримидины и пептидомиметики) было впервые спрогнозировано и экспериментально доказано

наличие ГК-активирующих свойств. Впервые установлена взаимосвязь «структура-активность», в результате выявлен наиболее активный класс в отношении глюкокиназы – биспиридины.

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

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

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

Основные положения, выносимые на защиту

1. Производные бифенилоксида, биспиридина, пиридина, пиримидина, хиназолина, тиазолидиндиона и тиазолобензимидазола активируют глюкокиназу человека.
2. При 21-дневном внутрибрюшинном введении соединение NP-006 в дозе 300 мг/кг улучшает толерантность к глюкозе, снижает инсулинорезистентность, массу тела животных и признаки системного воспаления; ингибирует глюконеогенез и активирует глюкокиназу печени у мышей с сахарным диабетом 2 типа.
3. Соединение NP-006 достоверно увеличивает удельное количество инсулин-позитивных клеток в панкреатических островках у мышей со стрептозоцин-индуцированным сахарным диабетом сопоставимо с соединением сравнения PF-04937319.
4. LD₅₀ соединений NP-001 и NP-006 превышает 2000 мг/кг на мышцах и крысах при пероральном введении и составляет 944 мг/кг и более 1000 мг/кг при внутрибрюшинном введении, соответственно.

Внедрение результатов исследования. Полученные данные о способности новых производных биспиридина и тиазолобензимидазола активировать глюкокиназу используется при синтезе новых веществ в Научно-образовательном центре фармацевтики КФУ (г. Казань) и в НИИ ФОХ Южного Федерального университета (г. Ростов-на-Дону). В работе кафедры фармакологии и биоинформатики

ВолгГМУ применяется новый комплексный подход к поиску новых активаторов глюкокиназы. Результаты работы включены в учебный процесс на кафедрах фармакологии и фармации ИНМФО (Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования) ВолгГМУ, фармацевтической и токсикологической химии ВолгГМУ, на кафедрах фармакологии Кубанского государственного медицинского университета и Сибирского государственного медицинского университета.

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

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

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

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

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе приведён обзор отечественных и зарубежных литературных источников по теме диссертации. В первом разделе представлены основные группы препаратов для лечения СД2, одобренные для клинического применения. Второй раздел посвящен роли глюкокиназы печени и поджелудочной железы в обмене глюкозы и регуляции массы β -клеток. В заключительном разделе описываются современные активаторы глюкокиназы как новые, перспективные лекарственные средства для терапии

СД2.

Во второй главе диссертации описаны материалы и методы исследования. Изучено 154 вещества, из которых 17 соединений относятся к производным бензимидазола, 2– к производным бифенила, 8– к производным бифенилоксида, 5– к производным бис-пиридина, 4 - к производным 4H-диазепинобензимидазола, 2– производные дигидробензофурана, 15– к производным имидазобензимидазола, 2 – к пептидомиметикам, 53– к производным пиридина, 16– к производным пиримидина, 12– к производным хиназолина, 2– к производным тиазолидиндиона, 6– к производным тиазолобензимидазола, 11– к производным триазолопиримидина (структуры соединений представлены в электронном приложении 1 диссертации).

Исследуемые вещества были синтезированы в НИИ физической и органической химии Южного федерального университета ведущим научным сотрудником, к.х.н. В.А. Анисимовой и научным сотрудником, к.х.н. О.Н. Жуковской; сотрудниками Волгоградского государственного технического университета: доцентами кафедры технологии органического и нефтехимического синтеза, к.х.н. В.С. Лобасенко и к.х.н. Т.К. Корчагиной под руководством заведующего кафедрой, д.х.н., профессора Ю.В. Попова; сотрудниками Самарского государственного технического университета под руководством заведующего кафедрой, профессора, д.х.н. Ю.Н. Климочкина; сотрудниками кафедры фармацевтической и токсикологической химии Волгоградского государственного медицинского университета под руководством заведующего кафедрой д.х.н., профессора А.А. Озерова; сотрудниками Научно-образовательного центра фармации Казанского федерального университета по руководством д.х.н., профессора Ю.Г. Штырлина.; сотрудниками Башкирского государственного медицинского университета, под руководством заведующего кафедрой фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии, профессора, д.фарм.н. Ф.А. Халиуллина; сотрудниками Института органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения Российской академии наук (ИОС УрО РАН) на кафедре органической и биомолекулярной химии под руководством доцента, к.х.н. Г.Л. Русинова.¹

Фармакологические исследования проводились на лабораторных животных: 110 нелинейных крысах-самцах массой 200-350 г (филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, ветеринарное свидетельство № 860665249 от 01.10.18); 90 нелинейных мышах обоего пола массой 20-30 г (ООО «НИЦ БМТ», ветеринарное свидетельство № 0725507 от 01.09.17); 6 кроликах-самцах породы Шиншилла массой 3-3,5 кг (филиал «Электрогорский» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, ветеринарное свидетельство № 1544756883 от 27.02.2019); 50 мышах-самцах линии C57BL/6J массой 20-23 г (ООО «НИЦ БМТ», ветеринарное свидетельство № 1376917942 от 24.01.19). Животные содержались в стандартных условиях вивария Волгоградского государственного медицинского университета с естественным световым режимом при относительной влажности воздуха 40-50% и температуре 22-24 °С на стандартной диете для лабораторных животных [ГОСТ Р 50258-92, 1992]. Содержание животных и экспериментальные манипуляции отвечали международным рекомендациям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (1986 г.), а также правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ в соответствии с

¹ Выражаем глубокую признательность за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

«Принципами надлежащей лабораторной практики» [ГОСТ Р 33044-2014, 2015] и «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (Минздрав РФ, приказ № 199-н от 1 апреля 2016 г.).

В настоящей работе в качестве объектов выступали данные по 2D-структуре 155 новых соединений, а также оригинальный банк данных по структуре известных соединений, экспериментально изученных исследователями на глюкокиназную активность. Исследования *in silico* были выполнены в несколько этапов: 1) формирование базы данных по структуре новых соединений; 2) формирование оригинального банка данных по структуре и уровню активности известных активаторов глюкокиназы; 3) консенсусный прогноз уровня активирующей ГК активности новых соединений по расчетным оценкам, полученным с использованием трех систем компьютерного прогноза; 4) моделирование с помощью технологии искусственных нейронных сетей зависимости активирующей ГК активности новых соединений от ее расчетных прогнозных оценок, полученных с использованием пяти различных методов и трех систем компьютерного прогноза; 5) анализ молекулярного механизма связывания наиболее активных новых соединений с сайтом ГК; 6) консенсусный прогноз *in silico* показателей ADMET наиболее активных новых соединений. Использовалось следующее программное обеспечение: СУБД ChemFinder 9.0 [PerkinElmer, 2017], программный комплекс ИТ Микрокосм 7.2 [Свидетельство, 2011; Vassiliev, 2014], система Microcosm BioS 18.1.9 [Vassiliev, 2014; Васильев, 2016; Khomenko, 2019], PASS Pro 10.4 [Свидетельство, 2006], программы MarvinSketch 17.1.23 [MarvinSketch, 2019], МОРАС2016 [МОРАС, 2019], AutoDock Vina 1.1.1 [Trott, 2010], AutoDockTools 1.5.2 [MGLTools, 2011], PyRx 0.8 [PyRx, 2017], Statistica 8.0 [Statistica, 2019], LigandScout 4.2 Advanced [Inte:ligand, 2018], система Microcosm ADMET 6.6.17 [Васильев, 2016; Свидетельство, 2011; Vassiliev, 2014], программа DruLiTo [DruLiTo, 2018], on-line ресурсы GEB [GEB, 2018], ADMET-PreServ [ADMET-PreServ, 2018], ProTox [ProTox, 2018], admetSAR [admetSAR, 2018], pkCSM [pkCSM, 2018], SwissADME [SwissADME, 2018]. Итоговая *in silico* оценка уровня конкретного фармакологического эффекта выполнялась путем консенсусного обобщения оценок, полученных с помощью нескольких программных приложений.

Активность глюкокиназы (ГК человеческой печени рекомбинантная, экспрессированная в *E. coli*, Sigma, США) определяли посредством сопряженной реакции образования глюкозо-6-фосфата с генерацией NADH с помощью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы при 37°C в 96-луночном прозрачном полистироловом планшете с плоским дном (Costar 9018, США) в конечном инкубируемом объеме 210 мкл. Инкубационная смесь содержала все необходимые компоненты в соответствии с методиками Salt D. и Биззаро Т.Ф., 2010. За меру активности ГК принимали повышение оптической плотности при длине волны 340 нм в течение 20 мин. инкубирования после начала реакции. Измерения проводили с помощью микропланшетного ридера Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия).

Изучение гипогликемического действия исследуемых веществ выполнялось в стандартном пероральном тесте толерантности к глюкозе при однократном введении интактным животным [GoTo Y., 1975; Futamura M., 2006]. Уровень глюкозы в крови определяли с помощью биохимического анализатора Biosen C_Line (EKF Diagnostics, Германия).

Экспериментальный СД2 моделировали высокожировой диетой (ВЖД) на мышах линии C57BL/6J массой 22-23 г (возраст 12 недель). Всем животным предоставляли свободный доступ к воде. Высокожировая диета: комбикорм для крыс экструдированный (13000 кДж/кг; белок 19%, жиры 5%, клетчатка 4%, лизин 1,2%, метионин + цистеин 0,7%, кальций 0,6-0,9%, фосфор 0,6-0,9%, натрий 0,20-

0,25%) (370 г/кг), жир свиной, казеин (313 г/кг), метионин (3 г/кг), витаминно-минеральные добавки (витамина А, витамин D₃, витамин Е, витамин В₂, витамин В₁₂, железо, медь, марганец, цинк, кобальт, йод) (61 г/кг), казеин (253 г/кг). Компоненты высокожировой диеты отвешивали из расчета 30 г смеси на 1 животное в сутки, измельчали и смешивали до однородности [Srinivasan K., 2005], хранили при +4 °С.

Измерение концентрации глюкозы в венозной крови проводили за день до начала содержания мышей на высокожировой диете и далее еженедельно до окончания эксперимента в утренние часы. Общий срок моделирования СД₂ у мышей на высокожировой диете составил 10 недель. В эксперимент включали животных с уровнем глюкозы натощак более 7 мМ. Начиная с 71-ого дня мышам ежедневно вводили тестируемые соединения в течение 21 дня. В конце 10-ой недели проводили интраперитонеальный тест толерантности к глюкозе (нагрузка глюкозой 1 г/кг) для подтверждения развития СД₂ [Lu M., 2014]. На 71-ый день после развития патологии животные были распределены на 5 групп: контрольная (без патологии, стандартный рацион вивария без введения соединений, n=10); СД (рацион «высокожировая диета» без введения соединений, n=8); метформин (рацион «высокожировая диета» и введение препарата сравнения метформина, n=7); NP-001 (рацион «высокожировая диета» и введение соединения NP-001, n=10), NP-006 (рацион «высокожировая диета» и введение соединения NP-006, n=10). Животным интактной и контрольной групп один раз в сутки вводили дистиллированную воду (10 мл/кг в/б); группе животных препарата сравнения вводили метформин (150 мг/кг в/б) [Jang E. H., 2010]; животным опытных групп вводили исследуемые соединения NP-001 и NP-006 (300 мг/кг в/б) в равном объеме дистиллированной воды (10 мл/кг). Массу тела животных и концентрацию глюкозы в крови определяли еженедельно - на 77-ые, 84-ые, и 91-ые сутки введения [Lu M., 2014].

По окончании эксперимента на 92-ые и 93-ьи сутки животных наркотизировали введением раствора хлоралгидрата (400 мг/кг в/б) и забирали до 2 мл крови пункцией сердца в пробирки с гепарином (50 ЕД/мл крови). Плазму крови получали центрифугированием в течение 15 мин. при 3000 об./мин. и хранили при -80 °С до проведения биохимического и иммуноферментного анализа. После эвтаназии производили забор печени и белой жировой ткани (ретроперитонеальной, эпидидимальной и мезентериальной) в соответствии с руководством [Johnson P. R., 1972].

На 94-ый день эксперимента определяли концентрацию инсулина в образцах плазмы крови с помощью набора Mouse Insulin ELISA Kit (Cusabio, США). На 95-ый день эксперимента проводили биохимический анализ плазмы крови с помощью следующих наборов: Cholesterol Liquid 250 S (Erba Lachema, Чехия), ЛПНП LDL C Direct 80 (Erba Lachema, Чехия), ЛПВП HDL C Direct 240 (Erba Lachema, Чехия) и Triaglycerol Liquid 250 S (Erba Lachema, Чехия). На 96-97-ой дни эксперимента в гомогенате печени проводили определение скорости гликолиза и гликогенолиза [Kondoh Y., 1994], содержания триглицеридов [Winzell M. S., 2011], гликогена [Winzell M. S., 2011], аланина [Досон Р., 1991], лактата [Barker S. B., 1941]. Также, была определена активность глюкокиназы печени [Salt D.; Биззаро Т.Ф., 2010].

При изучении влияния активаторов глюкокиназы на процессы регенерации β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы мышей при стрептозотоцин-индуцированном диабете были использованы методики [Furman B.L., 2015], [Stolovich-Rain M., 2012] и [Nir T., 2007]. Животным опытной группы вводили СТЗ в дозе 200 мг/кг, в/б. (1,0 мл / 100 г веса), контрольная группа получала равный объем цитратного буфера (pH=4.5). На 10-ый день эксперимента удалили еду из клеток на 6 часов, измерили содержание глюкозы в образце крови хвостовой вены. В исследования брали животных с уровнем глюкозы

не менее 15,0 мМ. Животным опытных групп были введены исследуемые вещества (NP-001, NP-006) и препарат сравнения PF – 04937319 в дозе 50 мг/кг внутривенно в растворе натрий-карбоксиметилцеллюлозы (1,0 мл / 100 г веса). Через 13 часов выводили животных из эксперимента. ²Иммуногистохимическое исследование ткани поджелудочной железы проводилось по протоколам фирм производителей антител с температурной демаскировкой антигенов в «Dewax and HIER Buffer L» буфере (Thermo scientific, США). с помощью флуоресцентного микроскопа «Axioimager.A2» (Карл Цейсс, Германия), при начальном увеличении x200, x400 и x630 с использованием программного обеспечения «Isis» (MetaSystems, Германия).

Методы изучения механизмов антиоксидантного действия наиболее активных соединений на моделях *in vitro*. Антирадикальная активность (АРА) изучалась по способности веществ инактивировать свободный стабильный радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ) (Sigma, США) [Alam M.N., 2013] и на модели образования свободных радикалов в системе Hb-H₂O₂-люминол [Alam M.N., 2013].

Оценку антигликирующего действия наиболее активных соединений проводили в системе БСА-глюкоза в присутствии и отсутствии Cu²⁺ [Esfahanizadeh M., 2015]. В качестве вещества сравнения использовали гидрохлорид аминогуанидина [Wei M., 2003] и лозартан [Yamagishi S., 2010]. Хелатирующую активность соединений исследовали по методике подавления медь-зависимого автоокисления аскорбиновой кислоты [Иванов А.В., 2018]. В качестве контроля использовали пиоглитазон [Desouza C.V., 2010].

Изучение антиагрегантного действия выполняли согласно методу Vom G. в модификации Габбасова В.А. (1989) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов BiolaLA-220. Исследования выполняли на богатой тромбоцитами плазме кроликов породы «Шиншилла», полученной по способу, описанному Люсовым В.А., Белоусовым Ю.Б. (1971). Определение антитромбогенного действия наиболее активных соединений на моделях *in vivo* проводили на 40 беспородных половозрелых крысах самцах массой 250-300 г. с использованием модели артериального тромбоза сонной артерии, индуцированного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) [Kurz K.D., 1990]. Оценку антитромбогенного действия проводили по времени образования тромба.

Исследование цитотоксичности соединений-лидеров³. Перитонеальные макрофаги (ПМ) выделяли из перитонеального экссудата белых беспородных мышей по методике [Woyum A., 1974]. Исследование цитотоксичности новых субстанций на неонатальных фибробластах сердца крыс проводили на беспородных лабораторных крысах в 2 этапа. На 1 этапе получали суспензию клеток желудочков сердец новорожденных 1–2-суточных животных с помощью метода протеолитической диссоциации [Бильдюг Н.Б., 2015]. Для освобождения культуры от клеток эндотелия и клеток крови полученную суспензию клеток сердца центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Для того чтобы отделить более адгезивные фибробласты от медленно прикрепляющихся кардиомиоцитов, использовали метод селективной адгезии [Villarreal F.J., 1999; Dubey R.K., 1997]. На 2 этапе получали культуру сердечных фибробластов из обогащенной фибробластами культуры, полученной в результате первого этапа селективной адгезии. Все

² Выражаем глубокую признательность за помощь в проведении исследования д.м.н, профессору Снигуру Г.Л., ассистенту Сурину С. С.

³ Выражаем глубокую признательность за помощь в проведении исследования н.с., Борисову А.В., к.х.н., с.н.с. Бабкову Д.А.

эксперименты с фибробластами проводили на клетках первых двух пассажей [Тао Х., 2014; Zhang P., 2011; Yun-lin Chen, 2019]. Жизнеспособность клеток определяли по МТТ-тесту в соответствии с методиками [Kumar P., 2018; Stepanenko A.A., 2015].

Острую токсичность соединений изучали на 40 белых нелинейных мышах-самцах массой 20-25 г при однократном пероральном и в/б введении. Определение острой токсичности также выполняли на нелинейных крысах обоего пола массой 180-220 г. при однократном пероральном введении растворов изучаемых веществ в физиологическом растворе. Для расчета величины токсикологического показателя LD₅₀ использовали пробит-анализ по методу Блисса-Прозоровского [Сергиенко В. И., 2012].

Методы статистической обработки данных, полученных на этапе компьютерного прогноза активности соединений и анализа зависимости активности от химической структуры и физико-химических свойств, представлены в соответствующих разделах. Для обработки экспериментальных данных использовались методы, рекомендованные Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Сергиенко В.И., 2012], реализованные в программных пакетах GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США), Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office, США), Statistica 6.0 (Statsoft, США) и StatPlus 6.0 (AnalystSoft Inc., США): нормальность распределения выборки проверялась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова с поправкой Лиллиефорса. В качестве параметрических критериев использованы непарный *t*-тест, для множественного сравнения – однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ с пост-тестом Даннета, для зависимых измерений – парный *t*-тест. В случае ненормального распределения данных использованы U-критерий Манна-Уитни, критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна – для множественного сравнения, для зависимых измерений – критерий Вилкоксона. Расчеты концентрационных зависимостей выполнены с использованием линейного и нелинейного регрессионного анализов.

В третьей главе представлены результаты консенсусного прогноза наличия ГК-активирующей активности исследованных химических соединений *in silico* с использованием трех систем компьютерного прогноза, а именно программы ИТ Микрокосм, Microcosm BioS и докинга. Был создан банк данных по структуре и уровню активности известных активаторов глюкокиназы, на который получено свидетельство о государственной регистрации [Свидетельство, 2016]. С целью дальнейшего использования в компьютерных системах прогноза была сформирована база данных по структуре 155 новых соединений (в том числе соединения сравнения PF-04937319), являющихся производными 14 скаффолдов.

В результате консенсусного виртуального скрининга выявлено, что наиболее перспективными в отношении ГК можно считать производные бифенилоксида, биспиридина, пиридина, пиримидина, хиназолина, тиазолидиндиона и тиазолобензимидазола (табл. 1). Для 6 исследуемых классов химических структур (дiazепинобензимидазолы, имидазобензимидазолы, биспиридины, тиазолобензимидазолы, триазолопиримидины и пептидомиметики) было впервые спрогнозировано наличие активности в отношении глюкокиназы. Также, для соединения сравнения PF-04937319 была получена довольно высокая прогнозная оценка, что подтверждает адекватность проведенного анализа.

Таблица 1. Качественный прогноз в трёх компьютерных системах уровня глюкокиназной активности новых соединений

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

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

В 4 главе описан экспериментальный скрининг 155 новых химических соединений по влиянию на активность глюкокиназы *in vitro* в концентрации 100 мкМ в сравнении с соединением PF-04937319 и проведен кластерный анализ глюкокиназной активности в соответствии с химическим классом. При сопоставлении результатов виртуального прогноза и данных *in vitro* установлено, что консенсусные оценки соединений с высокой степенью достоверности соответствуют экспериментально определенным значениям уровней активности изученных активаторов глюкокиназы (по точному критерию Фишера $p < 5 \cdot 10^{-5}$). Для 12 классов химических соединений из 14 (а также для препарата сравнения PF-04937319) индексы уровней активности в исследованиях *in silico* и исследованиях *in vitro* совпадают, что говорит о целесообразности и адекватности проведения доэкспериментального виртуального скрининга (табл. 2).

Таблица 2. Соответствие консенсусных прогнозных оценок *in silico* и экспериментальных показателей ГК активности *in vitro*.

| Класс химических соединений | Наличие уровня активности в исследованиях | | |
|-----------------------------|---|-------------------|--------------|
| | <i>in silico</i> * | <i>in vitro</i> * | Соответствие |
| Бензимидазолы | + | + | + |
| Бифенилы | + | + | + |
| Бифенилоксиды | + | - | - |
| Биспиридины | + | + | + |
| Диазепинобензимидазолы | + | + | + |
| Дигидробензофураны | + | + | + |
| Имидазобензимидазолы | + | + | + |
| Пептидомиметики | + | - | - |
| Пиразолотриазин | + | + | + |
| Пиридины | + | + | + |
| Пиримидины | + | + | + |
| Хиназолины | + | + | + |
| Тиазолидиндионы | + | + | + |
| Тиазолобензимидазолы | + | + | + |
| Триазолопиримидины | + | + | + |
| PF-04937319 | + | + | + |

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

Наибольшее количество активных соединений являются производными биспиридина – количество субстанций с высокой ГК-активностью составило 4 из 5 (80%).

Анализ структура-активность для веществ группы биспиридина показал, что их эффективность зависит от строения линкерного фрагмента следующим образом: S> S-S> S=O> SO₂> S-S и 2HCl. Можно также предположить, что присутствие солевого компонента снижает количество гидрофобных взаимодействий с сайтом связывания ГК, и, соответственно, активность в отношении данного фермента (табл. 3).

Таблица 3. Химическое строение соединений – производных биспиридина

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

Так как наиболее эффективными соединениями по данным *in vitro* были вещества под шифром NP-001 (EC₅₀ 33,40 мкМ) и NP-006 (EC₅₀ 18,56 мкМ против EC₅₀ 6,80 мкМ соединения сравнения PF-04937319, табл. 4) группы биспиридина, был проведен анализ механизма молекулярного их взаимодействия с аллостерическим центром глюкокиназы. Анализ позволяет предположить, что присоединение полужесткой цепочки с ароматическим гидрофобным заместителем к углероду между атомом серы и пиридиновым циклом способно существенно увеличить ГК-активирующие свойства вышеуказанных соединений.

Таблица 4. Влияние наиболее активных соединений на активность глюкокиназы *in vitro*

| Шифр соединения | EC ₅₀ , мкМ | Шифр соединения | EC ₅₀ , мкМ |
|-----------------|------------------------|--------------------|------------------------|
| NP-006 | 18,56* | RU-0053 | 563,5* |
| NP-001 | 33,40* | RYUVK-0042 | 693,5* |
| HC-0281 | 35,49* | KD-0054 | 1522* |
| KD-0069 | 143,2* | RU-0688 | 2416* |
| LOSUK-0019 | 147,2* | RUS-0189 | 3411* |
| 14102 | 173,4* | HC-0438 | 7600* |
| KD-0068 | 279,5* | RU-0055 | 82050* |
| RU-0052 | 517,6 | PF-04937319 | 6,80* |

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

Глава 5 посвящена изучению влияния наиболее активных соединений на углеводный обмен при однократном введении для первичной оценки эффективности периферического действия в условиях целого организма. Данное исследование проводилось с помощью перорального теста толерантности к глюкозе (глюкозная нагрузка 2 г/кг) на интактных нелинейных крысах-самцах. В качестве препарата сравнения использовался вилдаглиптин (10 мг/кг). Установлено, что из 6 наиболее активных соединений,

отобранных по итогам прогнозной оценки и экспериментальной проверки *in vitro*, гипогликемическое действие проявили соединения NP-001 и NP-006 при внутрибрюшинном пути введения. Для вещества NP-006 наблюдалось статистически значимое улучшение толерантности к глюкозе в дозах 300 мг/кг (площадь под кривой глюкоза-время -21,5% против -20,9% вилдаглиптина) и 500 мг/кг (площадь под кривой глюкоза-время -37,1% против -30,7% вилдаглиптина) при однократном введении интактным животным, при этом не наблюдалась гипогликемия (рис. 1).

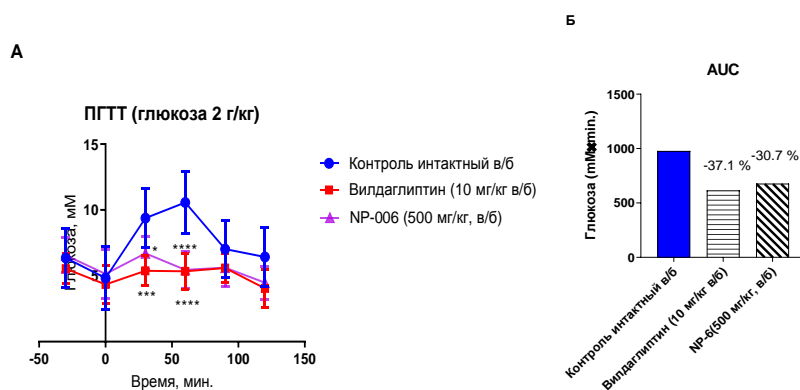


Рисунок 1. Эффект соединения NP-006 (500 мг/кг, в/б) и препарата сравнения вилдаглиптина (10 мг/кг в/б) в пероральном тесте толерантности к глюкозе (2 г/кг) на интактных животных (А). Площадь под кривой глюкоза-время (Б). Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к интактному контролю, критерий 2-факторный ANOVA с пост-тестом Даннета (* $p < 0,0304$; *** $p < 0,0009$; **** $p < 0,0001$).

В главе 6 описывается изучение новых соединений на модели экспериментального стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у нелинейных мышей-самцов при однократном введении для определения влияния на пролиферацию β -клеток поджелудочной железы. По данным иммуногистохимического исследования установлено, что соединения NP-001 и NP-006 увеличивали пролиферативную активность эндокриноцитов островков Лангерганса. Для вещества NP-006 отмечалось статистически достоверное увеличение инсулоцитов с восстановлением удельного количества глюкоагон-позитивных клеток.

Данное вещество сопоставимо по пролиферативной активности с соединением сравнения PF-04937319 (43,2 \pm 22,6% против 42,4 \pm 12,1%) и увеличивает количество инсулин-позитивных клеток в 1,86 раз по сравнению с группой животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом (табл. 5). Таким образом, полученные результаты подтверждают литературные данные, из которых известно, что активаторы ГК увеличивают пролиферацию β -клеток в поджелудочной железе [Nakamura A., 2012; Oh Y. S., 2014; Vella A., 2019].

Таблица 5. Влияние соединений NP-001, NP-006 и PF-04937319 на удельное количество инсулин-позитивных и глюкоагон-позитивных клеток поджелудочной железы (M \pm m)

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

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

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

В седьмой главе представлены данные по моделированию СД₂ высокожировой диетой (ВЖД) на мышцах линии C57BL/6J. В данном исследовании было показано статистически значимое увеличение

уровня глюкозы натощак и достоверное повышение массы тела животных, получавших диету с высоким содержанием жиров в течение 70 дней. Также, по результатам глюкозотолерантного теста отмечалось ухудшение толерантности к глюкозе (площадь под кривой «глюкоза-время» +35.1%); кроме того, установлено увеличение инсулинорезистентности по показателю НОМА-IR ($4,56 \pm 1,04$ усл. ед. против $1,96 \pm 1,04$ усл. ед. у интактных животных) и выраженная гиперинсулинемия ($14,4 \pm 1,6$ мкЕД/мл против $6,00 \pm 1,7$ мкЕД/мл). Таким образом, можно сделать вывод о развитии сахарного диабета 2 типа у мышей линии C57BL/6J, находящихся на высокожировой диете.

Глава 8 посвящена определению антидиабетической активности соединений NP-001 и NP-006 при 3-х недельном введении на мышцах-самцах линии C57BL/6J с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа. Установлено, что наиболее выраженный антигипергликемический эффект, сопоставимый с таковым у препарата сравнения метформина (площадь под кривой «глюкоза-время»: -27,9% против -31,3%), а также значимое снижение массы тела животных к концу 21-дневного введения и в динамике, превосходя активность метформина, показало соединение NP-006. Соединение NP-001 незначимо снижало массу тела мышей и не вызвало достоверного улучшения толерантности к глюкозе (рис. 3).

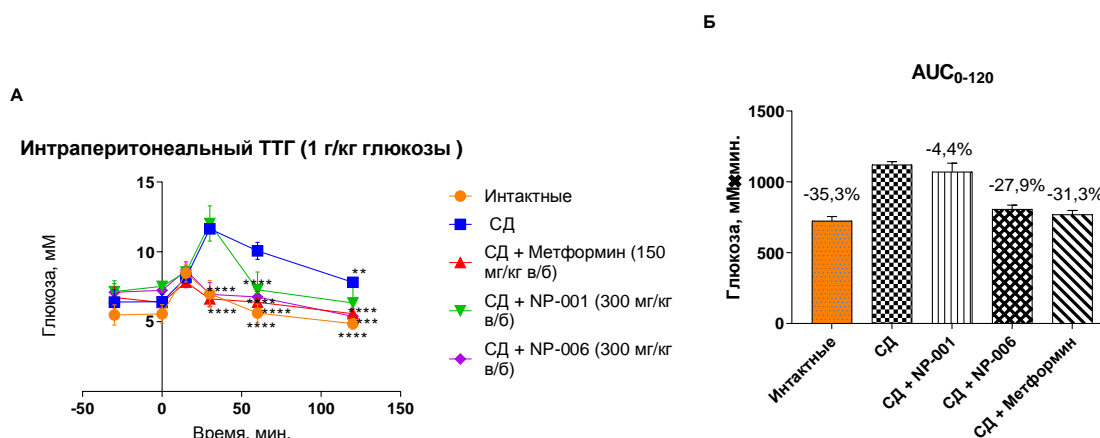


Рисунок 3. Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на глюкозотолерантность мышей DIO-C57BL/6J с экспериментальным СД2 (А). Площадь под кривой глюкоза-время (Б). Среднее \pm SD; статистическая значимость по отношению к группе СД, 1-факторный и 2-факторный критерии ANOVA с пост-тестом Даннета (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$); по отношению к группе СД, критерий 1-факторный ANOVA с пост-тестом Даннета (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$); ns* по отношению к интактному контролю, критерий 1-факторный ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$); ns# по отношению к группе СД, критерий 1-факторный ANOVA с пост-тестом Даннета ($p > 0,05$).

Соединения NP-001, NP-006 и препарат сравнения метформин значимо улучшали чувствительность к инсулину по показателю НОМА-IR ($2,21 \pm 1,51$ усл. ед., $1,36 \pm 0,64$ усл. ед. против $4,93 \pm 1,9$ усл. ед. в группе СД) по сравнению с группой СД, где наблюдалась выраженная гиперинсулинемия (рис. 4).

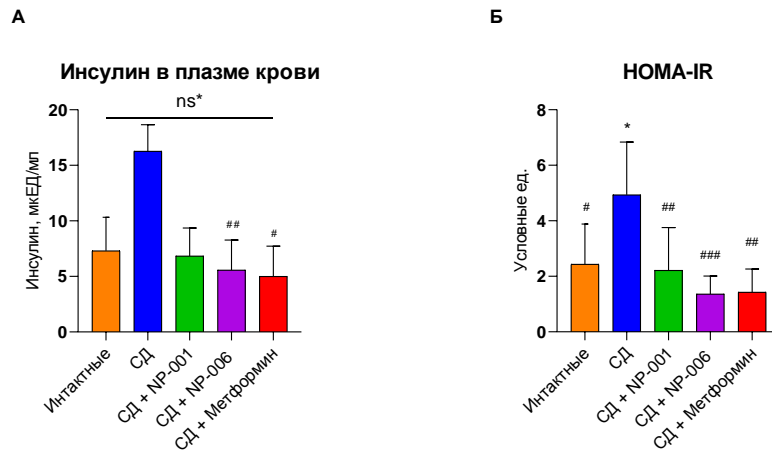


Рисунок 4. Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на биохимические показатели плазмы крови мышей DIO-C57BL/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. (А) – Инсулин в плазме крови; (Б) – НОМА-IR. Среднее \pm SD; статистическая значимость см. рис.3.

Уменьшение массы тела животных опытных групп коррелировало со снижением массы ретроперитонеальных и мезентериальных жировых депо. Для метформина не отмечалось значимого изменения веса, что согласуется с литературными данными [Tahrani A. A., 2016; Hundal R. S., 2000], а для соединений NP-001 и NP-006 масса ретроперитонеальной жировой ткани снижалась в 1,3 и 1,6 раз соответственно ($p < 0,01$; $p < 0,001$), а масса мезентериального жира достоверно снизилась в 1,1 и 1,5 раз соответственно ($p < 0,01$; $p < 0,001$) (рис. 5).

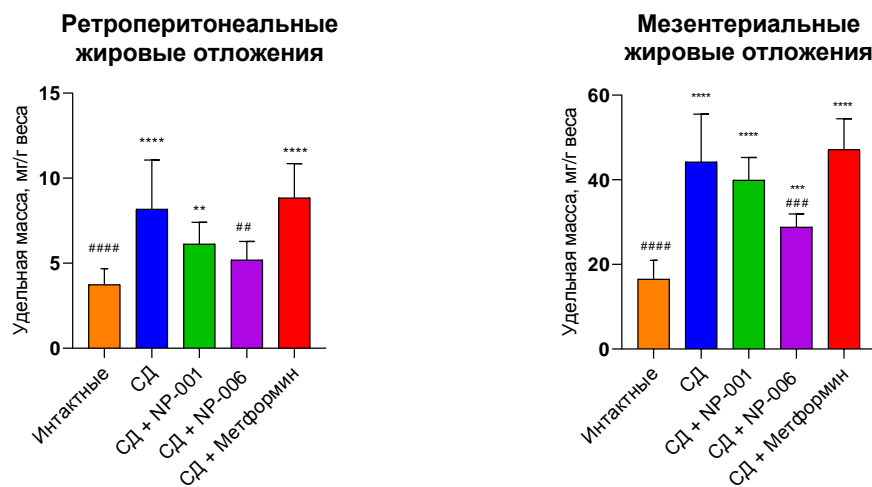
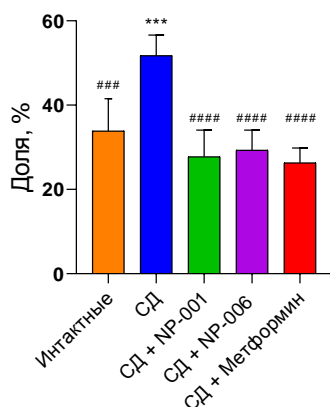


Рисунок 5. Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на массу ретроперитонеальных и мезентериальных жировых отложений мышей DIO-C57BL/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. Среднее \pm SD; статистическая значимость см. рис.3.

При исследовании маркеров системного воспаления для всех исследуемых групп (NP-001, NP-006 и метформин) выявлено достоверное по отношению к группе СД уменьшение доли сегментоядерных нейтрофилов (27,8 \pm 6,3%, 29,3 \pm 4,7% и 26,3 \pm 3,5% против 51,8 \pm 5,8%, $p < 0,0001$), а также статистически значимое восстановление уровня лимфоцитов до нормальных значений в сравнении с группой СД (64,3 \pm 3,8%, 61,4 \pm 5,8% и 67,33 \pm 2,5% соответственно, против 38,25 \pm 3,8%, $p < 0,0001$, рис. 6).

А

Сегментоядерные нейтрофилы



Б

Лимфоциты

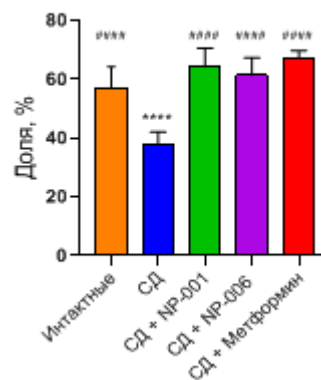


Рисунок 6. Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на показатели лейкоцитарной формулы мышей DIO-C57BL/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. (А) - Доля сегментоядерных нейтрофилов; (Б) - Доля лимфоцитов. Среднее \pm SD; статистическая значимость см. рис.3.

Также выполнено определение содержания циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в периферической крови животных. Найдено характерное повышение ЦИК ($17,8 \pm 1,5$ усл. ед) для группы с сахарным диабетом, в группах животных, которые получали соединения NP-001, NP-006 и метформин отмечалось выраженное снижение аналогичного показателя в 2,3, 2,4 и 2,1 раз соответственно ($p < 0,001$, рис. 7). Полученные данные, отражают нормализацию иммунных процессов и снижение системного воспалительного процесса под влиянием исследуемых соединений.

Циркулирующие иммунные комплексы

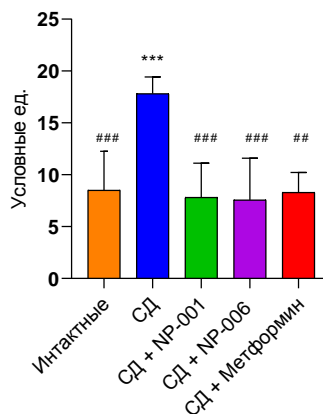


Рисунок 7. Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на концентрацию циркулирующих иммунных комплексов плазмы крови мышей DIO-C57BL/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. Среднее \pm SD; статистическая значимость см. рис.3.

Установлено, что соединения NP-001, NP-006 и метформин не влияют на уровень холестерина и ЛПНП, а также статистически незначимо снижают уровень триглицеридов крови мышей с СД2. Полученные результаты совпадают с обзорами исследований в литературе для активаторов глюкокиназы

[Tsumura Y., 2017; Nakamura A., 2008; Futamura M., 2012], тогда как для метформина описана нормализация липидного профиля крови [Hundal R. S., 2000].

Выявлено, что в группе животных, получавших вещества NP-001 и NP-006, наблюдалось незначимое повышение триглицеридов печени, что коррелирует с литературными данными, при этом нет подтверждения развития стеатоза печени в клинических испытаниях [Leighton B., 2005; Tsumura Y., 2017], а также не регистрировалось внешних патологических изменений печени при аутопсии. Можно отметить недостоверное увеличение содержанию гликогена печени для NP-006 ($1,85 \pm 0,05$ мМ против $1,52 \pm 0,05$ мМ в группе СД), в то время как соединение NP-001 и препарат сравнения метформин так же незначимо, но снижают концентрацию гликогена в печени ($1,21 \pm 0,49$ мМ и $1,23 \pm 0,46$ мМ соответственно против $1,52 \pm 0,05$ мМ в группе СД). Вышеописанные данные коррелируют со скоростью гликогенолиза в печени для группы, получавшей NP-006 ($2,91 \pm 0,68$ мкМ/мг белка×мин против $1,57 \pm 0,9$ мкМ/мг белка×мин в группе СД), рассчитанной по образованию конечного продукта гликолиза лактата.

При определении скорости гликолиза с применением субстратов глюкозо-6-фосфат, глюкозо-1-фосфат и фруктозо-1,6-дифосфат существенного статистически значимого влияния на образование конечного продукта в сравнении с контрольной группой сахарного диабета у всех трех опытных групп показано не было, что отражает отсутствие действия соединений NP-001, NP-006 и метформина на такие ключевые ферменты гликолиза как фосфоглюкоизомеразы, фосфоглюкомутаза и фосфофруктокиназа. Для оценки активности фермента, участвующего в утилизации глюкозы и выполняющего главную роль в механизме действия исследуемых субстанций, глюкокиназы, была оценена скорость гликолиза по субстрату «глюкоза» в концентрации 15 мМ и, непосредственно, изучение активации ГК в печени в группах животных, получавших вещества NP-001 и NP-006. Полученные результаты характеризуют оба соединения как потенциальные активаторы глюкокиназы (рис. 8), поскольку показана высокая способность увеличивать действие данного фермента, а для соединения NP-006 найдено статистически значимое влияние на соответствующий показатель ($12,1 \pm 3,36$ мЕД/мг белка) по отношению к группе СД ($6,79 \pm 2,64$ мЕД/мг белка) и интактному контролю ($5,98 \pm 2,92$ мЕД/мг белка), а отсутствие изменений в концентрации лактата в тесте изучения скорости гликолиза может указывать на повышенный синтез гликогена.

Активность глюкокиназы печени

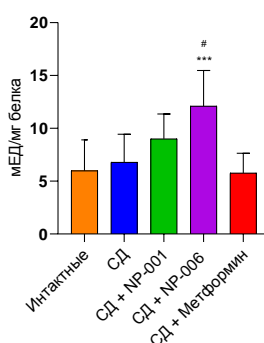


Рисунок 8. Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на активность глюкокиназы печени мышей DIO-C57BL/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. Среднее \pm SD; статистическая значимость см. рис.3.

Существенное снижение аланина в плазме крови под влиянием исследуемых соединений (NP-001= $0,09 \pm 0,02$ мг/мл и NP-006= $0,08 \pm 0,01$ мг/мл) по сравнению с СД ($0,16 \pm 0,05$ мг/мл, рис. 9, А) говорит

об отсутствии мышечного голодания, а глюкоза, превращаясь в пируват, участвует в общем пути катаболизма для оснащения клетки главным источником энергии – АТФ. Соединения NP-001 и NP-006 достоверно снижают уровень лактата в печени по отношению к интактному контролю (рис 9, В), а также обе субстанции и препарат сравнения статистически значимо уменьшают содержание аланина в печени при сопоставлении с животными группы сахарного диабета в 3,3, 8,0 и 6,4 раза соответственно (рис. 9, Б). При измерении концентрации лактата в плазме крови статистических различий между опытными группами и животными с СД найдено не было, так же, как и с интактным контролем. Все приведенные данные свидетельствует о низкой скорости образования глюкозы из данных субстратов – ингибировании глюконеогенеза.

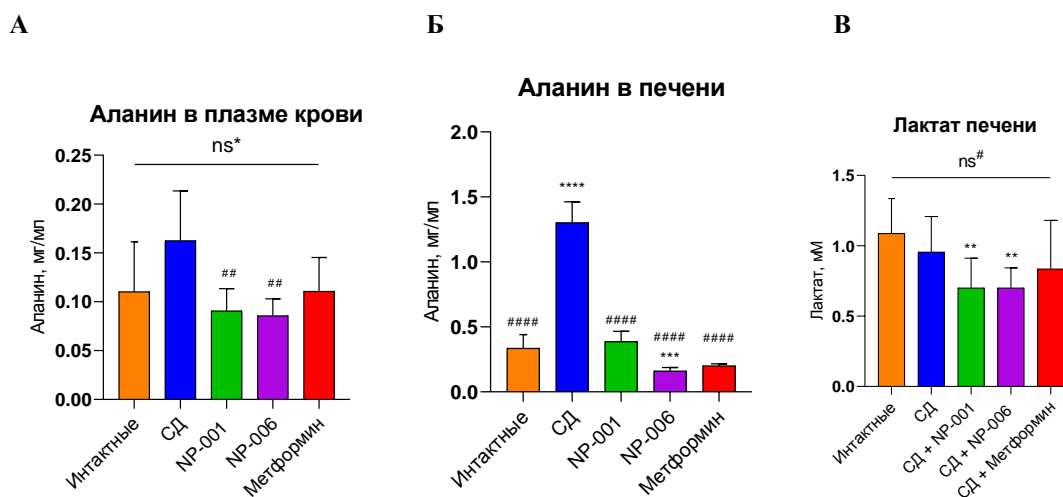


Рисунок 9. Влияние соединений NP-001 и NP-006 (300 мг/кг, в/б) и препарата сравнения метформина (150 мг/кг, в/б) на глюконеогенез мышей DIO-C57BL/6J с экспериментальным сахарным диабетом, вызванным высокожировой диетой, при хроническом введении. (А) - аланин в плазме крови; (Б) - аланин в печени; (В) - лактат печени. Среднее \pm SD; статистическая значимость см. рис.3.

Таким образом, оба исследуемых соединения проявляют фармакологические свойства, характерные для активаторов глюкокиназы. Выявлено соединение-лидер NP-006, обладающее следующими эффектами: нормализация показателей гликемии, снижение массы тела, улучшение чувствительности к инсулину, стимулирование гликолиза и синтеза гликогена, ингибирование глюконеогенеза, активирование глюкокиназы и увеличение ТГ печени, не вызывающего внешних патологических изменений печени при аутопсии. Можно также предположить, что выраженный антигипергликемический эффект вышеописанной субстанции, вероятно, был обусловлен повышенным поглощением и метаболизмом глюкозы печенью, и этот дополнительный вклад в гликемическую регуляцию мог снизить метаболический стресс в β -клетках поджелудочной железы и увеличить их пролиферацию.

В 9 главе исследовано влияние соединений NP-001 и NP-006 на механизмы развития поздних осложнений сахарного диабета. Поскольку известно, что пиридоксин обладает антиоксидантными свойствами [Шилов А. М., 2009], а изучаемые субстанции также являются производными пиридоксина, можно предположить наличие соответствующей активности у данных веществ. Вещество NP-006 в данном исследовании не проявило какой-либо антирадикальной активности, тогда как NP-001, его аналог с двумя атомами серы, проявил вышеуказанную активность в хемилюминесцентной методике окисления люминола, где показало эффект, превосходящий препарат сравнения тролокс почти в 4 раза, а также

выраженные антирадикальные свойства в тесте с ДФПГ (EC_{50} $78,32 \pm 5,71$ мкМ, $44,16 \pm 11,97$ мкМ для тролокса).

Выполнено исследование влияния субстанций NP-001 и NP-006 на образование конечных продуктов гликирования с бычьим сывороточным альбумином *in vitro*. Оба изучаемые вещества не показали выраженного антигликирующего действия в присутствии меди, а для NP-001 выявлено умеренное подавление образования КПП, не превышающее соединения сравнения амингуанидин (IC_{50} $1909,9$ мкМ против $765,0$ мкМ). Субстанция NP-006 не проявила какой-либо активности в данной модели. В то же время, в ходе изучения хелатирующих свойств наиболее активных соединений на модели медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты *in vitro* было найдено, что субстанции NP-001 и NP-006 превосходят вещество сравнения пиоглитазон в 14,9 и 12,2 раза, соответственно.

Исследование влияния субстанций NP-001 и NP-006 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную различными агонистами, показали, что оба соединения наиболее активны в модели, где в качестве индуктора выступал АДФ, при этом вещество NP-001 проявило выраженную антиагрегантную активность, превосходя по показателю IC_{50} ацетилсалициловую кислоту в 2 раза, что может оказывать положительное влияние на систему гемостаза при СД, поскольку тромбоциты при сахарном диабете характеризуются высокой склонностью к агрегации, что значительно увеличивает тромбогенный потенциал крови у больных с СД [Северина А.С., Шестакова М.В., 2004].

При изучении антитромбогенной активности в условиях стрептозоцин-индуцированного сахарного диабета на модели тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного 50-% раствором $FeCl_3$, наибольшей активностью обладало соединение NP-001, превосходя ацетилсалициловую кислоту в 1,7 раз. Такое значительное пролонгирование времени образования стабильного тромба в сонной артерии в условиях СД, возможно, позволит снизить осложнения со стороны системы гемостаза, а именно уменьшить тромбогенный потенциал крови и развитие эндотелиальной дисфункции. Таким образом, все вышеперечисленное позволяет предположить наличие у вещества NP-001 положительного влияния на отдаленные последствия сахарного диабета.

В десятой главе представлены результаты оценки токсикологических и фармакокинетических свойств наиболее активных веществ. Для этого, на последнем этапе, были рассчитаны показатели ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity) *in silico* для исследуемых веществ и препарата сравнения PF-04937319, определена цитотоксичность соединений NP-001 и NP-006 на перитонеальных макрофагах мышей и неонатальных фибробластах сердца крыс, а также изучена острая токсичность (LD_{50}) *in vivo*. По расчетным оценкам консенсусного прогноза ADMET характеристик соединений NP-001 и NP-006 было установлено, что данные субстанции превосходят препарат сравнения PF-04937319 по всем параметрам лекарственного соответствия, при этом средний индекс подобия обоих веществ составлял 0,73 (против 0,67 у PF-04937319). Однако, для изучаемых соединений прогнозировалось возможное неблагоприятное действие на печень, почки, нервную, иммунную системы и систему крови. В связи с этим, при планировании доклинических токсикологических исследований особое внимание следует уделить функциональной активности вышеперечисленных органов и систем. В исследованиях острой токсичности на крысах и мышях было определено, что субстанции NP-001 и NP-006 относятся к 4 классу малотоксичных соединений, что соответствует данным виртуального прогноза *in silico*. Обе изучаемые

субстанции не проявляют цитотоксических свойств на перитонеальных макрофагах мышей и неонатальных фибробластах крыс.

Глава 11 посвящена обсуждению полученных результатов. На основании литературных данных и собственных экспериментальных исследований можно заключить, что активаторы глюкокиназы являются перспективным классом соединений для создания препаратов для лечения СД2. По данным консенсусного компьютерного прогноза и направленного скрининга *in vitro*, из изученных 14 классов химических структур, был найден наиболее эффективный скаффолд в отношении ГК – производные биспиридина, а наиболее активными соединениями из этой группы по значениям EC_{50} были субстанции под шифром NP-001 и NP-006. При изучении влияния на углеводный обмен исследуемых веществ при однократном введении на интактных животных, статистически значимое улучшение толерантности к глюкозе наблюдалось у соединения под шифром NP-006 в дозах 300 и 500 мг/кг (в/б), при этом не наблюдалось развития гипогликемии. Также, для данного вещества отмечалось статистически достоверное увеличение инсулоцитов, сопоставимое с таковым по пролиферативной активности у соединения сравнения – активатора глюкокиназы PF-04937319, на модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета при однократном введении. Соединение NP-006 при 21-дневном введении мышам DIO-C57BL/6J проявляет спектр антидиабетических свойств, характерных для известных активаторов глюкокиназы, наиболее значимые из которых – выраженный антигипергликемический эффект, достоверное уменьшение массы тела и значительное снижение инсулинорезистентности. Однако, при исследовании влияния на механизмы развития отдаленных последствий СД наиболее активным было вещество NP-001, которое характеризовалось антирадикальными, хелатирующими, антиагрегантными и антитромбогенными свойствами. В заключительной части исследования было экспериментально определено, что субстанции NP-001 и NP-006 относятся к 4 классу малотоксичных соединений, что подтверждено данными виртуального прогноза *in silico*. Кроме того, по расчетным оценкам консенсусного прогноза ADMET характеристик был определен высокий средний индекс лекарственного подобия обоих веществ.

ВЫВОДЫ

1. На основании комплексного подхода – виртуального прогноза наличия активности в отношении глюкокиназы и тестирования *in vitro* – показано, что производные бифенила, бифенилоксида, diazepinobenzimidazole, дигидробензофурана, пептидомиметиков, пиридина (в том числе биспиридина), пиримидина, хиназолина, тиазолидиндиона, тиазолобензимидазола и триазолопиримидина являются перспективными химическими классами для поиска активаторов глюкокиназы.
2. По величине гипогликемического эффекта на интактных животных наибольшая активность отмечалась у производных биспиридина – соединения NP-001 и NP-006. Вещество NP-006 при внутрибрюшинном введении в дозах 300 и 500 мг/кг улучшает толерантность к глюкозе у интактных крыс сопоставимо с препаратом сравнения вилдаглиптином в дозе 10 мг/кг.
3. На модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета соединения NP-001 и NP-006 повышали пролиферативную активность эндокриноцитов островков Лангерганса поджелудочной железы мышей при однократном введении в дозе 50 мг/кг. Наиболее выраженный эффект выявлен для соединения NP-006, для которого отмечено увеличение удельного количества инсулин-позитивных клеток, сопоставимое с таковым у соединения сравнения – активатора глюкокиназы PF-04937319 ($43,2 \pm 22,6\%$ против $42,4 \pm 12,1\%$).

4. Соединение NP-006 в дозе 300 мг/кг обладает антидиабетической активностью на модели сахарного диабета 2 типа у мышей DIO-C57BL/6J при 3-х недельном внутрибрюшинном введении. Для вещества отмечалось значительное снижение уровня инсулина плазмы крови ($5,57 \pm 2,6$ мкЕд/мл против $16,3 \pm 2,38$ мкЕд/мл в группе СД), а также снижение инсулинорезистентности по показателю НОМА-IR ($1,36 \pm 0,64$ усл. ед против $4,93 \pm 1,9$ усл. ед в группе СД). Данное вещество обладало выраженной способностью улучшать толерантность к глюкозе, сопоставимой с таковой у препарата сравнения метформина в дозе 150 мг/кг внутрибрюшинно (площадь под кривой глюкоза-время $-27,9\%$ против $-31,3\%$). Кроме того, выявлено восстановление синтеза гликогена ($1,85 \pm 0,5$ мМ против $1,52 \pm 0,5$ мМ), ингибирование глюконеогенеза и активирование глюкокиназы печени ($12,1 \pm 3,36$ мЕД/мг белка против $6,79 \pm 2,64$ мЕД/мг белка) по отношению к группе СД.
5. При 21-дневном введении соединения NP-006 мышам линии DIO-C57BL/6J с экспериментальным СД2 показано снижение массы тела животных, которое осуществлялось, в основном, за счет ретроперитонеальных и мезентериальных висцеральных жировых отложений (в 1,6 и 1,5 раз соответственно по сравнению с группой сахарного диабета). В то же время отсутствовало влияние на уровень холестерина и ЛПНП при незначимом снижении содержания триглицеридов в плазме крови.
6. Для субстанции NP-006 отмечалось снижение признаков системного воспалительного процесса на фоне экспериментального сахарного диабета 2 типа. Было показано достоверное восстановление количества сегментоядерных нейтрофилов ($29,3 \pm 4,7\%$ против $51,8 \pm 5,8\%$) и лимфоцитов ($61,4 \pm 5,8\%$ против $38,25 \pm 3,8\%$) по отношению к группе с СД, статистически незначимое снижение уровня палочкоядерных нейтрофилов ($2,67 \pm 1,3\%$ против $4,25 \pm 1,25\%$ у группы с СД), а также выраженное уменьшение содержания циркулирующих иммунных комплексов в 2,4 раза по сравнению с группой СД.
7. В ходе исследования возможного влияния наиболее активных веществ NP-001 и NP-006 на механизмы развития отдаленных последствий СД было выявлено наличие антирадикальной активности для соединения NP-001 в хемилюминесцентной методике окисления люминола, где соединение показало эффект, превосходящий препарат сравнения тролокс (EC_{50} $0,20 \pm 0,001$ мкМ и $5,75 \pm 2,22$ мкМ, соответственно). У крыс с экспериментальным сахарным диабетом соединение NP-001 проявило выраженную антитромботическую активность, пролонгируя время окклюзии сосуда на $46,7 \pm 6,0\%$ и превосходя препарат сравнения в 1,7 раза. Соединение NP-006 оказалось низкоактивным в вышеуказанных тестах. При этом для обеих субстанций показано выраженное хелатирующее действие на модели медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты *in vitro*, где вещества превосходили вещество сравнения пиоглитазон в 14,9 и 12,2 раза, соответственно.
8. По расчетным оценкам консенсусного прогноза характеристик ADMET, соединения NP-001 и NP-006 превосходят препарат сравнения PF-04937319 по всем параметрам лекарственного подобия, при этом средний индекс подобия обоих веществ составлял 0,73 (против 0,67 у референсного соединения).
9. LD_{50} соединений NP-001 и NP-006 более 2000 мг/кг на мышах и крысах при пероральном введении. При внутрибрюшинном введении LD_{50} соединений NP-001 и NP-006 944 мг/кг и более 1000 мг/кг. Изучаемые соединения можно отнести к 4 классу токсичности, что согласуется с данными виртуального прогноза острой токсичности *in silico*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных Минобрнауки РФ:

1. Спасов А.А., Бабков Д.А., Мулеева Д.Р., **Майка О.Ю.** Моделирование сахарного диабета типа 2 у крыс на высокожировой диете с индукцией стрептозотоцином // **Вестник ВолгГМУ.** – 2017. – 1(61). – С.30-32.
2. А. А. Спасов, Ф. А. Халиуллин, Д. А. Бабков, Г. А. Тимирханова, В. А. Кузнецова, Л. В. Науменко, Д. Р. Мулеева, **О. Ю. Майка**, Т. Ю. Прохорова, Е. А. Стурова. Синтез и антидиабетическая активность производных тиазоло [2, 3-*f*] пурина и их аналогов // **Химико-фармацевтический журнал.** – 2017. – Т. 51. – №. 7. – С. 13-19.
3. Spasov A. A. Khaliullin, F. A., Babkov, D. A., Timirkhanova, G. A., Kuznetsova, V. A., Naumenko, L. V., **O. Yu. Maika** et al. Synthesis and antidiabetic activity of thiazolo [2, 3-*f*] purine derivatives and their analogs // **Pharmaceutical Chemistry Journal.** – 2017. – Vol. 51. – №. 7. – P. 533-539.
4. А. А. Спасов, О. Н. Жуковская, А. А. Бригадирова, А. С. Морковник, В. А. Анисимова, В. А. Сысоева, А. И. Ращенко, Р. А. Литвинов, **О. Ю. Майка**, Д. А. Бабков. Синтез и фармакологическая активность 2-(бифенил-4-ил)бензо[*d*]имидазо[1,2-*a*]имидазолов // **Известия академии наук, серия химическая.** – 2017. - № 10. - С. 1905-1912.
5. А. А. Spasov, O. N. Zhukovskaya, A. A. Brigadirova, H. S. A. Abbas, V. A. Anisimova, V. A. Sysoeva, A. I. Rashchenko, R. A. Litvinov, **O. Yu. Maika**, D. A. Babkov, and A. S. Morkovnik. Synthesis and pharmacological activity of 2-(biphenyl-4-yl) imidazo [1, 2-*a*] benzimidazoles // **Russian Chemical Bulletin.** – 2017. – Vol. 66. – №. 10. – P. 1905-1912.
6. Спасов А.А., Косолапов В.А., **Майка О.Ю.** Изучение глюкокиназной активности соединения MBX-2982 В ТЕСТ-СИСТЕМЕ *in vitro* // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2017. – Т.163 - №5. –С.657.
7. Dzyurkevich, Mikhail S., Denis A. Babkov, Nikita V. Shtyrlin, **Olga Yu. Maika**, Alfiya G. Iksanova, Pavel M. Vassiliev, and others, Pyridoxine dipharmacophore derivatives as potent glucokinase activators for the treatment of type 2 diabetes mellitus // **Scientific Reports.** – 2017. – Vol. 7. – №. 1. – P. 1-7.
8. Спасов, А. А., Косолапов, В. А., Бабков, Д. А., **Майка, О. Ю.** Активаторы глюкокиназы-перспективный класс противодиабетических средств // **Проблемы эндокринологии.** – 2018. – Т. 64. – №. 3.
9. Spasov A.A., Kosolapov V.A., Babkov D.A., **Maika O.Yu.** Effect of GRP119 receptor agonist, compound MBX-2982, on activity of human glucokinase // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine,** Vol. 163, No. 5, September 2017, P. 695-698.
10. Lozinskaya N. A., Babkov D. A., Zaryanova E. V., Bezsonova E. N., Efremov A. M., Tsymlyakov M. D., **Zakharyashcheva O. Yu** et al. Synthesis and biological evaluation of 3-substituted 2-oxindole derivatives as new glycogen synthase kinase 3 β inhibitors // **Bioorganic & Medicinal Chemistry.** – 2019. – Vol. 27. – №. 9. – P. 1804-1817.
11. Бабков Д. А., Соколова, Е. В., Бригадирова, А. А., **Захарьяшева, О. Ю.** Микропланшетный метод выявления ингибиторов фосфатазы РТР1В // **Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.** – 2019. – №. 2 (70).

12. Спасов А. А., Гейсман А. Н., Косолапов В. А., Бабков Д. А., Ращенко А. И., Бабкова В. А., **Захарьяшева О.Ю.**, Озеров, А. А. и др. Синтез и антигликирующая активность новых S-карбокисалкильных производных 2-тиоурацила // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2019. – Т. 53. – №. 7. – С. 18-22.

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций:

1. Spasov A. A., Babkov D. A., Prilepskaya D. R., **Zakharyashcheva O. Yu.** Type 2 Diabetes Mellitus in Rats on a High-Fat Diet with Streptozotocin Induction: Evaluation of the Model // **Journal of Clinical and Health Sciences**. – 2018. – Vol. 3. – №. 1. – P0. 20-26.
2. **Майка О.Ю.** «Поиск активаторов глюкокиназы для лечения сахарного диабета 2 типа *in silico* и *in vitro*». XXI региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области. – ВолгГМУ – Волгоград, 17.10.2016 - 19.10.2016.
3. Vassiliev P., Spasov A., Sysoeva V., Babkov D., **Mayka O.**, Yanaliev L., Vorfolomeeva V., Kochetkov A. Consensus *in silico* and *in vitro* search for antidiabetic compounds with combined antiglycation and targeted hypoglycemic activities // *MedChem Russia 2017: 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry: Abstract book (Kazan, Russia, September 28 - October 03, 2017)*. – Kazan: Kazan Federal University, 2017. – 280 p. – P. 91.
4. **Майка О.Ю.**, Прилепская Д.Р., Бабков Д.А., Штырлин Ю.Г., Дзюркевич М.С. «Новые активаторы глюкокиназы среди производных пиридина». V съезд фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств». – ФОЛИУМ – Ярославль, 14.05.2018 - 18.05.2018.
5. **Захарьяшева О.Ю.**, Сурин С.С., Бабков Д.А., к.х.н., Спасов А.А., Штырлин Ю.Г., Дзюркевич М.С. «Влияние активаторов глюкокиназы на процессы репарации инсулоцитов островков лангерганса поджелудочной железы мышей с экспериментальным сахарным диабетом I типа». VII международная научно-практическая конференция «Беликовские чтения», г. Пятигорск, 04.12.2018 - 05.12.2018.
6. Клочков В.Г., **Захарьяшева О.Ю.** «Изучение антиоксидантных свойств производных пиридоксина». 77-ая Научно-практическая конференция молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины». – ВолгГМУ – Волгоград, 24.04.2019 - 27.04.2019.
7. **Захарьяшева О.Ю.**, Клочков В.Г. «Антидиабетическая активность производных биспиридина NP-001 и NP-006 при хроническом введении мышам линии DIO-C57BL/6J.» XXIV Региональная конференция молодых ученых и исследователей Волгоградской области, г. Волгоград, декабрь 2019.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АСК – ацетилсалициловая кислота
АТФ – аденозинтрифосфат
ВЖД – высокожировая диета
Г6ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГКА – активаторы глюкокиназы

ДФПГ - 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил
МТТ-3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-
дифенилтетразолийбромид

КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза
КПГ – конечные продукты гликирования
ПМ - перитонеальные макрофаги
СТЗ– стрептозотцин
DIO – ожирение, индуцированное
высокожировой диетой
НОМА-IR - индекс инсулинорезистентности