

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования

«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ»

Министерства здравоохранения Российской Федерации  
Государственное бюджетное учреждение  
«ВОЛГОГРАДСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР»

На правах рукописи

**БРИГАДИРОВА АНАСТАСИЯ АНДРЕЕВНА**

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БИФЕНИЛА**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
академик РАН, З.д.н. РФ,  
профессор, доктор медицинских наук,  
Спасов Александр Алексеевич  
Научный консультант:  
доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Васильев Павел Михайлович

ВОЛГОГРАД – 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	6
ГЛАВА 1. ПРОИЗВОДНЫЕ БИФЕНИЛА – ПРИВИЛЕГИРОВАННЫЕ ПОДСТРУКТУРЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	11
1.1 Производные бифенила, их фармакологические свойства.....	14
1.1.1 Биологически активные свойства производных бифенила, сопряженных с бензимидазолом .....	22
1.1.2 Биологическая активность производных дифенилоксида .....	26
1.2 Заключение .....	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	29
2.1 Правила и рекомендации к проведению экспериментальных исследований .....	29
2.2 Перечень используемых реактивов и веществ.....	29
2.3 Список используемого оборудования и программного обеспечения.....	37
2.4 Экспериментальные животные.....	37
2.5 Скрининговые модели и методы для изучения фармакологических свойств новых производных бифенила .....	38
2.6 Метод изучения острой токсичности активных соединений .....	46
2.7 Методы оценки зависимости фармакологической активности изучаемых соединений от их химической структуры .....	47
2.8 Методы компьютерной обработки информации .....	47
2.9 Методы изучения механизмов антиоксидантного действия наиболее активных соединений на моделях <i>in vitro</i> .....	52
2.10 Исследование нефрозащитного действия наиболее активных соединений на модели экспериментального стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс .....	54
2.11. Исследование гипогликемического действия наиболее активных соединений при введении интактным животным .....	56
2.12 Исследование антидиабетогенного эффекта наиболее активных соединений на экспериментальной модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс, находящихся на высокожировой диете .....	57
2.13 Методы статистической обработки.....	59
ГЛАВА 3. ПОИСК НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СРЕДИ ЛИНКЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БИФЕНИЛА И НЕКОНДЕНСИРОВАННЫХ АЗОЛОВ.....	60
3.1 Изучение антиангиотензинового (АТ <sub>1</sub> ) действия соединений .....	60
3.2 Влияние соединений на процесс АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов .....	60
3.3 Изучение антигликирующей активности соединений .....	61

3.4 Изучение регулирующей активности соединений .....	61
3.5 Действие производных бифенила на аскорбат-зависимое перекисное окисление липидов .....	62
3.6 Исследование влияния соединений на активность дипептидилпептидазы-4 .....	62
3.7 Действие веществ на активность гликогенфосфорилазы .....	62
3.8 Влияние соединений на активность протеинтирозинфосфатазы 1B .....	63
3.9 Изучение влияния соединений на активность АМФ-активируемой протеинкиназы .....	63
3.10 Действие соединений на активность глюкокиназы .....	64
3.11 Анализ взаимосвязи между структурой и фармакологической активностью изучаемых соединений .....	64
3.12 Определение показателя $EC_{50}$ наиболее активных соединений .....	65
3.13 Заключение .....	66
<b>ГЛАВА 4. ПОИСК НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СРЕДИ ЛИНКЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БИФЕНИЛА, СОПРЯЖЕННЫХ С КОНДЕНСИРОВАННЫМИ АЗОЛАМИ .....</b>	<b>67</b>
4.1 Изучение антиангиотензинового ( $AT_1$ ) действия в ряду производных бифенила, содержащих подструктуру бензимидазола .....	67
4.2 Влияние соединений на процесс АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов .....	68
4.3 Изучение антигликирующей активности соединений .....	69
4.4. Изучение регулирующей активности соединений .....	69
4.5. Действие изучаемых веществ на аскорбат-зависимое перекисное окисление липидов .....	70
4.6 Изучение активности в отношении дипептидилпептидазы-4 среди производных бифенила, содержащих подструктуру бензимидазола .....	71
4.7 Действие веществ на активность гликогенфосфорилазы .....	72
4.8 Влияние соединений на активность протеинтирозинфосфатазы 1B .....	72
4.9 Изучение действия веществ на АМФ-активируемую протеинкиназу .....	73
4.10 Действие соединений на активность глюкокиназы .....	74
4.11 Анализ взаимосвязи между структурой и фармакологической активностью изучаемых соединений .....	74
4.12 Определение показателей $EC_{50}$ , $IC_{50}$ и $LD_{50}$ наиболее активных соединений .....	76
4.13 Изучение возможных механизмов действия соединений DF-1 и DF-6 на свободно- радикальные процессы .....	80
4.14 Заключение .....	82
<b>ГЛАВА 5. ПОИСК НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СРЕДИ ПРОИЗВОДНЫХ ДИФЕНИЛОКСИДА .....</b>	<b>84</b>
5.1 Изучение антиангиотензинового ( $AT_1$ ) действия в ряду производных дифенилоксида .....	84

5.2 Влияние производных дифенилоксида на процесс АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов .....	85
5.3 Изучение антигликирующей активности соединений .....	85
5.4 Исследование регулирующей активности соединений.....	86
5.5 Действие производных дифенилоксида на аскорбат-зависимое перекисное окисление липидов .....	87
5.6 Влияние соединений на активность дипептидилпептидазы-4 .....	87
5.7 Действие веществ на активность гликогенфосфорилазы .....	87
5.8 Влияние производных дифенилоксида на активность протеинтирозинфосфатазы 1В.....	88
5.9 Изучение влияния соединений на активность АМФ-активируемой протеинкиназы.....	89
5.10 Действие соединений на активность глюкокиназы.....	89
5.11 Анализ взаимосвязи между структурой и фармакологической активностью изучаемых соединений .....	89
5.12 Заключение.....	90
<b>ГЛАВА 6. АНАЛИЗ <i>IN SILICO</i> РЕЗУЛЬТАТОВ СКРИНИНГОВЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ. ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНОСТИ КЛАССОВ ИЗУЧЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ .....</b>	<b>91</b>
6.1 Анализ общих ландшафтов фармакологической активности классов изучаемых соединений .....	91
6.2 Анализ графиков медианных и супремальных оценок классов изучаемых соединений ....	92
6.3 Результаты дисперсионного анализа и множественных сравнений. Оценка привилегированности классов изучаемых веществ .....	94
6.4 Анализ показателей антидиабетического функционала сетевого профиля классов изучаемых соединений. Выбор соединений-лидеров для исследований <i>in vivo</i> .....	98
6.5 Заключение.....	100
<b>ГЛАВА 7. ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НАИБОЛЕЕ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ИССЛЕДОВАНИЯХ <i>IN VIVO</i> .....</b>	<b>101</b>
7.1 Исследование нефрозащитного действия соединения DF-5 в условиях экспериментальной диабетической нефропатии.....	101
7.2. Изучение гипогликемической активности соединения AZH-141 при введении интактным крысам-самцам.....	116
7.3 Изучение антидиабетической активности соединения AZH-141 на модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс, находящихся на высокожировой диете.....	117
7.4 Заключение.....	122
<b>ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....</b>	<b>124</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>142</b>

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	144
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	145
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	147
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	167

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Внедрение и широкое использование технологии высокопроизводительного скрининга в современной фармакологии позволило интенсифицировать процесс изучения соединений на разнообразные виды биологической активности. Однако данный подход не привел к массовому увеличению числа соединений-кандидатов, успешно прошедших доклинические и клинические исследования [Ward D. J., 2013; Scannell J. W., 2012]. В связи с этим в медицинской химии продолжают развиваться рациональные подходы к разработке перспективных фармакологических агентов, позволяющие на ранних исследовательских этапах снизить риски и материальные затраты. Одним из таких направлений является концепция привилегированных структур или подструктур (*privileged structures (англ.)*) [DeSimone R. W., 2004; Bywater R. P., 2006; Duarte C. D., 2007]. Сочетание привилегированных структур при разработке соединений-лидеров позволяет увеличить вероятность нахождения новых высокоактивных молекул, влияющих на разные биомишени.

В связи с этим многие производные бифенила и бензимидазола, как одни из представителей привилегированных структур [Horton D. A., 2003; Bondensgaard K., 2004; DeSimone R. W., 2004; Costantino L., 2006; Duarte C. D., 2007; Kamal A., 2006a; Kamal A., 2006b], могут представлять интерес как важные синтетические объекты и потенциальные биологически активные вещества, для которых характерен спектр различных фармакологических свойств [Severinsen R., 2008; Bansal Y., 2012; Jain Z. J., 2013].

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

### Степень разработанности

В настоящее время одной из привилегированных подструктур является бифенил для которого характерны такие виды фармакологической активности, как антигипертензивная, антимикробная, блокирующая активность в отношении кальциевых каналов, противовоспалительная, антидиабетическая, диуретическая, антиагрегантная, а также ряд психотропных эффектов [Severinsen R., 2008; Jain Z. J., 2013].

В то же время для производных бензимидазола также отмечается широкий спектр фармакологических эффектов. Так, на кафедре фармакологии ВолгГМУ длительное время проводится изучение биологической активности производных бензимидазола. Получены значительное количество данных о гемореологической, антиагрегантной, антиаритмической,

антиоксидантной [Анисимова В. А., 2010], антагонистической в отношении серотониновых рецепторов второго А (5-НТ<sub>2А</sub>) [Анисимова В. А., 2012] и третьего (5-НТ<sub>3</sub>) типов [Спасов А. А., 2013б] активности. Также для них характерны иные виды свойств, такие как антидиабетические, противовоспалительные, антимикробные, противовирусные, противоопухолевые, психотропные и другие [Bansal Y., 2012; Narasimhan B., 2012; Keri R. S., 2015].

На сегодняшний день разработаны и успешно применяются соединения, содержащие комбинацию указанных привилегированных подструктур, при этом наиболее востребованными являются лекарственные средства с выраженным антагонистическим действием по отношению к ангиотензиновым АТ<sub>1</sub>-рецепторам (кандесартан, валсартан и телмисартан) [Фомин В. В., 2009].

В ряде работ подтверждается возможность АТ<sub>1</sub>-антагонистов оказывать положительное влияние на метаболические процессы, кроме того, отмечаются их нейрозащитные и противовоспалительные свойства в дополнение к основному антигипертензивному эффекту [Saavedra J. M., 2011; Wright J. W., 2013; Wang J., 2014]. Для некоторых из них также описано сродство к PPAR $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (англ.)*), стимуляция которых играет немаловажную роль в регуляции метаболизма глюкозы и способствует повышению чувствительности периферических тканей к инсулину [Taguchi I., 2013; Zidek V., 2013].

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

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

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

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

## Научная новизна

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

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

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

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

Установлено, что соединение AZH-141 (гидробромид 1-(2,2-диметиламиноэтил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин) обладает высокой РТР1В-ингибирующей активностью и умеренной способностью активировать АМПК, что соответствует эффективности веществ сравнения NSC-87877 и AICAR. Впервые показаны антигипергликемический эффект соединения AZH-141 и его способность снижать массу жировой ткани на модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс, находящихся на высокожировой диете, сопоставимые с аналогичными эффектами препарата сравнения метформина.

## Теоретическая и практическая значимость работы

Выявленная в ходе проведенного исследования большая вариабельность в аспекте проявления различных видов фармакологической активности гибридных линкерных структур,



содержащих бифенил и конденсированные азолы, может быть использована при целенаправленном поиске и синтезе новых высокоактивных веществ. Данный подход построения сетевой фармакологической модели может быть рекомендован для прогнозирования и отбора перспективных соединений для исследования *in vivo* с другими видами биологической активности.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. У производных, содержащих комбинацию бифенильного и конденсированных азольных компонентов, а именно 1-диалкиламиноалкил-3-бифенил-2-иминобензимидазолинов, 9-замещенных 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов и 9-замещенных 2,3-дигидроимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов выявлены высокая антиоксидантная, регликирующая, антиагрегантная, РТР1В-ингибирующая и АМПК-активирующая активность.
2. Гибридные линкерные структуры, содержащие бифенил и конденсированные азолы, характеризуются более широким спектром фармакологической активности и большим числом соединений, активность которых превышает аналогичный эффект препарата сравнения, чем дифенилоксиды и молекулы, содержащие бифенильный и неконденсированные азольные компоненты.
3. Соединение DF-5 (9-бензил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол) обладает свойствами высокоактивного разрывателя поперечных сшивок гликированных белков и оказывает выраженное нефрозащитное действие на модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета.
4. Вещество AZH-141 (гидробромид 1-(2,2-диметиламиноэтил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин) проявляет свойства ингибитора РТР1В и активатора АМПК, оказывает антигипергликемический эффект на модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у животных, находящихся на высокожировой диете.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

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

Основные положения диссертационной работы докладывались, обсуждались и представлялись на 71-, 73-, 74- и 75-й открытых научно-практических конференциях молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 2013-2017 гг.; XIX и XX Региональных конференциях молодых исследователей Волгоградской области, Волгоград, 2014-2015 гг.; IV Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 2014 г.; Международной научно-практической конференции «Белорусские лекарства», Республика Беларусь, Минск, 2014 г.; VII международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», Санкт-Петербург, 2014 г.; I научно-практической конференции с международным участием «Деадаптация различного генеза и пути ее фармакологической коррекции», Пятигорск, 2015 г.; XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии, Екатеринбург, 2016 г.

### **Публикации**

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

### **Структура и объем работы**

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

## ГЛАВА 1. ПРОИЗВОДНЫЕ БИФЕНИЛА – ПРИВИЛЕГИРОВАННЫЕ ПОДСТРУКТУРЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В настоящее время существенные финансовые затраты и исследовательские усилия направляются на увеличение эффективности поиска биологически активных веществ для создания лекарственных средств. Одним из подходов, позволяющих увеличить вероятность получения целевой биологической активности еще на стадии химического синтеза по сравнению с эмпирическим поиском, является *концепция привилегированных структур или подструктур (privileged structures (англ.))*, которая была сформулирована на основе наблюдений о том, что определенные химические структурные фрагменты встречаются в лекарственных средствах и соединениях-лидерах значительно чаще, чем другие [Duarte C. D., 2007].

На основе привилегированных подструктур, представляющих собой минимальные структурные субъединицы, могут быть созданы лиганды, которые будут способны эффективно взаимодействовать с более чем одной разновидностью биологических мишеней.

Термин «привилегированная структура» получил широкое распространение в научной литературе с тех пор как был впервые использован Эвансом в 1988 г. при описании разработки бензодиазепиновых антагонистов холецистокининовых рецепторов подтипа А. Он обнаружил, что соединения класса бензодиазепинов способны взаимодействовать не только с бензодиазепиновыми рецепторами центральной нервной системы, но и с холецистокининовыми рецепторами, и определил привилегированные структуры как «структурные субъединицы, обладающие определенными сходными особенностями строения, которые обеспечивают их способность взаимодействовать с несколькими различными рецепторами», и «продуманная модификация таких структур может стать жизнеспособной альтернативой при поиске новых рецепторных агонистов и антагонистов» [Evans B. E., 1988].

Принятие данной концепции оказало значительное влияние на развитие современной медицинской химии, о чем свидетельствует рост количества упоминаний словосочетания «privileged structures», ежегодно начиная с 1988 года, согласно поисковым запросам в международных библиографических базах данных (Web of Science, Scopus, ScienceDirect, Chemical Abstracts Service) [Duarte C. D., 2007].

Согласно современному определению Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC) привилегированные структуры являются «субструктурными элементами, придающими желаемые (зачастую подобные лекарственным) свойства соединениям, содержащим эти элементы. Они часто состоят из полужесткого молекулярного

каркаса, способного взаимодействовать с множественными гидрофобными остатками белкового кармана, не подвергаясь при этом гидрофобному коллапсу» [Buckle D. R., 2013].

Многочисленные известные привилегированные подструктуры с точки зрения медицинской химии могут служить основой для синтеза набора соединений (библиотеки), имеющих общий молекулярный каркас, и эффективно взаимодействующих с биологическими мишенями из нескольких семейств [DeSimone R. W., 2004; Bywater R. P., 2006; Severinsen R., 2008]. Причиной особых свойств таких фрагментов являются их пространственные и электронные характеристики, благоприятствующие связыванию с разнообразными мишенями и тем самым их мультитаргетному действию и широкому спектру фармакологической активности [Kim J., 2014]. Фиксацию молекул обеспечивает связывание базовой структуры соединения с консервативным привилегированным подкарманом, а специфический эффект определяется взаимодействием вариативной части химической структуры со «специфическим» карманом сайта связывания [Bywater R. P., 2006]. За счет этого производные привилегированных молекул могут проявлять несколько видов фармакологической активности, в зависимости от вида заместителей, вводимых в базовую структуру. Таким образом, понятие привилегированной подструктуры также используют в контексте минимальной субструктуры, способной связываться с несколькими типами рецепторов [Barelher S., 2011].

Одними из примеров привилегированных подструктур в медицинской химии являются фенилзамещенные моноциклы (бифенилы, производные дифенилметана, 1,4-дигидропиридины, и др.), и гетероциклические системы (пурины, бензодиазепины, бензопираны, кумарины и пиранокумарины, хиноксалины, хиназолины, индолы, бензимидазолы, бензофураны, бензотиофены и др.) [Patchett A. A., 2000; DeSimone R. W., 2004; Bywater R. P., 2006; Costantino L., 2006; Klekota J., 2008; Welsch M. E., 2010; Polanski J., 2012].

Среди первых привилегированных подструктур, которые стали молекулярной основой агонистов и антагонистов трансмембранных рецепторов, сопряженных с G-белком (*G-protein-coupled receptors (GPCRs)* (англ.)), были идентифицированы бензодиазепин, бензимидазол, бифенил, спиропиперидин (рис. 1.1) [Patchett A. A., 2000]. GPCRs составляют более четверти от общего количества 324-х биологических мишеней для 1357-ми известных уникальных лекарственных средств [Overington J. P., 2006].

Бифенильное ядро представляет интерес как важный синтетический объект медицинской химии для производных которого характерен целый ряд фармакологических свойств [Costantino L., 2006; Severinsen R., 2008; Jain Z. J., 2013]. Оно входит в состав многих биологически активных соединений для которых характерны следующие виды фармакологической активности: антигипертензивная, антидиабетическая, диуретическая, противоопухолевая, противомикробная, антиагрегантная, антиоксидантная, антипсихотическая, анксиолитическая

[Severinsen R., 2008; Jain Z. J., 2013]. На основе производных бифенила созданы такие антигипертензивные лекарственные препараты, как лозартан, кандесартан, телмисартан, ирбесартан, валсартан, азилсартан, олмесартан [Aulakh G. K., 2007; Naik P., 2010; Mavromoustakos T., 2013], нестероидный противовоспалительный препарат флурбипрофен [Brogden R. N., 1979].

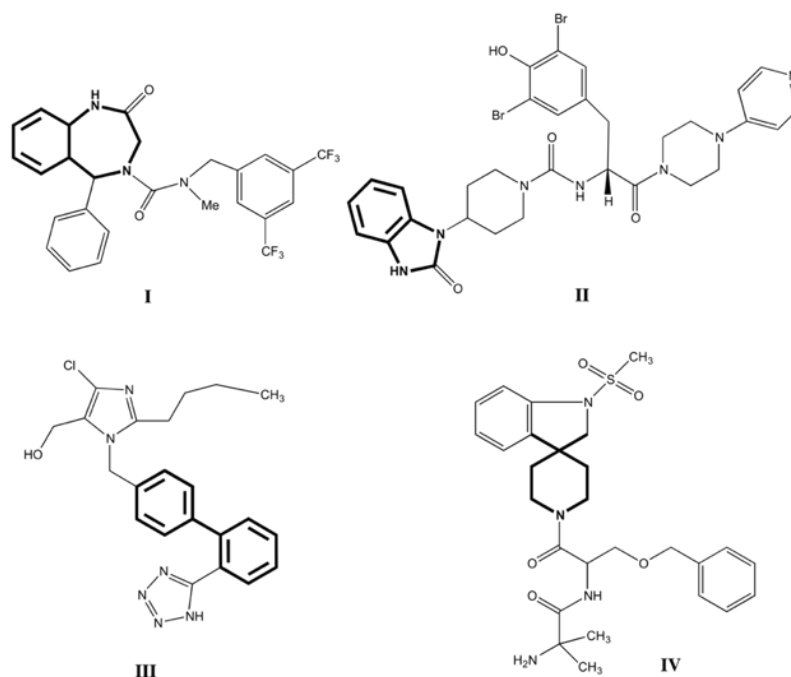


Рисунок 1.1. Структурные формулы лигандов GPCRs, содержащих привилегированные подструктуры бензодиазепина (I), бензимидазола (II), бифенила (III), спиропиперидина (IV) [Patchett A. A., 2000]. Привилегированные подструктуры выделены жирными линиями и шрифтом.

В настоящее время одним из современных направлений в медицинской химии при поиске и оптимизации новых соединений-кандидатов с высокой биологической активностью является создание гибридных комплексов с конденсированными и неконденсированными азолами и получение на их основе более эффективных и полифункциональных веществ.

Так, для проявления разнообразных биологических эффектов производными бифенила желательным является наличие в молекуле адекватной азотсодержащей гетероциклической системы. Например, в структуре антигипертензивных препаратов из группы «сартанов» в качестве гетероцикла могут содержаться имидазол, бензимидазол, пиримидин [Aulakh G. K., 2007; Grange R. L., 2008], что способствует их высокой эффективности и, в случае отдельных препаратов (телмисартан), мультитаргетности [Goyal S. N., 2011].

Поэтому перспективным является исследование гибридных комбинаций бифенила или его биоизостерных аналогов с иными привилегированными и непривилегированными каркасами.

## 1.1 Производные бифенила, их фармакологические свойства

### Антигипертензивная активность

Ренин-ангиотензиновая система (РАС) является гормональным каскадом, который играет центральную роль в поддержании сердечно-сосудистого гомеостаза с помощью регуляции сосудистого тона и электролитного баланса [Hunyady L., 2006]. Главным компонентом в большинстве биологических действий РАС выступает АТ II [Mehta P. K., 2007]. Он играет ключевую роль в регуляции артериального давления [Touyz R. M., 2004] и, кроме того, является центральным компонентом многих патологических состояний сердечно-сосудистой системы [Dasgupta S., 2011]. Действие АТ II осуществляется специфической гетерогенной популяцией рецепторов [Dihn D. T., 2001], из которых наиболее подробно изучены два типа – АТ<sub>1</sub> и АТ<sub>2</sub>. АТ<sub>1</sub>-рецепторы участвуют в осуществлении большинства известных физиологических эффектов АТ II таких, как вазоконстрикция и продукция альдостерона [De Gasparo M., 2000].

В клинической практике для устранения негативных эффектов АТ II широко применяется группа антигипертензивных препаратов на основе непептидных антагонистов АТ<sub>1</sub>-рецепторов [Шилов А. М., 2011]. Основной для данного класса препаратов гипотензивный эффект обеспечивают имидазольное кольцо или бифенил-тетразольная группа, составляющие структуру практически всех АТ<sub>1</sub>-антагонистов (рис. 1.2) [Захарова Н. В., 2011].

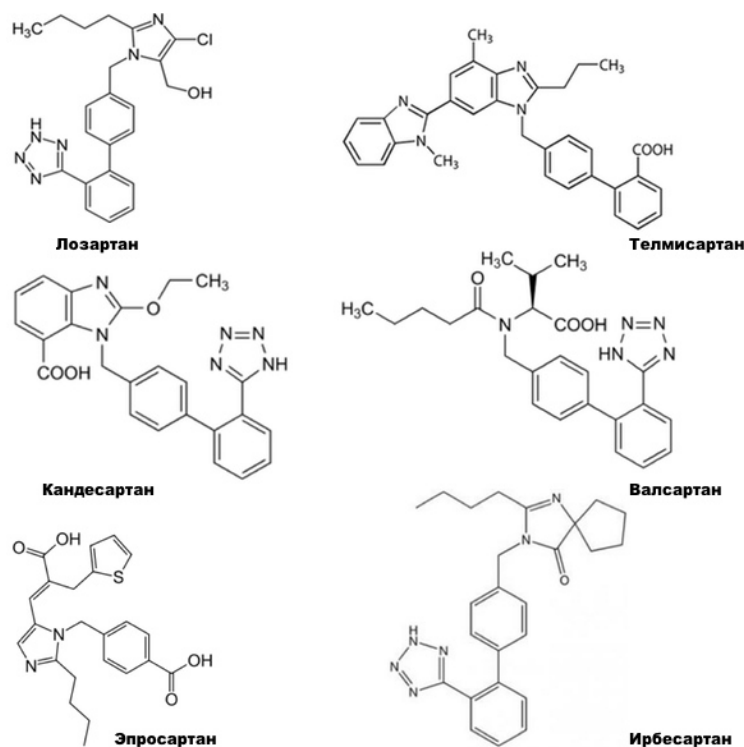


Рисунок 1.2. Химические структуры некоторых АТ<sub>1</sub>-антагонистов.

На основе молекулярной структуры первого непептидного селективного АТ<sub>1</sub>-антагониста – лозартана и его метаболита EXP3174 синтезирован целый ряд селективных блокаторов АТ<sub>1</sub>-

рецепторов (валсартан, ирбесартан, эпросартан, телмисартан, кандесартан и олмесартан) [Ferrario С. М., 2006]. Исследования отношений структура-активность (*Structure-Activity Relationship (SAR) (англ.)*) производных лозартана и EXP3174 с замещенным имидазольным кольцом проиллюстрировали ключевые элементы, которые требуются для проектирования мощных блокаторов АТ<sub>1</sub>-рецепторов. Липофильные заместители, такие как бифенилметильный фрагмент, замещенный кислотной группой (тетразольная группа, CO<sub>2</sub>H) в N<sup>1</sup> положении гетероциклического кольца и линейная алкильная группа, обеспечивающая взаимодействие с гидрофобным карманом рецептора, необходимы для потенциальной антагонистической активности [Agelis G., 2013]. По данным [Jezko P., 2012] лучшая фармакофорная модель АТ<sub>1</sub>-антагониста состоит из шести участков (ADHNRR): акцептор водородной связи (A), донор водородной связи (D), гидрофобная группа (H), группа несущая отрицательный заряд (N) и два ароматических кольца (R).

Несколько новых непептидных АТ<sub>1</sub>-блокаторов, которые содержат подструктуру бифенила, находятся на стадии доклинического изучения. Среди них – пратосартан (КТЗ-671), фонсартан (HR 720) [Chopra Н. К., 2013], L-158,809 [Aulakh G. К., 2007] и BR-A-657 [Chi Y. Н., 2013] (рис. 1.3).

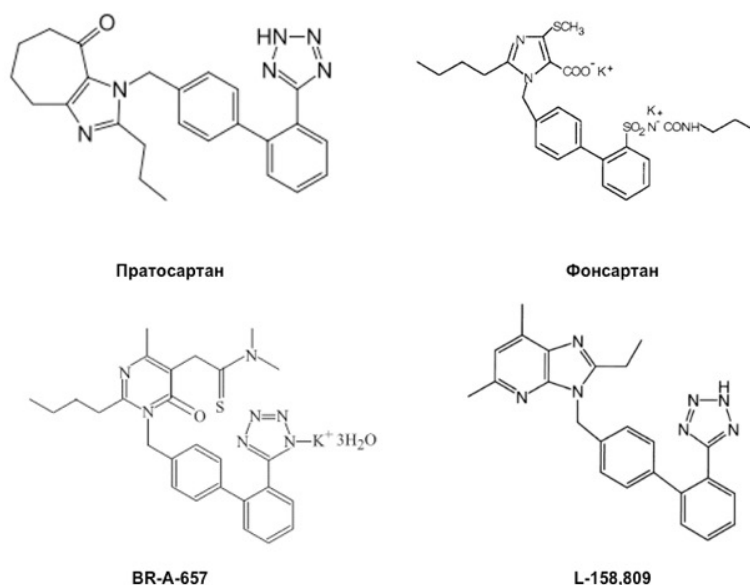


Рисунок 1.3. Химические структуры новых АТ<sub>1</sub>-антагонистов, находящихся на стадии доклинического изучения.

В настоящее время интерес для разработки представляют также агонисты ангиотензиновых АТ<sub>2</sub>-рецепторов, поскольку стимуляция данного подтипа рецепторов имеет потенциальную терапевтическую эффективность при заболеваниях почек, инсульте, болезни Альцгеймера и инфаркте миокарда. При активации АТ<sub>2</sub>-рецепторов не наблюдается мощного

антигипертензивного действия, как при блокаде  $AT_1$ -рецепторов, но при этом отмечается защитный эффект от индуцированного гипертензией поражений органов-мишеней [Steckelings U. M., 2012]. Среди серии производных бифенилсульфонамида были найдены соединения с высокой  $AT_2$ -агонистической активностью – **14f** ( $IC_{50} = 0,4$  нмоль/л) и **15e** ( $IC_{50} = 5,0$  нмоль/л) (рис. 1.4). В исследованиях *in vivo* на спонтанно-гипертензивных крысах у **14f** был выявлен выраженный гипотензивный эффект, превосходящий эффект препарата сравнения лозартана. Кроме того, он не влиял на частоту сердечных сокращений [Liu J., 2013].

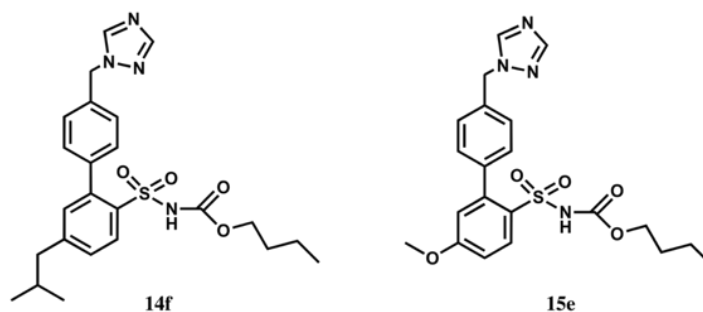


Рисунок 1.4. Химические структуры новых  $AT_2$ -агонистов, находящихся на стадии доклинического изучения [Liu J., 2013].

Для ряда производных бифенилсульфонамида также было показано средство к эндотелиновым рецепторам типа А ( $ET_A$ ) [Murugesan N., 2003]. Пептид эндотелин-1 (ET-1) является мощным вазоконстриктором, продуцируемым сосудистым эндотелием, и обладает способностью индуцировать фиброз, клеточную пролиферацию, гипертрофию и ремоделирование миокарда, а также проявляет провоспалительную активность [Agapitov A., 2002].

Эти эффекты опосредуются связыванием ET-1 с рецепторами  $ET_A$  и  $ET_B$ , расположенными в эндотелии и гладкомышечных клетках сосудов [Bohm F., 2007]. Концентрация ET-1 в тканях и плазме крови повышается при некоторых сердечно-сосудистых заболеваниях и патологиях соединительной ткани, в т. ч. при легочной артериальной гипертензии, острой и хронической сердечной недостаточности, ишемии миокарда, артериальной гипертензии и атеросклерозе, что позволяет предположить участие ET-1 в патогенезе и развитии этих заболеваний [Beghetti M., 2005; Pernow J., 2012; Chester A. H., 2014]. Антагонисты рецепторов ET-1 являются лекарственными средствами, которые способны ограничивать как вазоконстрикторное, так и пролиферативное влияние эндотелина, и таким образом улучшать клиническое течение заболеваний.

Замещённый бифенил, селективный антагонист  $ET_A$ -рецепторов, N-[[2'-[[[(4,5-диметил-3-изоксазол)амино]сульфонил]-4-(2-оксазолил)]1,1'-бифенил]-2-ил]метил]-N,3,3-триметилбутанамид (Эдонентан, BMS-207940) рассматривался как кандидат для проведения клинических испытаний в качестве лекарственного средства для терапии хронической сердечной



недостаточности и легочной гипертензии. BMS-207940 является чрезвычайно сильным ( $ET_A$ ,  $K_i = 10$  пмоль/л) и селективным (в 80000 раз большая аффинность к  $ET_A$ , чем к  $ET_B$ ) антагонистом эндотелиновых рецепторов. Также он в 150 раз сильнее и в 6 раз более селективнее к  $ET_A$ -рецепторам, чем другой антагонист  $ET_A$ -рецепторов из ряда производных бифенилсульфонамида – BMS-193884 [Murugesan N., 2003].

#### Антидиабетическая активность

Сахарный диабет (СД) 2 типа занимает одно из первых мест в мире среди наиболее распространенных хронических заболеваний [Donath M. Y., 2014]. При СД 2 типа наблюдается стойкая резистентность периферических тканей к эндогенному инсулину, за которой часто следует компенсаторное усиление продукции инсулина  $\beta$ -клетками, что приводит в дальнейшем к истощению их секреторного потенциала [Спасов А. А., 2013а].

Современная стратегия терапии СД 2 типа направлена на поддержание оптимального уровня глюкозы в крови с помощью улучшения продукции инсулина и повышения чувствительности клеток к нему [Jain S., 2010; American Diabetes Association, 2014].

Ингибирование фермента РТР1В является перспективным направлением поиска новых лекарственных средств в терапии СД 2 типа, действие которых направлено на преодоление инсулинорезистентности [Johnson T. O., 2002]. РТР1В-ингибиторы, предположительно, улучшают гомеостаз глюкозы без индукции гипогликемии и путем модуляции сигнального каскада инсулинового рецептора улучшают чувствительность периферических тканей к нему [Thareja S., 2012; Tiganis T., 2013].

Среди ингибиторов данного фермента выделяют серию производных замещенного бифенила, непосредственно связанного с гетероциклическим кольцом бензофурана или бензотиофена. При этом в исследованиях с рекомбинантной человеческой РТР1В у наиболее активных ингибиторов уровень показателя  $IC_{50}$  оказался в диапазоне 20-50 нмоль/л. Наиболее сильный эффект *in vivo* был показан для трометаминовой соли (2S)-2-[4'-(2-бензил-бензофуран-3-ил)-бифенил-4-илокси]-3-фенил-пропионовой кислоты; соединение эффективно снижало уровень глюкозы в плазме крови в дозе 25 мг/кг (в/ж) и 1 мг/кг (в/б) [Malamas M. S., 2000]. При изучении серии производных бифенилэтанона на аллоксановой модели СД у мышей *in vivo* был обнаружен выраженный гипогликемический эффект, который, предположительно, связан с РТР1В-ингибирующими свойствами данных соединений [Sachan N., 2009]. Другое производное бифенила – 6-бифенил-3-формилхромон – является самым сильным селективным ингибитором РТР1В в серии производных формилхромона, кроме того, была обнаружена его высокая или средняя селективность к другим протеинтирозинфосфатазам, например, РТРРФ и ТС-РТР [Shim Y. S., 2003].

При активации АМРК, которая относится к серин-треониновым киназам и весьма чувствительна к энергетическому запасу клетки, также выявляются инсулин-сенситизирующие эффекты, что делает ее потенциальной мишенью в терапии СД 2 типа. Благодаря активации АМРК стимулируется захват глюкозы клетками скелетных мышц, окисление жирных кислот в жировой ткани и уменьшается продукция глюкозы в печени [Coughlan K.A., 2014].

К активаторам АМРК относят 6,7-дигидро-4-гидрокси-3-(2'-гидрокси[1,1'-бифенил]-4-ил)-6-оксо-тиено[2,3-b]пиридин-5-карбонитрил (А-769662) (рис. 1.5), который стал первым разработанным прямым активатором АМРК ( $EC_{50} = 0,8$  мкмоль/л). А-769662 подавляло синтез жирных кислот в первичной культуре гепатоцитов крыс *in vitro* ( $IC_{50} = 3,2$  мкмоль/л), а терапия данным веществом у мышей с генетической моделью ожирения линии ob/ob приводила к снижению массы тела животных и нормализации метаболизма липидов и глюкозы [Cool B., 2006]. Однако А-769662 не рассматривалось в качестве кандидата для клинических исследований из-за его низкой абсорбции при пероральном приеме и нежелательных, не опосредованных влиянием на АМРК, биологических эффектах [Moreno D., 2008].

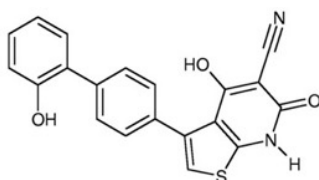


Рисунок 1.5. Химическая структура обратимого аллостерического модулятора АМРК с высокой активностью – А-769662 [Cool B., 2006].

Среди активаторов АМРК выделяют ряд производных гидроксибифенила, разработанных компанией Mercury Therapeutics Inc., которые находятся на стадии доклинического изучения их антидиабетических свойств. Активирующая активность в отношении АМРК была измерена на модели фосфорилирования N-концевого фрагмента ацетил-КоА-карбоксилазы 1 человека *in vitro*, в результате было найдено пять соединений у которых значение  $ED_{50}$  составило  $<10$  мкмоль/л [Kim J., 2016].

Также отдельного упоминания заслуживает новая группа средств, которая может применяться в терапии СД 2 типа – ингибиторы  $Na^+$ /глюкозного котранспортера 2-го типа (SGLT2). SGLT2 является основным натрийзависимым переносчиком глюкозы, ответственным за ее реабсорбцию в проксимальных канальцах почек. При ингибировании SGLT2 происходит снижение реабсорбции глюкозы в проксимальных извитых почечных канальцах, что приводит к усилению выведения глюкозы с мочой (увеличению глюкозурии) с последующим снижением уровня глюкозы в плазме крови [Спасов А. А., 2013а; Тюренков И. Н., 2015].

Среди серии высокоактивных С-арил глюкозидных ингибиторов SGLT2, содержащих бифенильный фрагмент, наиболее сильный ингибирующий эффект *in vitro* был выявлен у

соединения **161** ( $IC_{50} = 1,9$  нмоль/л) (рис. 1.6). Дальнейшие исследования *in vivo* продемонстрировали, что активность соединения **161** была сопоставима с действием референтного препарата, селективного обратимого ингибитора SGLT2, дапаглифлозина, что позволяет считать вещество **161** перспективным кандидатом для дальнейших исследований [Ding Y., 2015].

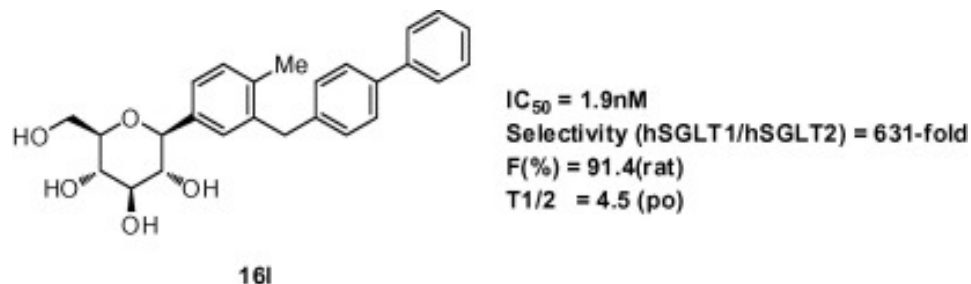


Рисунок 1.6. Химическая структура высокоактивного глюкозидного ингибитора SGLT2, содержащего бифенильную подструктуру, соединения **161** [Ding Y., 2015].

#### Нейро- и психотропная активности

В работе [Galici R., 2006] описан позитивный аллостерический модулятор метаботропных глутаматных рецепторов 2 подтипа ( $mGluR_2$ ), 3'-((2-циклопентил-6,7-диметил-1-оксо-2,3-дигидро-1H-инден-5-ил)окси)метил)бифенил-4-карбоксилат, под названием бифенилинданон А (BINA) (рис. 1.7).

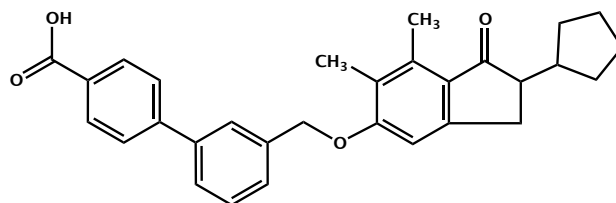


Рисунок 1.7. Химическая структура бифенилинданона А (BINA) [Galici R., 2006].

Показано, что агонисты 2 группы метаботропных глутаматных рецепторов,  $mGluR_2$  и  $mGluR_3$ , могут представлять интерес как соединения, обладающие противотревожным и антипсихотическим действием [Griebel G., 2016; Muguruza C., 2016; Peterlik D., 2016]. BINA оказалось эффективным на нескольких экспериментальных моделях, подтверждающих его антипсихотические и анксиолитические свойства *in vivo*. Была показана его способность регулировать возбуждающую синаптическую передачу в медиальной префронтальной коре головного мозга и ослаблять *in vivo* действие галлюциногена, агониста 5-НТ<sub>2A/2C</sub>-рецепторов, 2,5-диметокси-4-бromoамфетамина (ДОБ) [Benneyworth M. A., 2007].

Влияние BINA на поведенческую активность животных в эксперименте было подавлено антагонистом  $mGluR_{2/3}$  – LY341495, что подтверждает опосредованные гиперактивацией  $mGluR_2$  эффекты BINA *in vivo* [Galici R., 2006].

Другой бифенил-содержащий препарат «Бифепрунокс» позиционировался в качестве атипичного антипсихотика, сочетающего частичную агонистическую активность в отношении D<sub>2</sub>-дофаминовых рецепторов с серотониновой 5-HT<sub>1A</sub>-агонистической активностью [Bardin L., 2007; Wadenberg M.-L., 2007], однако его клинические испытания были приостановлены, так препарат не был одобрен FDA (*Food and Drug Administration (USA)* (англ.)) в качестве лекарственного средства для терапии острой и хронической шизофрении [Chattopadhyay A., 2016].

Среди производных бифенила были найдены антагонисты H<sub>3</sub>-гистаминовых рецепторов в ЦНС [Morini G., 2008; Bordi F., 2012; Nikolic K., 2014], соединения, обладающие сродством к серотониновым 5-HT<sub>4</sub> [Brudeli B., 2013] и 5-HT<sub>7</sub> рецепторам [Kim Y., 2013; Kim Y., 2014; Canale V., 2016], ингибирующие бутирил- и ацетилхолинэстеразу в центральной нервной системе [Mutahir S., 2016].

Влияние на обмен веществ, гормональную регуляцию, диуретические и противовоспалительные свойства

Нестероидные противовоспалительные препараты занимают одно из первых мест по частоте клинического использования благодаря эффективному сочетанию их анальгетического, противовоспалительного и жаропонижающего действия [Ong C. K. S., 2007].

К одним из широко используемых нестероидных противовоспалительных препаратов, пришедшим к клиническому применению в конце 1980-х, относят (RS)-2-(2-фторбифенил-4-ил) пропионовую кислоту или флурбипрофен [Brogden R. N., 1979].

При оценке противовоспалительной активности среди новых 5-(арилиден)-2-(арил)-4-оксотиазолидин-3-ил амидов бифенил-4-карбоновой кислоты в дозе 10 мг/кг на модели каррагинанового отека, показано, что данные вещества обладают выраженным противовоспалительным действием, не уступающим по активности препарату сравнения диклофенаку натрия [Деер А., 2010].

У серии бифенилзамещенных производных бензотиазол-2-карбоксамида обнаружены диуретические свойства. Ряд синтезированных соединений был протестирован *in vivo* на наличие диуретической активности, выявлен наиболее активный кандидат для дальнейших испытаний N-(1,3-бензотиазол-2-ил)-1,1'-бифенил-4-карбоксамид (II) (рис. 1.8) [Yar S. M., 2009].

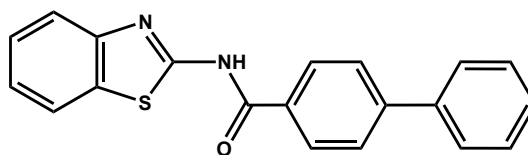


Рисунок 1.8. Химическая структура производного бензотиазол-2-карбоксамид, сопряженного с бифенилом, с высокой диуретической активностью [Yar S. M., 2009].

Среди бифенильных производных обнаружены соединения, стимулирующие секрецию соматотропного гормона [Smith R. G., 1993], действующие избирательно на изоформу XIV карбоангидразы человека [La Regina G., 2015], агонисты печеночных рецепторов X (LXR<sub>s</sub>) [Ullrich J. W., 2010], ингибиторы 17 $\beta$ -гидроксистероид-дегидрогеназы типа II (17 $\beta$ -HSD2) [Gargano E. M., 2016], ингибиторы матриксных металлопротеиназ-2, 3, 9, 13 (MMPs) [Chollet A.-M., 2002].

#### Антитромбогенный потенциал производных бифенила

Производные бифенила действуют на патогенетические звенья агрегации тромбоцитов и коагуляционный гемостаз. Среди них выявлены соединения с различными механизмами действия, которые играют важную роль как в процессах свертывания крови и восстановлении поврежденных кровеносных сосудов, так и при активации противосвертывающей системы.

Например, Challa [Challa N. R., 2014] опубликовал данные о выраженных свойствах производных тиенопиридина, содержащих бифенил-тетразольную группу, ингибировать АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro*. Выраженная антагонистическая активность к тромбоцитарному рецептору коллагена – гликопротеину VI (GPVI) – характерна для бифенольного неолигнана, известного как хонокиол, выделенного из коры Магнолии лекарственной (лат. *Magnolia officinalis*) [Lee T. Y., 2017].

Производные бифенила, соединение под названием фрадафибан и его перорально доступное пролекарство – лефрадафибан, являются антагонистами гликопротеиновых IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов [Müller T. H., 1997; Akkerhuis K., 2001].

Среди производных бифенила, снижающих свертываемость крови, найдены непептидные соединения с ингибирующей активностью в отношении фактора Ха [Wong P. C., 2002; Pinto D. J., 2006].

Также способность ингибировать агрегацию тромбоцитов обнаружена у таких бифенилсодержащих АТ<sub>1</sub>-антагонистов, как валсартан, лозартан, ирбесартан [Li P., 2000; Nakim A., 2003; Serebruany V. L., 2004; Serebruany V. L., 2006]; для лозартана, помимо антиагрегантного, было показано наличие антикоагулянтного и профибринолитического эффектов [Sakamoto T., 2014].

#### Антиоксидантное действие

Актуальное значение приобретает проблема фармакологической коррекции интенсивного образования свободных радикалов при недостаточной активности антиоксидантной компенсирующей системы с помощью препаратов, оказывающих антиоксидантное и антирадикальное действие [Young I. S., 2001; Sindhi V., 2013], в комплексном лечении различных заболеваний, в том числе атеросклероза [Поздняков О. М., 1993; Upston J. M., 2003], сердечно-

сосудистых заболеваний [Голиков А. П., 2003; Singh U., 2006], нейродегенеративных поражений [Smith M. A., 2000; Guidi I., 2006].

При этом антиоксидантный потенциал производных бифенила заключается в возможности служить акцепторами активных форм кислорода и ингибировать перекисное окисление липидов [Rikhi M., 2015].

Активные антирадикальные вещества были обнаружены среди замещенных бифенил-2,6-диэтанонов. Показано, что производные, которые содержат в составе базовой структуры (бифенил-2,6-диэтанона) amino-, метокси- или гидроксильные группы, обладают высокой антиоксидантной активностью [Rikhi M., 2015].

У ряда новых производных бифенил-3,5-дигидро-2H-тиазолопиримидина выявлены умеренные и высокие антиоксидантные свойства, что может быть обусловлено наличием в их составе свободной тиазолопиримидиновой группы [Maddila S., 2012].

Еще одним производным бифенила с выраженными антиоксидантными и противовоспалительными свойствами является дифенилдиселенид (PhSe)<sub>2</sub> [Menezes C., 2016]. В исследовании [Brüning C. A., 2012] также были показаны его нейропротекторные и противовоспалительные свойства, основанные на предотвращении развития окислительного стресса и снижении уровня провоспалительных цитокинов при экспериментальной ишемии-реперфузии головного мозга у крыс.

### **1.1.1 Биологически активные свойства производных бифенила, сопряженных с бензимидазолом**

#### Антигипертензивная активность

Среди первых разработанных АТ<sub>1</sub>-антагонистов находятся производные 2-бутилбензимидазол-7-карбоновой кислоты. Этерификация карбоксильной группы соединения CV-11974 в положении С<sup>7</sup> привела к созданию соединения с повышенной биодоступностью при пероральном введении и усиленным АТ<sub>1</sub>-ингибирующим действием – кандесартана, используемого в настоящее время в клинической практике [Kubo K., 1993].

У кандесартана в бензимидазольном ядре содержатся карбоксильная группа в 7-ом, и у другого производного бензимидазола – телмисартана – молекула бензимидазола в 6-ом положении, соответственно. Было также тщательно изучено влияние разнообразных замен в бензимидазольном ядре на активность соединения в целом. В 5-ую позицию бензимидазола добавлялись для дальнейшего изучения нитро-, amino-, карбоксиамидные или сульфонильные группы, в результате, полученные соединения получались более активными или эквивалентными кандесартану [Jain A., 2011].

В настоящее время в клинической практике для лечения артериальной гипертензии применяется новый синтетический АТ<sub>1</sub>-антагонист, который содержит бензимидазол и бифенил в базовой структуре – азилсартан. Азилсартан (2-этоксид-1-{[2'-(5-окса-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил)бифенил-4-ил]метил}-1H-бензимидазол-7-карбоксильная кислота, AZL) является селективным антагонистом АТ<sub>1</sub>-рецепторов, который одобрен FDA для лечения артериальной гипертензии в 2011 году [Balakumar P., 2011]. AZL обладает структурным сходством с кандесартаном за исключением того, что первый содержит в себе остаток 5-оксо-1,2,4-оксадиазола на месте тетразола. Азилсартан также содержит карбоксильную группу в 7-ом положении бензимидазольного кольца, которая, как полагают, играет определенную роль в его непреодолимой антагонистической активности к АТ<sub>1</sub>-рецептору, что способствует мощному и продолжительному антигипертензивному действию [Oijma M., 2011]. Он обладает минимальной по сравнению с другими сартанами величиной IC<sub>50</sub> [Захарова Н. В., 2011]. Помимо контроля артериального давления исследуется возможность применения азилсартана в качестве сопутствующей терапии при лечении диабетической нефропатии и сердечной недостаточности [De Caterina A. R., 2012; Kurtz T. W., 2012].

#### Антидиабетическая активность

Перспективным представляется применение сартанов не только для лечения диабетической нефропатии, но и для профилактики СД 2 типа, особенно для лечения больных с метаболическим синдромом [Бова А. А., 2009].

Некоторые АТ<sub>1</sub>-антагонисты, производные бифенила и бензимидазола, в частности телмисартан, обладают сродством к PPAR $\gamma$ , стимуляция которых играет немаловажную роль в регуляции метаболизма глюкозы и способствует повышению чувствительности тканей к инсулину [Benson S. C., 2004; Taguchi I., 2013; Zidek V., 2013].

Впоследствии 1-(бифенил-4-илметил)-1H-бензо[d]имидазол был выделен в качестве базового структурного компонента телмисартана, который необходим для активации PPAR $\gamma$ . Дальнейшие исследования в области оптимизации данной базовой структуры были сфокусированы на различных заменах в С<sup>2</sup>-положении бензимидазола (рис. 1.9). В серии алкильных замен активность соединений уменьшалась в ряду: бутил (**4b**) > трет-бутил (**4d**) > изобутил (**4c**). Производное (**4e**) с фенильной группой в положении С<sup>2</sup> активировало PPAR $\gamma$  в клеточной культуре COS-7 *in vitro* наиболее эффективно (EC<sub>50</sub> = 0,27 мкмоль/л). Замена на 4-гидроксифенильный радикал (**4j**) во 2-ом положении бензимидазола приводила к резкому снижению активности вещества (EC<sub>50</sub> = 5,8 мкмоль/л). При этом метилирование фенольного гидроксила, как показано на примере соединения (**4i**), удерживало высокий уровень активности вещества (EC<sub>50</sub> = 0,29 мкмоль/л). Слабая активность, характерная для производного с бензильным радикалом (**4f**) в положении С<sup>2</sup> (EC<sub>50</sub> = 1,4 мкмоль/л), была устранена с помощью

добавления гидрофобного 4-Cl заместителя (**4h**,  $EC_{50} = 0,55$  мкмоль/л) или увеличения длины алкильной цепи, расположенной между фенилом и бензимидазолом (**4g**;  $EC_{50} = 0,31$  мкмоль/л) [Goebel M., 2009].

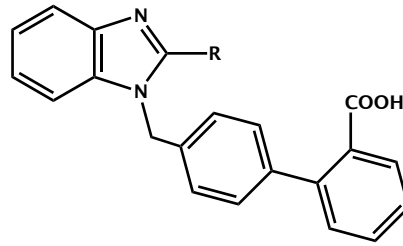


Рисунок 1.9. Химическая структура серии производных 1-(бифенил-4-илметил)-1H-бензо[d]имидазола с PPAR $\gamma$ -агонистической активностью, где R = C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> (**4a**); *n*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> (**4b**); *изо*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> (**4c**); *трет*-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> (**4d**); C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> (**4e**); C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>2</sub> (**4f**); C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (**4g**); 4-(Cl)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub> (**4h**); C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OCH<sub>3</sub>-4 (**4i**); C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH-4 (**4j**) [Goebel M., 2009].

В другой работе [Obermoser V., 2017] в качестве базовой структуры для изучения влияния арильных заместителей в C<sup>5</sup>- и C<sup>6</sup>-положениях бензимидазола был выбран частичный агонист PPAR $\gamma$  4'-((2-пропил-1H-бензо[d]имидазол-1-ил)метил)-[1,1'-бифенил]-2-карбоновая кислота. В результате было выявлено, что добавление пара-OCH<sub>3</sub>-фенильного заместителя, независимо от его положения, приводило к значительному усилению PPAR $\gamma$ -активирующей активности. Оба соединения представляют собой полные агонисты PPAR $\gamma$  за счет их сильных гидрофобных взаимодействий с аминокислотой Фен363 в лиганд-связывающем домене. Частичные агонисты с более сильным сродством к PPAR $\gamma$ , чем у телмисартана, были получены путем добавления -OH и -Cl заместителей в различные положения фенильного кольца.

Среди соединений, способных усиливать активность AMPK, выделяют серию производных бензимидазола с бифенильным радикалом в C<sup>5</sup>-положении, разработанных компанией Merck Sharp & Dohme Corp. Как и в известном лиганде AMPK (A-769662) два наиболее активных соединения ( $EC_{50} = 1$  нмоль/л и  $EC_{50} = 13$  нмоль/л) содержат 4-(2-гидроксифенил)фенильный фрагмент в 5-ой позиции бензимидазола. Кроме того, активность данных соединений была подтверждена в исследованиях *in vivo*, было отмечено их положительное влияние на толерантность к глюкозе и секрецию инсулина при пероральном глюкозотолерантном тесте после 12 дней перорального введения животным [Giordanetto F., 2012].

У серии производных бензимидазола, содержащих бифенил в C<sup>2</sup>-положении, выявлена ингибирующая активность в отношении стеарил-КоА десатуразы 1 (SCD1) [Powell D. A., 2010], одного из основных ферментов, участвующих в липогенезе. Ингибирование SCD1 приводит к увеличению времени окисления глюкозы в митохондриях, что, в свою очередь, способствует контролю гипергликемии у больных ожирением, метаболическим синдромом и СД типа 2 [Тюренков И. Н., 2015].



### Противовоспалительные свойства

В ряде клинических исследований подтверждается возможность АТ<sub>1</sub>-блокаторов оказывать положительное влияние на метаболические процессы, и отмечаются их органопротективные свойства в дополнение к основному антигипертензивному эффекту [Van Zwieten P. A., 2006; Atlas S. A., 2007].

Значимой представляется роль АТ<sub>1</sub>-рецепторов в формировании воспалительного ответа. В частности, АТ II является провоспалительным фактором в периферических тканях, который наравне с другими индукторами воспаления [Montezano A. C., 2014], участвует в развитии эндотелиальной дисфункции и повреждении стенки сосудов. Назначение АТ<sub>1</sub>-антагонистов пациентам с артериальной гипертензией и метаболическим синдромом, помимо коррекции артериального давления, способствует уменьшению воспалительных процессов в сосудистой стенке, что позволяет снизить сердечно-сосудистый риск и риск развития СД [Savoia C., 2007].

Воспалительные процессы в тканях головного мозга могут быть результатом гиперактивации мозговых АТ<sub>1</sub>-рецепторов, что в дальнейшем приводит к хронизации воспалительного процесса и повреждению нейронов [Saavedra J. M., 2011]. На модели воспалительного процесса у нормотензивных крыс, вызванного систематическим внутривенным введением бактериального липополисахарида, было показано, что кандесартан заметно снижает продукцию и высвобождение в системный кровоток провоспалительных цитокинов и других индукторов воспаления в коре головного мозга [Saavedra J. M., 2011].

Имеются данные экспериментальных исследований, которые свидетельствуют о возможном терапевтическом эффекте АТ<sub>1</sub>-антагонистов при лечении аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз [Lanz T. V., 2010] и ревматоидный артрит [Silveira K. D., 2013].

### Нейро- и психотропная активность

На поверхности клеток эндотелия гематоэнцефалического барьера экспрессируется большое количество АТ<sub>1</sub>-рецепторов, которые являются доказанной мишенью для нейропротекторного действия сартанов [Saavedra J. M., 2011]. Воздействие различных стрессорирующих факторов, таких как изоляция, иммобилизация и холод, приводит к увеличению активности мозгового АТ II и повышенной экспрессии АТ<sub>1</sub>-рецепторов в головном мозге [Phillips M. I., 2008]. В свою очередь, гиперактивация АТ<sub>1</sub>-рецепторов, расположенных в паренхиме головного мозга, ассоциируется с различными стресс-индуцированными расстройствами, ишемией и воспалительными процессами головного мозга, изменениями в поведении и прогрессирующей потерей памяти [Saavedra J. M., 2012].

В ряде экспериментальных работ были получены данные о положительном антистрессовом эффекте кандесартана, который коррелирует с выраженным снижением

тревожности и депрессии у грызунов [Saavedra J. M., 2011]. Было показано, что анксиолитическое действие АТ<sub>1</sub>-антагонистов сравнимо с действием препаратов бензодиазепинового ряда на некоторых моделях ангиогенеза и по способности уменьшать лактат-индуцированные панические атаки [Saavedra J. M., 2011].

АТ<sub>1</sub>-антагонисты проявляют мощные нейропротекторные свойства *in vivo* и защищают от нейротоксического действия интерлейкина-1 $\beta$  *in vitro* [Wang J., 2014]. Нейропротекторный эффект телмисартана, который частично опосредован активацией PPAR $\gamma$ , заключается в способности уменьшать глутамат-индуцированное повреждение нейронов. В свою очередь антиглутаматергическое действие обосновывает терапевтическое применение сартанов, в частности телмисартана, при нейродегенеративных заболеваниях и травматической болезни головного мозга, в патогенезе которых нейротоксический эффект глутамата играет существенную роль [Wang J., 2014]. Также имеются данные клинических исследований, подтверждающих нейрозащитное действие сартанов при инсульте [Wright J. W., 2013].

В патенте [Larsen J. S., 2011] описана позитивная аллостерическая модуляция рецепторного комплекса ГАМК<sub>A</sub>, характерная для серии производных бензимидазола с бифенильным радикалом в С<sup>1</sup>-положении. Для наиболее активного лиганда показатель IC<sub>50</sub> специфического связывания с ГАМК<sub>A</sub> *in vitro* составляет 0,65 нмоль/л.

### 1.1.2 Биологическая активность производных дифенилоксида

Многие производные дифенилоксида (дифениловый эфир, феноксибензол) (рис. 1.10) представляют интерес как важные синтетические объекты и потенциальные биологически активные вещества, для которых характерен ряд фармакологических свойств. Производные дифенилоксида также оказываются биоизостерными<sup>1</sup> аналогами производных дифенила [Зефирова О.Н., 2002].

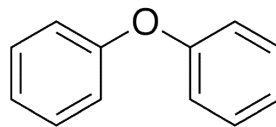


Рисунок 1.10. Химическая структура дифенилового эфира.

#### Противовоспалительные, диуретические и антидиабетические свойства

Известный селективный ингибитор циклооксигеназы (ЦОГ) типа 2 нимесулид [N-(4-нитро-2-феноксифенил)метансульфонамид] оказывает противовоспалительное,

<sup>1</sup> Биоизостером называется соединение, получающееся путем замены одного атома (группы атомов) на другой атом (группу атомов), сохраняющее биологическую активность исходного соединения [Зефирова О. Н., 2002].

обезболивающее, жаропонижающее, антиагрегантное действие и служит исходным соединением для синтеза производных триазола, эффективных против рака толстой кишки [Mareddy J., 2013]. Замещенные сульфонанилиды дифенилового эфира, бензилфенилового эфира и дифениламина, обладающие структурным сходством с нимесулидом, также демонстрируют выраженные противовоспалительные свойства [Attal V., 2003].

Еще одно производное дифенилоксида, одобренное для использования в клинической практике, относится к группе диуретиков. Буметанид (3-бутиламино-4-фенокси-5-сульфамойлбензойная кислота) является широко используемым и одним из самых сильных петлевых диуретиков (в 40 раз сильнее фуросемида) [Halstenson C. E., 1983; Ward A., 1984], который подавляет реабсорбцию ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  в восходящем отделе петли Генле за счет ингибирования изоформы 2  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -котранспортера (NKCC2) ( $\text{IC}_{50} = 4,0$  мкмоль/л), расположенной там же в апикальной мембране эпителиальных клеток. В ряду производных буметанида наиболее высокую ингибирующую активность в отношении NKCC2 при сходной диуретической активности проявило производное PF-1962 ( $\text{IC}_{50} = 1,1$  мкмоль/л), у которого бутиламиновая цепь замещена на бутилтио-группу [Lykke K., 2015].

Обоватол является производным дифенилового эфира, выделенным из листьев Магнолии обратнойцевидной (лат. *Magnolia obovata*), и известным своей противовоспалительной и противоопухолевой активностью за счет ингибирования транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [Choi M. S., 2007]. Кроме того, показаны его антитромбогенный и антиагрегантный эффекты, опосредуемые подавлением фосфорилирования фосфолипазы  $\text{C}\gamma_2$  (PLC $\gamma_2$ ) [Park E. S., 2011].

Ряд производных дифенилоксида характеризуется наличием выраженных антидиабетических свойств. Так, у соединения под шифром SAR707 выявлена высокая ингибирующая SCD1 активность на модели с использованием микросом печени крыс *in vitro* ( $\text{IC}_{50} = 0,00848$  мкмоль/л). В исследованиях *in vivo* на крысах линии Zucker с ожирением и СД типа 2 после введения SAR707 в течение 4-х недель у животных наблюдались снижение массы тела и уровня глюкозы в плазме крови, улучшение липидного профиля; однако при всех этих положительных изменениях у крыс наблюдались множественные побочные эффекты, отмеченные до этого у нокаутных животных [Matter H., 2013].

Среди производных дифенилоксида выявлены соединения, ингибирующие активность  $\alpha$ -глюкозидазы [Zhang L.-H., 2016], антагонисты рецептора глюкагона [Kim R. M., 2008], агонисты LXR $\alpha$  [Travins J. M., 2010].

## 1.2 Заключение

Соединения, содержащие привилегированную бифенильную подструктуру, обладают широким спектром биологической активности, который включает антигипертензивные,

диуретические, противовоспалительные, антидиабетические, психотропные и другие свойства, описанные выше. Исходя из этого актуальным является синтез соединений с различными заместителями в основе которых лежит замещенный бифенильный фрагмент с адекватной гетероциклической системой в базовой структуре.

Для получения новых высокоактивных соединений и, возможно, эффективно взаимодействующих с более чем одной разновидностью биологических мишеней, использование в качестве гетероциклической системы в базовой структуре другой привилегированной подструктуры – молекулы бензимидазола – представляется перспективным. Анализ описанных выше данных литературы подтверждает, что комбинация азолов и бифенила в базовой структуре соединения обладает широким потенциалом биологической активности.

Таким образом, предполагается сравнить проявление биологических свойств соединениями, содержащими одну привилегированную подструктуру – бифенил, две привилегированных подструктуры – бифенил и конденсированные азолы, и соединениями, представляющими собой биоизостерические аналоги бифенила, но не обладающие привилегированными свойствами, – дифенилоксиды.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Правила и рекомендации к проведению экспериментальных исследований

Экспериментальная работа была проведена в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009, ГОСТ Р ИСО 5725-2002 и правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ в соответствии с «Принципами надлежащей лабораторной практики» [ГОСТ Р 33044-2014, 2015] и «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (Минздрав РФ, приказ № 199н от 1 апреля 2016 г.), с соблюдением директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Моделирование экспериментальных патологий осуществлялось согласно руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Миронов А. Н., 2012]. Все эксперименты были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (OHRP), протокол № 2016-2015 от 5 июня 2015 года. Эвтаназию животных проводили согласно требованиям, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1997). Острую токсичность соединений исследовали в соответствии с требованиями по проведению доклинических испытаний [Арзамасцев Е. В., 2012].

### 2.2 Перечень используемых реактивов и веществ

Для исследований использованы реактивы: кальций хлористый 2-водный, D-глюкоза (безводная), натрий хлористый, калий хлористый, магний хлористый 6-водный, калий фосфорнокислый однозамещенный, калий фосфорнокислый двузамещенный, натрий фосфорнокислый двузамещенный, магний сернокислый 7-водный, гидрокарбонат натрия, гидроокись калия (ООО АГАТ-МЕД, Россия), азид натрия (Sigma, США), 2-водный трехзамещенный цитрат натрия (ООО АО РЕАХИМ, Россия), NEPES (GERBU, Германия), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (MP Biomedicals, Inc., Франция), трис гидрохлорид, трис(гидроксиметил)аминометан (Serva Feinbiochemica, Германия), стандарт-титр соляной кислоты 0,1 Н (ООО АО РЕАХИМ, Россия), серная кислота 95-98% (ООО АО РЕАХИМ, Россия), этанол 96% (Россия), натрия хлорид 0,9% (Эском, Россия), диметилсульфоксид (ДМСО) (Fisher Scientific, США), Tween 20 (Fisher Scientific, США), Tween 80 (Fisher Scientific, США).

В качестве фармакологических реактивов, препаратов и веществ сравнения использованы: трихлоруксусная кислота (ТХУ) (Fisher Scientific, США), натриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) (Sigma, США), 2-тиобарбитуровая кислота (2-ТБК) (Fluka,

Швейцария), бычий сывороточный альбумин (БСА) фракции V (BioWest, Франция), аскорбиновая кислота (Chemapol, Чехия), ангиотензин II человеческий (Sigma, США), РТР1В человеческая (Sigma, США), динатриевая соль 4-нитрофенилфосфата (pNPP) (Sigma, США), 1,4-дитиотрептоил (ДТТ) (Sigma, США), дипептидилпептидаза типа 4 человеческая рекомбинантная, экспрессированная в клетках насекомых (Sigma, США), глицил-пролил-*n*-нитроанилида гидрохлорид (Sigma, США), гликогенфосфорилаза кролика мышечная (Sigma, США), дикалиевая соль глюкозо-1-фосфата (Sigma, США), гликоген бычьей печени (Sigma, США), молибдат аммония (Sigma, США), малахитовый зеленый (Sigma, США), глюкокиназа человеческой печени рекомбинантная, экспрессированная в *E. coli* (Sigma, США), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Sigma, США), динатриевая соль аденозин-5-трифосфорной кислоты (АТФ) (Sigma, США), натриевая соль  $\beta$ -никотинамидадениндинуклеотид фосфата (Sigma, США), 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ•) (Sigma, США), диаммониевая соль 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS•) (Sigma, США),  $\alpha$ -пирогаллол (Chemapol, Чехия), перекись водорода 30% (ООО АО РЕАХИМ, Россия), гемоглобин бычий (Sigma, США), люминол (Serva, Германия), SuperBlock Blocking Buffer (Pierce Chemical Company, США), кроличьи антитела (IgG) к БСА (Sigma, США), козы антитела против кроличьего IgG, меченные пероксидазой корня хрена (Sigma, США), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ) (Sigma, США), глюкоза/лактат гемолизирующий раствор (EKF Diagnostics, Германия), карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) (Sigma, США), стрептозотоцин (Sigma, США), хлоралгидрат (Panreac Química S.L.U., Испания), двухфазный инсулин «ХУМУЛИН М3» (Eli Lilly, Франция); 10% забуференный нейтральный формалин (ООО МоДиТех, Казань), гомогенизированная парафиновая среда (ООО БиоВитрум, Санкт-Петербург), моноклональные антитела к фибронектину (GeneTex), моноклональные антитела к конечным продуктам гликирования (AGEs) (Abcam), моноклональные антитела к рецепторам к конечным продуктам гликирования (RAGE) (GeneTex).

Наборы: универсальный тест-набор для определения активности киназ ADP-Glo™ Kinase Assay (кат. V9101, Promega, США), тест-система для определения активности АМФ-активируемой протеинкиназы АМПК (A1/B1/G1) Kinase Enzyme System (кат. V1921, Promega, США); набор для определения концентрации общего белка в моче и ликворе методом с пирогаллоловым красным (кат. В 06.03, Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия), набор реагентов для определения гликозилированного гемоглобина «Диабет-тест» (ООО Фосфосорб, Россия).

Красители: Синий Эванса (Sigma, США) и 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (Sigma, США), окраска по Массону (ООО МоДиТех, Казань), гематоксилин и эозин (ООО МоДиТех, Казань), набор реактивов Picro Sirius Red Stain Kit (connective Tissue Stain) (Abcam).

Субстанции веществ (препараты сравнения): телмисартан (Sigma, США), ALT-711 (алагебриум) (Kailu Xingli Pharmaceutical Co., Ltd., Китай), бутилокситолуол (дibuнол) (Merck, Германия), аминогуанидин (Sigma, США), ацетилсалициловая кислота (Sigma, США), NSC-87877 (Santa Cruz Biotechnology, США), вилдаглиптин (Sigma, США), CP-316819 (Sigma, США), метформин (ООО Озон, Россия), AICAR (5-аминоимидазол-4-карбоксамид 1-β-D-рибофуранозид) (Sigma, США), тролокс ((±)-6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) (Sigma, США).

Изучены 35 веществ под лабораторными шифрами «AZH», «DF», «AZHT», «LOSAZ», «RUI», «TONS» из которых 6 относятся к производным бифенила, связанным с бензимидазолом через метиленовую/оксоэтильную группу, 8 соединений – к производным замещенного бифенила, связанного с 2,3-дигидро-9*H*-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолом через метиленовую группу, и непосредственно связанного с гетероциклическим кольцом имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, 7 соединений – к производным бифенила, связанным с имидазолом/тиазолом через оксоэтильную группу, и 14 соединений – к производным дифенилоксида (табл. 2.1).

Исследуемые вещества под лабораторными шифрами «AZH», «DF», «AZHT», «LOSAZ» и «RUI» 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<sup>2</sup>. Исследуемые вещества под лабораторными шифрами «TONS» синтезированы сотрудниками Волгоградского государственного технического университета: доцентами кафедры технологии органического и нефтехимического синтеза, к.х.н. В. С. Лобасенко и к.х.н. Т. К. Корчагиной под руководством заведующего кафедрой, д.х.н., профессора Ю. В. Попова<sup>3</sup>.

---

<sup>2</sup> Выражаем глубокую признательность ведущему научному сотруднику НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, к.х.н. В. А. Анисимовой и научному сотруднику, к.х.н. О. Н. Жуковской за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

<sup>3</sup> Выражаем глубокую признательность сотрудникам Волгоградского государственного технического университета – заведующему кафедрой технологии органического и нефтехимического синтеза, д.х.н., профессору Ю. В. Попову, доценту кафедры технологии органического и нефтехимического синтеза, к.х.н. В. С. Лобасенко, доценту кафедры технологии органического и нефтехимического синтеза, к.х.н. Т. К. Корчагиной за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

Таблица 2.1 – Шифры и химическая структура изученных бифенилов, связанных с бензимидазолом через метиленовую или оксоэтильную группу.

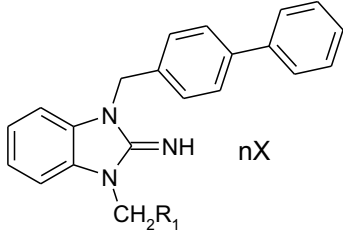
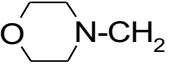
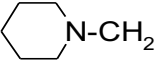
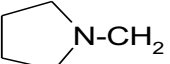
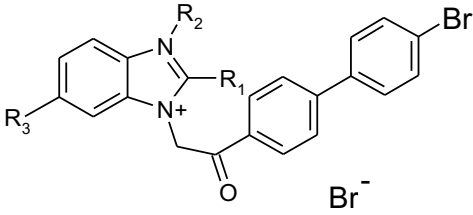
№ п/п	Шифр соединения	R <sub>1</sub> заместитель	R <sub>2</sub> заместитель	R <sub>3</sub> заместитель	nX	Молекулярная масса
1	2	3	4	5	6	7
<b>I. Гидробромиды 1-диалкиламиноалкил-3-бифенил-2-иминобензимидазолины</b>						
						
1	AZH-133	 N-CH <sub>2</sub>	-	-	HBr	493,5
2	AZH-134	(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub>	-	-	HBr	479,6
3	AZH-135	 N-CH <sub>2</sub>	-	-	HBr	492,3
4	AZH-136	 N-CH <sub>2</sub>	-	-	HBr	477,5
5	AZH-141	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub>	-	-	HBr	451,5
<b>II. Бромид 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия</b>						
						
1	AZH-137	-CH <sub>2</sub> OH	-CH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	Br <sup>-</sup>	546,5



Таблица 2.2 – Шифры и химическая структура изученных производных замещенного бифенила, связанного с 2,3-дигидро-9*H*-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолом через метиленовую группу, и непосредственно связанного с гетероциклическим кольцом имидазо[1,2-*a*]бензимидазола.

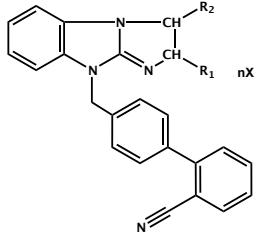
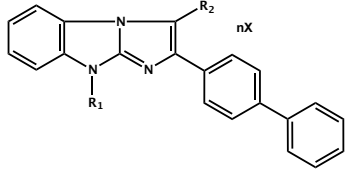

№ п/п	Шифр соединения	R <sup>1</sup> заместитель	R <sup>2</sup> заместитель	nX	Молекулярная масса
1	2	3	4	5	6
<b>I. 9-замещенные 2,3-дигидроимидазо[1,2-<i>a</i>]бензимидазолы</b> <b>(4'-(2,3-дигидро-9<i>H</i>-имидазо[1,2-<i>a</i>]бензимидазол-9-ил-метил)бифенил-2-карбонитрил)</b>					
					
1	AZH-143	-H	-H	HBr	431,4
<b>II. 9-замещенные 2-дифенилимидазо[1,2-<i>a</i>]бензимидазолы</b>					
					
1	DF-1	-CH <sub>3</sub>	-H	HCl	359,9
2	DF-2	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	HCl	372,9
3	DF-4	-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	-H	HCl	398,9
4	DF-5	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-H	HCl	436,0
5	DF-6	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H	2HCl	453,4
6	DF-7	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	-H	2HCl	481,5
7	DF-8	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N 	-H	2HCl	495,5

Таблица 2.3 – Шифры и химическая структура изученных бифенилов, связанных с имидазолом/тиазолом через оксоэтильную группу.

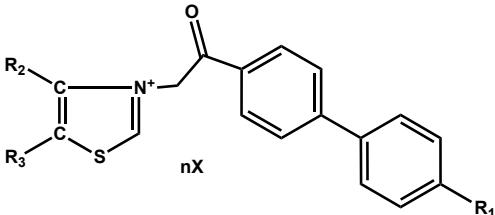
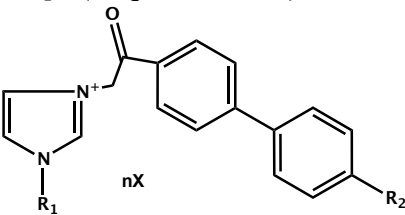
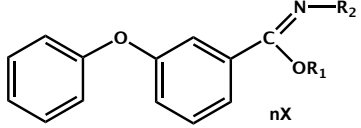
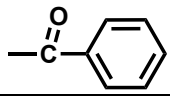
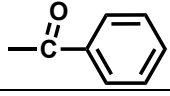
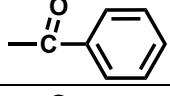
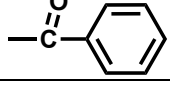
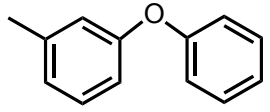
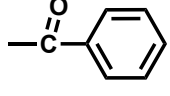
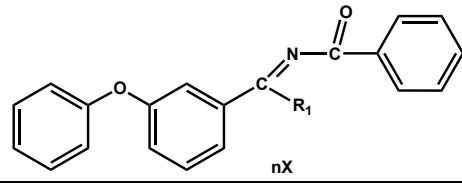
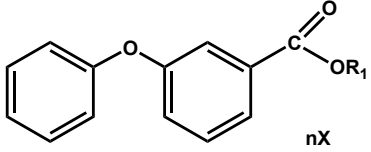
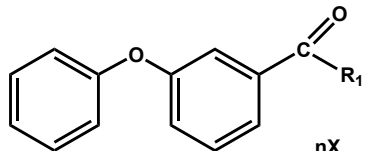
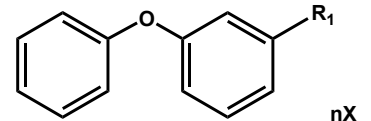
№ п/п	Шифр соединения	R <sup>1</sup> заместитель	R <sup>2</sup> заместитель	R <sup>3</sup> заместитель	nX	Молекулярная масса
1	2	3	4	5	6	7
<b>Бромиды 4-метил- и 4,5-диметил-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазола</b>						
						
1	AZHT-7	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	-H	Br <sup>-</sup>	388,3
2	AZHT-9	-Br	-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	Br <sup>-</sup>	467,4
<b>II. Бромиды 1-R<sub>1</sub>-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]имидазолия</b>						
						
1	LOSAZ-33	-CH <sub>3</sub>	-Br	-	Br <sup>-</sup>	436,1
2	LOSAZ-34	-CH=CH <sub>2</sub>	-Br	-	Br <sup>-</sup>	448,1
3	RUI-25	-CH <sub>3</sub>	-H	-	Br <sup>-</sup>	357,2
4	RUI-26	-CH=CH <sub>2</sub>	-H	-	Br <sup>-</sup>	369,2
5	RUI-27	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-H	-	Br <sup>-</sup>	419,3

Таблица 2.4 – Шифры и химическая структура изученных производных дифенилоксида.

№ п/п	Шифр соединения	R <sup>1</sup> заместитель	R <sup>2</sup> заместитель	R <sup>3</sup> заместитель	nX	Молекулярная масса
1	2	3	4	5	6	7
<b>I. Эфиры 3-феноксифенилкарбоксимидовой кислоты и N-(бензоил)феноксифенилкарбоксимидовой кислоты</b>						
						
1	TONS-511	-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	-	HCl	277,8
2	TONS-508	-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	-H	-	HCl	275,8
3	TONS-232	<i>n</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>		-	HCl	409,9
4	TONS-227	<i>втор</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>		-	HCl	409,9
5	TONS-226	<i>изо</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>		-	HCl	409,9
6	TONS-462	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>		-	HCl	429,9
7	TONS-495			-	HCl	522,0
<b>II. N-Бензоил-N'-3-феноксифениламидины</b>						
						
1	TONS-241	-NHC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-Br	-	-	-	471,3

Продолжение таблицы 2.4

№ п/п	Шифр соединения	R <sup>1</sup> заместитель	R <sup>2</sup> заместитель	R <sup>3</sup> заместитель	nX	Молекулярная масса
1	2	3	4	5	6	7
<b>III. Эфиры 3-феноксibenзойной кислоты</b>						
						
1	TONS-281	<i>изо</i> -C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> CN	-	-	HCl	317,8
<b>IV. 3-феноксibenзоилы</b>						
						
1	TONS-512	-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	HCl	305,8
2	TONS-513	-C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> -2-O	-	-	-	294,3
<b>V. 3-феноксифенилы</b>						
						
1	TONS-503	-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	HCl	277,8
2	TONS-504	-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NC <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	-	-	HCl	319,3
3	TONS-514	-NHCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -3-O- 2-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-	-	HCl	415,9

### 2.3 Список используемого оборудования и программного обеспечения

Для исследований использовано следующее оборудование: однокамерная установка для изолированных органов 4000 (Ugo Basile, S.R.L., Италия), изотонический датчик 7006 (Ugo Basile, S.R.L., Италия), 4-канальный цифровой рекордер (Ugo Basile, S.R.L., Италия), рН-метр рН213 (HANNA Instrumento, Германия), магнитная мешалка MSH-300 (Biosan, Латвия), весы лабораторные Adventurer AR2140 (OHAUS Europe, Швейцария), весы Scout Pro SPU601 (OHAUS, США), центрифуга MultiCentrifuge CM-6M (Elmi, Латвия), микроцентрифуга Minispin (Eppendorf, Германия), вортекс Elmi V-3 (Elmi, Латвия), концентратор кислорода (Армед, Россия), термошейкер для планшетов PST-60HL (Biosan, Латвия), спектрофлуориметр F-7000 (Hitachi, Япония), микропланшетный ридер Infinite M200 (Tecan, Швейцария), двухканальный лазерный анализатор агрегации тромбоцитов Биола 230 LA (НПФ Биола, Россия), гомогенизатор Поттера с электрическим приводом МШ-2 (Россия), термостат воздушный BINDER BD 115 (115л) (Германия), баня серологическая СБ-СЛ-01М (Россия), спектрофотометр цифровой PD-303UV (Apel, Япония), биохимический анализатор Biosen C\_Line (EKF Diagnostics, Германия), хемилуминометр Lum-100 (ООО ДИСофт, Россия), ультразвуковая ванна 4,0 л (Сапфир, Россия), центрифуга SIGMA 2-16KL универсальная с охлаждением, до 15300 об/мин (Sigma Laborzentrifugen, Германия), глюкометр «Глюкокард» (Россия), цифровая камера Axioscam 105 color (Карл Цейс, Германия, 5 мегапикселей) на базе микроскопа Axioscam plus (Карл Цейс, Германия).

Для исследований использовано следующее программное обеспечение: программный пакет ChemOffice 8.0 (CambridgeSoft, США), Gephi версия 0.9 (The Gephi Consortium, Франция), компьютерная программа AGGR версия 4.0 (Биола, Россия), ПО LabScribe3.0™ (iWorx Systems, Inc., США), ПО PowerGraph 3.3 (ООО ДИСофт, Россия), ПО i-control™ для микропланшетных ридеров Tecan (Tecan, Швейцария), ПО для спектрофотометра PD-303UV версия 3.0 (Apel, Япония), программа «ZEN Pro 2012» (Карл Цейс, Германия).

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

### 2.4 Экспериментальные животные

Фармакологические исследования проводились на лабораторных животных: 75 нелинейных крысах-самцах массой 200-350 г (ООО «НИЦ БМТ», ветеринарное свидетельство № 0604106 от 20.09.15 г., ветеринарное свидетельство № 0645111 от 06.06.16 г.); 50 крысах-самцах линии Sprague-Dawley массой 200-230 г (ООО «НИЦ БМТ», ветеринарное свидетельство №

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

Животные содержались в стандартных условиях вивария Волгоградского государственного медицинского университета с естественным световым режимом при относительной влажности воздуха 40-50% и температуре 22-24°C на стандартной диете для лабораторных животных [ГОСТ Р 50258-92, 1992]. Содержание животных и экспериментальные манипуляции отвечали международным рекомендациям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (1986), а также правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ в соответствии с «Принципами надлежащей лабораторной практики» [ГОСТ Р 33044-2014, 2015] и «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» (Минздрав РФ, приказ № 199н от 1 апреля 2016 г.).

## **2.5 Скрининговые модели и методы для изучения фармакологических свойств новых производных бифенила**

### **2.5.1 Метод исследования антиангиотензинового (AT<sub>1</sub>) действия соединений *in vitro***

Исследование антагонистической активности по отношению к ангиотензиновым AT<sub>1</sub>-рецепторам проводили на изолированной портальной вене беспородных крыс обоего пола *in vitro* по методу [Спасов А. А., 2014] в модификации [Спасов А. А., 2016в]. Животное наркотизировали введением раствора хлоралгидрата в/б (400 мг/кг) и извлекали отрезок портальной вены длиной 15-20 мм. Тщательно очищенный от жировой и соединительной ткани сосуд за 45 минут до начала эксперимента фиксировали в ванночке для изолированных органов, заполненной буферным раствором Кребса (NaCl – 118 ммоль/л, KCl – 4,7 ммоль/л, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,18 ммоль/л, MgSO<sub>4</sub> – 1,2 ммоль/л, CaCl<sub>2</sub> – 2,5 ммоль/л, NaHCO<sub>3</sub> – 25 ммоль/л, глюкоза – 5,55 ммоль/л; pH 7,4) с постоянной оксигенацией 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub> и термостатированием при 24°C. В течение периода адаптации и последующего эксперимента раствор Кребса в ванночке меняли каждые 10-15 мин. В конце адаптационного периода проводилась проверка сократительной способности препарата методом калиевой контрактуры (KCl, 80 ммоль/л) и регистрация сократительного ответа. Активность веществ оценивали по степени подавления индуцированного 0.01 мкмоль/л AT II спазмогенного эффекта изолированной портальной вены. Предварительная экспозиция изучаемых веществ и препарата сравнения, селективного AT<sub>1</sub>-антагониста, телмисартана (Sigma, США) в эквимольных дозах 10 мкмоль/л проводилась в течение 1 мин, после чего повторно оценивали ответ изолированного сосуда на введение AT II. Об уровне AT<sub>1</sub>-антагонистической

активности исследуемых веществ судили по изменению сократительной активности сосуда в сравнении с контрольным эффектом АТ II ( $\Delta\%$ ). Сокращения регистрировали с использованием изотонического датчика 7006 и 4-канального цифрового рекордера при изотонической нагрузке в 0.5 г в однокамерной установке для работы с изолированными органами и тканями (UgoBasile, S.R.L., Италия) и программного обеспечения LabScribe3.0™ (iWorx Systems, Inc., США).

### 2.5.2 Метод изучения способности соединений ингибировать процессы агрегации тромбоцитов *in vitro*

Изучение влияния веществ на функциональную активность тромбоцитов *in vitro* проводили согласно методу Born G. [Born G. V. R., 1962] в модификации Габбасова З. А. [Габбасов З. А., 1989] на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов Биола 230 LA (НПФ Биола, Россия). Метод основан на регистрации степени изменений светопропускания плазмы, богатой тромбоцитами, при добавлении веществ, индуцирующих агрегацию, в условиях постоянного перемешивания, а также на анализе флюктуаций светопропускания, вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале.

Забор венозной крови проводили из краевой ушной вены кроликов породы Шиншилла. Полученную кровь стабилизировали 3,2% раствором цитрата натрия (рН 6,0) в соотношении 9:1. Для получения богатой тромбоцитами плазмы цитратную кровь центрифугировали при 1500 об./мин в течение 10 мин в центрифуге СМ-6М (Elmi, Латвия). Полученную плазму отбирали при помощи автоматической пипетки и переносили в отдельную чистую пластиковую пробирку.

Контрольную агрегацию тромбоцитов вызывали введением в кювету с плазмой (300 мкл) 30 мкл индуктора АДФ (5 мкмоль/л) после инкубации с дистиллированной водой в объеме 30 мкл. После введения индуктора регистрировали максимальную условную величину светопропускания на агрегометре «Биола» (НПФ Биола, Россия) в течение 5 мин, фиксировали данные контрольных показателей.

Аналогичным образом в другую кювету предварительно вносили водный раствор изучаемого вещества в объеме 30 мкл и инкубировали с плазмой в течение 5 мин при температуре 37°C, после инкубации добавляли 30 мкл АДФ (5 мкмоль/л) и регистрировали максимальную условную величину светопропускания на агрегометре «Биола» (НПФ Биола, Россия) в течение 5 мин, фиксировали данные опытных показателей. Активность соединений определяли, как отношение снижения уровня АДФ-индуцируемой агрегации тромбоцитов под действием изучаемого вещества относительно уровня АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов контрольных образцов (в  $\Delta\%$ ).

Вещества изучали в концентрации 100 мкмоль/л. Соединения с высоким уровнем активности исследовали в широком диапазоне концентраций (от 1 до 100 мкмоль/л). В качестве препарата сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту (Sigma, США) в тех же дозах.

### 2.5.3 Метод исследования антигликирующей активности веществ *in vitro*

Способность соединений подавлять неферментативное гликозилирование белков *in vitro* исследовали по методу [Jedsadayamata A., 2005] в модификации [Кузнецова В. А., 2014]. Реакцию гликирования белков моделировали в реакционной смеси, содержащей глюкозу (500 ммоль/л) и БСА (1 мг/мл), растворенные в 0,05 М фосфатном буферном растворе (рН 7,4). Для предупреждения бактериального роста в буферный раствор вносили азид натрия (Sigma, США) в конечной концентрации 0,02%. Все вещества растворяли в ДМСО. В исследуемые образцы добавляли изучаемые вещества и препарат сравнения в конечной концентрации 1 ммоль/л, в контрольные образцы добавляли соответствующий объем растворителя. Все образцы инкубировали 24 ч при 60°C в термостате BINDER BD 115 (Германия). После окончания инкубации определяли специфическую флуоресценцию гликированного БСА на спектрофлуориметре F-7000 (Hitachi, Япония) при  $\lambda_{ex}$  370 нм и  $\lambda_{em}$  440 нм. Антигликирующую активность рассчитывали по отношению к показателю флуоресценции контрольных образцов. В качестве вещества сравнения использовали ингибитор неферментативного гликозилирования аминоксантидин (Sigma, США) [Thornalley P. J., 2003].

### 2.5.4 Методы изучения регликирующей активности и способности соединений разрывать сшивки гликированных белков *in vitro*<sup>4</sup>

Исследования проводились с помощью двух экспериментальных моделей *in vitro*. Способность соединений регликовать гликированный БСА *in vitro* изучали по методу [Ratnasooriya W. D., 2014] в модификации [Спасов А. А., 2016г]. Реакцию гликирования белков моделировали в реакционной смеси, содержащей глюкозу (400 ммоль/л) и БСА (0,8 мг/мл), растворенные в 0,05 М фосфатном буферном растворе (рН 7,4). Для предупреждения бактериального роста в буферный раствор вносили азид натрия (Sigma, США) в конечной концентрации 0,02%. Смесь инкубировали при 60°C в течение 40 ч в термостате BINDER BD 115 (Германия). После окончания инкубации в пробирки типа эппендорф добавляли по 200 мкл смеси (БСА+глюкоза) с прибавлением 20 мкл 100% ТХУ (Fisher Scientific, США). После центрифугирования при 15000 об./мин в течение 4 мин в осажденный гликированный БСА добавляли до 300 мкл 0,05 М фосфатного буферного раствора (рН 7,4) и 30 мкл раствора

---

<sup>4</sup> Выражаем благодарность к.фарм.н. А. И. Ращенко за помощь в проведении исследования.



изучаемого вещества – реакционный объем 330 мкл – и инкубировали при 60°C в течение 40 ч в термостате BINDER BD 115 (Германия). Кроме того, было приготовлено аналогичное количество проб с негликированным неосажденным раствором БСА в количестве 300 мкл на каждую пробу, в которые также добавляли исследуемое вещество, и подвергали инкубации. Все вещества растворяли в ДМСО (Fisher Scientific, США). В исследуемые образцы добавляли изучаемые вещества в конечной концентрации 1 ммоль/л, в контрольные образцы – соответствующий объем растворителя. После окончания инкубации в пробирки добавляли 33 мкл 100% ТХУ, затем центрифугировали при 15000 об./мин в течение 4 мин при 37°C. Осажденные гликированный БСА и негликированный БСА растворяли в 1 мл фосфатного солевого буфера (pH 10,0) и определяли специфическую флуоресценцию пробных образцов на микропланшетном ридере Infinite M200 (Tecan, Швейцария) при  $\lambda_{ex}=370$  нм и  $\lambda_{em}=440$  нм. Способность исследуемых соединений регликировать гликированный альбумин рассчитывали по формуле (1),

$$Ac (\%) = ((F_c - F_b) - (F_s - F_{sb})) / (F_c - F_b) * 10 \quad (1)$$

где  $F_c$  – флуоресценция инкубированного БСА, глюкозы и ДМСО (контроль);  $F_b$  – флуоресценция инкубированного БСА (негликированного);  $F_s$  – флуоресценция инкубированных БСА, глюкозы и исследуемого вещества;  $F_{sb}$  – флуоресценция инкубированного БСА (негликированного) и исследуемого вещества.

В качестве вещества сравнения использовали ALT-711 (алагебриум) (Kailu Xingli Pharmaceutical Co., Ltd., Китай) [Vasan S., 2003].

Способность наиболее активных соединений разрывать поперечные сшивки гликированных белков *in vitro* оценивали с помощью эксперимента ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) по разрушению AGE (конечные продукты гликирования) сшивок БСА-коллаген [Ли С., 2012].

Сшивки AGE получали *in vitro* перекрестным сшиванием AGE-БСА в покрытом коллагеном из сухожилия крысиного хвоста 96-луночном микропланшете.

*Получение коллагена.* После эвтаназии у нелинейных крыс массой 200-250 г иссекали хвосты и получали коллаген при температуре 4°C следующим образом: вынимали коллагеновые волокна сухожилия хвоста, промывали физиологическим солевым раствором, удаляли ткани неколлагеновых волокон, трижды промывали дистиллированной деионизованной водой, разрезали на куски и погружали в 0,1% уксусную кислоту при 4°C на одну неделю, в течение которой иммерсионную жидкость часто взбалтывали. Иммерсионную жидкость подвергали обработке на центрифуге при 8000g в течение 30 минут и собирали супернатантный раствор коллагена. После разбавления измеряли содержание протеина. 96-луночный микропланшет (Costar) тщательно покрывали раствором коллагена в количестве 70 мкг/лунку при 4°C в течение

24 часов, затем пленкообразующий раствор удаляли. Пластины высушивали на воздухе, покрывали пленкой для сохранения свежести и хранили при 4°C до использования.

*Получение AGE-БСА (гликированного БСА).* Раствор, содержащий 50 мг/мл БСА (BioWest, Франция) и 0,5 М глюкозы в 0,2 М забуференном фосфатом физиологическом растворе (рН 7,4), инкубировали при 37°C в стерильных условиях в течение 3-4 месяцев для образования, таким образом, гликозилированного БСА, т.е. БСА-AGE. В то же время готовили негликозилированный БСА со свободным от глюкозы БСА. Затем БСА-AGE раствор диализировали против 0,01 М фосфатного буферного раствора (рН 7,4) для удаления непрореагировавшей глюкозы. Использовали флуоресцентное сканирование ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  (395/460 нм)) для контроля образования БСА-AGE.

*Исследование активности соединений.* Покрытый коллагеном 96-луночный микропланшет тщательно обрабатывали фосфатным буферным раствором (рН 7,4) в течение 1 часа для нейтрализации кислого коллагена. Затем планшет блокировали SuperBlock Blocking Buffer (Pierce Chemical Company, США) при 37°C в течение 1 часа и промывали фосфатным буферным раствором с Tween-20, трижды встряхивая в течение 1 минуты при каждом промывании. 100 мкл раствора БСА-AGE добавляли в лунки в ряды 96-луночного планшета, маркированные как А, В, С и D, и раствор БСА такой же концентрации добавляли в лунки в ряды, маркированные как Е, F, G и H. Лунки инкубировали при 37°C в течение 4 часов, чтобы обеспечить сшивание коллагена, и промывали фосфатным буферным раствором с Tween-20 четыре раза при встряхивании в течение 1 минуты при каждом промывании. Изучаемое соединение добавляли к выполненным в четырех экземплярах лункам с БСА-AGE и к выполненным в четырех экземплярах лункам с БСА в количестве 100 мкл/лунку. В первые три лунки в каждом ряду вместо вещества добавляли фосфатный буферный раствор (100 мкл/лунку) или другой растворитель (например, ДМСО). Лунки инкубировали при 37°C в течение 16 часов и промывали фосфатным буферным раствором с Tween-20, встряхивая в течение 1 минуты во время каждого промывания. В лунки добавляли кроличьи антитела (IgG) к БСА (Sigma, США) (1:500) 80 мкл/лунку и планшет инкубировали при 37°C в течение 50 минут. Далее в лунки добавляли 80 мкл/лунку козьих антител против кроличьего IgG, меченных пероксидазой корня хрена (1:1000). Лунки инкубировали при 37°C в течение 50 минут. После добавляли субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин в количестве 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 20 минут. Для прекращения реакции использовали 2 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. В течение 10 минут после окончания реакции регистрировали оптическую плотность при длине волны 450 нм на микропланшетном ридере Infinite M200 (Tecan, Швейцария) с пустыми лунками планшета, принятыми за 0.

Для каждого четырехкратного измерения вычисляли среднюю оптическую плотность (ОП).

Корректированная ОП = средняя ОП лунки БСА-AGE - средняя ОП лунки БСА.

Процент разрывания сшивок выражали в виде относительного уменьшения ОП: [(средняя ОП лунки с фосфатным буферным раствором - средняя ОП лунки с исследуемым соединением)/средняя ОП лунки с фосфатным буферным раствором] × 100%.

Вещества тестировали в дозе 0,1 и 1 ммоль/л, для анализа зависимости «доза-эффект» и расчета показателя IC<sub>50</sub> (полумаксимальной концентрации ингибирования) вещества изучали в диапазоне концентраций от 0,1 до 5 ммоль/л. В качестве вещества сравнения использовали ALT-711 (Kailu Xingli Pharmaceutical Co., Ltd., Китай), вводимый в пробы в аналогичных дозах.

#### 2.5.5 Метод оценки антиоксидантных свойств веществ *in vitro*

Антиоксидантную активность веществ изучали на модели аскорбат-индуцируемого перекисного окисления липидов (ПОЛ) по методу Ланкина В.З. и соавт. [Ланкин В. З., 1975]. Принцип метода заключается в том, что при добавлении аскорбиновой кислоты к субстрату происходит инициация свободно-радикального окисления липидов. Методика основана на определении интенсивности окраски, образующейся в ходе реакции между продуктами ПОЛ и 2-ТБК, которая протекает в кислой среде и при высокой температуре.

Исследования проводили на экстракте гомогената печени крыс при 37°C. За кинетикой ПОЛ, индуцируемого раствором аскорбиновой кислоты, следили по накоплению малонового диальдегида, определяемого с помощью раствора 2-ТБК спектрофотометрическим методом при длине волны 532 нм.

Пробы, содержащие 1 мл 4%-ного гомогената печени крыс, полученного в гомогенизаторе Поттера стеклянном с электрическим приводом МШ-2 (Россия) на 0,05 М Трис-НСl буфере (pH 7,4), 4 мл Трис-НСl буфера и 50 мкл раствора исследуемых веществ или препарата сравнения инкубировались в течение 10 мин при 37°C в бане серологической СБ-СЛ-01М (Россия). После иницирования реакции ПОЛ добавлением 50 мкл 50 ммоль/л аскорбиновой кислоты (Chemapol, Чехия) пробы инкубировались еще 15 мин при 37°C. Далее в пробах осаждали белок и прерывали реакцию ПОЛ добавлением 0,2 мл 50% раствора ТХУ (Fisher Scientific, США) к 1 мл инкубата. После центрифугирования проб при 3000 об./мин в течение 15 мин надосадочную жидкость отбирали и добавляли к ней 2 мл 0,8% раствора 2-ТБК (Fluka, Швейцария), затем кипятили 10 мин в серологической бане.

Оптическую плотность окрашенного продукта измеряли при длине волны 532 нм на спектрофотометре PD-303UV (APEL, Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм. Активность веществ выражали в процентах по отношению к пробе без соединения.

Вещества тестировали в дозе 10 мкмоль/л, для анализа зависимости «доза-эффект» и расчета показателя  $IC_{50}$  вещества изучали в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мкмоль/л. В качестве препаратов сравнения использовали тролокс (Sigma, США) и дибунол (Merck, Германия), вводимые в пробы в аналогичных концентрациях.

#### 2.5.6 Метод исследования влияния соединений на активность дипептидилпептидазы-4 *in vitro*

Для оценки ингибирующей активности соединений в отношении ДПП-4 вносили 40 мкл плазмы крови здоровых добровольцев в 50 мкл 0,1 М Трис-НСl буферного раствора (рН 8,0). В полученную смесь добавляли 10 мкл раствора исследуемого вещества заданной концентрации в Трис-буферном растворе и преинкубировали при 37°C в течение 5 мин в термостатируемом шейкере PST-60HL (Biosan, Латвия). Затем вносили в реакцию смесь 100 мкл 1 ммоль/л раствора субстрата дипептидилпептидазы-4 Гли-Про-*n*-нитроанилида (Sigma, США), и полученную смесь инкубировали 15 мин в термостатируемом шейкере при 37°C. Развитие желтого окрашивания из-за высвобождения 4-нитроанилина определяли по величине оптической плотности при длине волны 405 нм [Matheeuwssen V., 2012], используя микропланшетный ридер Infinite M200 (Tecan, Швейцария). В качестве препарата сравнения был выбран вилдаглиптин (Sigma, США) [Pi-Sunyer F. X., 2007].

#### 2.5.7 Метод исследования влияния соединений на активность гликогенфосфорилазы *in vitro*

Для оценки ингибирующей активности в отношении гликогенфосфорилазы 100 мкл 0,05 М буфера HEPES (рН 7,2), содержащего 100 ммоль/л KCl, 2,5 ммоль/л  $MgCl_2$ , 0,5 ммоль/л глюкозо-1-фосфата (Sigma, США), 1 мг/мл гликогена, инкубировали с 0,2 ЕД/мл мышечной гликогенфосфорилазы кролика (Sigma, США) и 5 мкл раствора исследуемого вещества при 30°C в термостатируемом шейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) в течение 30 мин. Затем добавляли в реакцию смесь 150 мкл раствора, содержащего 1.05%  $(NH_4)_2MoO_4$  и 0.034% малахитового зеленого, и через 20 мин измеряли количество высвобожденного неорганического фосфата. Определяли количество высвобожденного фосфат-аниона через 20 мин при 30°C по величине оптической плотности при длине волны 620 нм [Hess H. H., 1975], используя микропланшетный ридер Infinite M200 (Tecan, Швейцария). В качестве вещества сравнения был выбран экспериментальный ингибитор гликогенфосфорилазы – CP-316819 (Sigma, США) [Suh S. W., 2007]. Для определения активности исследуемых соединений и CP-316819 использовали их растворы в 14%-ном водном ДМСО, которые добавляли в реакцию смесь в концентрации 100 мкмоль/л, при этом в контрольную смесь вносили только растворитель.

### 2.5.8 Метод изучения влияния веществ на активность протеинтирозинфосфатазы 1В *in vitro*

Оценку способности соединений ингибировать РТР1В проводили по методу, описанному в работе [Lubben T., 2001]. Растворы исследуемых соединений, субстрата *n*-нитрофенилфосфата (pNPP) (Sigma, США) и фермента РТР1В (Sigma, США) готовили *ex tempore* в свежеприготовленном РТВ1В-рабочем буфере (4,7 г/л Трис-НСl, 2,4 г/л Трис-ОН, 8,7 г/л NaCl; рН 7,5), в который также добавляли раствор ДТТ в конечной концентрации 3 ммоль/л и 0.1 мг/мл БСА. При необходимости исследуемые вещества растворяли в 10%-ном ДМСО в РТВ1В-рабочем буфере (не более 1% ДМСО в конечной концентрации). Смесь 10 мкл раствора исследуемого соединения в конечной концентрации 100 мкмоль/л, 50 мкл 1.2 мкг/мл раствора РТР1В (конечная концентрация 7.9 нмоль/л) преинкубировали в термостатируемом шейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) при 30°C 10 мин. Затем для инициирования реакции добавляли 40 мкл субстрата реакции pNPP в конечной концентрации 2 ммоль/л. Далее перед повторной инкубацией измеряли оптическую плотность реакционной смеси при длине волны 405 нм на микропланшетном ридере Infinite M200 (Tecan, Швейцария). Затем реакционная смесь перемешивалась и инкубировалась в термостатируемом шейкере 20 мин при 30°C. Повторное измерение оптической плотности реакционной смеси проводили при длине волны 405 нм на микропланшетном ридере Infinite M200 (Tecan, Швейцария) и оценивали активность фермента по количеству образовавшегося *n*-нитрофенола. В качестве вещества сравнения использовали ингибитор РТР1В – NSC-87877 (Santa Cruz Biotechnology, США) [Song M., 2009].

### 2.5.9 Метод исследования действия соединений на активность АМФ-активируемой протеинкиназы *in vitro*

Реакционная смесь состояла из 50 нг АМПК (A1/B1/G1), 100 мкмоль/л АТФ, 100 мкмоль/л АМФ, 0.2 мг/мл SAMStide (HMRSAMSGHLHVKRR), полученного из мышинной ацетил-коэнзим А карбоксилазы  $\alpha$  (аминокислоты 73–85) в конечном объеме 25 мкл. Реакционный буферный раствор: 0,04 М Трис (рН 7,5), 20 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>, 0,1 мг/мл БСА, 50 ммоль/л ДТТ. Инкубация: 60 мин при 25°C в термостатируемом шейкере PST-60HL (Biosan, Латвия). Исследуемые вещества вносились в реакционную смесь в реакционном буферном растворе, содержащем 1,25% ДМСО и исследовались в конечной концентрации 100 мкМ в двух повторениях в соответствии с экспериментальным протоколом производителя реактивов [Hsiao B. K., 2015] в планшете 96-луночном белом (Thermo Scientific NUNC #165306, США). Детекция проводилась с помощью измерения люминесценции, используя микропланшетный ридер Infinite M200 (Tecan, Швейцария), время интегрирования составляло 500 мс. Активность фермента рассчитывалась по отношению к отрицательному контролю – 100 мкмоль/л АМФ, вызывающему максимальное АМФ-индуцированное активирование согласно предварительным исследованиям. В качестве

положительного контроля использовали AICAR (5-аминоимидазол-4-карбоксамид 1- $\beta$ -D-рибофуранозид) (Sigma, США) [Corton J. M., 1995].

#### 2.5.10 Метод изучения влияния веществ на активность глюкокиназы *in vitro*

Активность глюкокиназы (ГК человеческой печени рекомбинантная, экспрессированная в *E. coli*, Sigma, США) определяли посредством сопряженной реакции образования глюкозо-6-фосфата с генерацией NADH с помощью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ *L. mesenteroides*, 550-1100 ЕД/мг, Sigma, США). Анализ проводили при 37°C в 96-луночном прозрачном полистиреновом планшете с плоским дном (Costar 9018, США) в конечном инкубируемом объеме 210 мкл. Инкубационная смесь содержала: 0,025 М буфера HEPES (pH 7,2), 25 ммоль/л KCl, 5 ммоль/л D-глюкозы, 1 ммоль/л АТФ, 1,8 ммоль/л NAD, 2 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>, 1 ммоль/л ДТТ, тестируемое соединение или 5% раствор ДМСО, 1,8 ЕД/мл Г6ФДГ и 2 мкг/мл ГК. Исследуемые соединения вносили в 5%-ном ДМСО и предварительно инкубировали с ГК в термостатируемом шейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) в течение 10 мин до достижения температурного равновесия, а затем инициировали реакцию введением 10 мкл раствора D-глюкозы [Lu M., 2014]. За меру активности ГК принимали повышение оптической плотности при длине волны 340 нм в течение 20 мин инкубирования после начала реакции. Измерения проводили с помощью микропланшетного ридера Infinite M200 (Tecan, Швейцария).

Оценку полученных результатов для веществ проводили в сравнении данными литературы для экспериментального активатора ГК – RO4389620 [De Ceuninck F., 2013].

### 2.6 Метод изучения острой токсичности активных соединений

Важным этапом при изучении биологических свойств новых соединений является определение острой токсичности наиболее активных соединений. Расчет параметров токсичности, особенно величины LD<sub>50</sub>, необходимо для определения класса токсичности соединений, а также, для подбора доз при экспериментальном изучении фармакологической активности веществ в исследованиях *in vivo*.

Острую токсичность соединений определяли на 90 белых нелинейных мышах обоего пола массой 20-25 г при однократном в/б введении растворов веществ в воде. Максимальный объем жидкости, который вводили животным за один раз, не превышал 1 мл на 100 г массы тела. После введения соединений проводили наблюдение за поведением животных, фиксировали время появления, степень выраженности, продолжительность признаков интоксикации. В течение двух недель вели учет погибших и выживших животных. Для расчета величины токсикологического показателя LD<sub>50</sub> использовали пробит-анализ по методу Финни [Finney D. J., 1971].

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

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

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

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

## 2.8 Методы компьютерной обработки информации

### 2.8.1 Ландшафтный подход к визуализации многомерных данных. Сравнительный анализ ландшафтов

Для лучшего восприятия многомерных данных возможно их представление в виде наглядного двумерного изображения таким образом, чтобы на полученном изображении были видны основные закономерности, присущие исходному массиву данных: его общая структура, изначальное разделение на кластеры, и различные зависимости между признаками. Таким образом, многие задачи анализа и описания данных исследователем будут решаться с помощью непосредственного зрительного восприятия картины множества объектов [Зиновьев А. Ю., 2000].

В современной хемо- и биоинформатике есть различные подходы для визуализации многомерных данных, наглядно отражающие зависимость структура – биологическая активность набора соединений в отношении специфических мишеней, например, построение ландшафтов биологических активностей (*bioassay activity landscape modeling (англ.)*) [Peltason L., 2010; Guha R., 2012; Medina-Franco J. L., 2012]. Использование таких ландшафтов может играть ключевую роль в восприятии и понимании отношений структура-активность изучаемых веществ.

Для сравнения спектров 10 видов фармакологической активности изучаемые соединения (n=35) были разбиты на 4 класса: производные дифенилоксида (DPO), производные дифенила, сопряженные с неконденсированными азолами (DP), производных дифенила, сопряженные с бензимидазолом (DP+BI) и производные дифенила, сопряженные с имидазобензимидазолом (DP+ImBI), для которых были сформированы отдельные матрицы данных по нормированным

показателям активности. Нормирование необходимо для унификации данных по каждой из размерностей многомерного пространства; для этого уровень фармакологической активности каждого соединения (в %) был поделен на соответствующий показатель (в %) для вещества сравнения (телмисартана, ацетилсалициловой кислоты, аминоксантина, ALT-711, дибунола, вилдаглиптина, CP-316819, AICAR, NSC-87877 или RO4389620, соответственно). С использованием полученных нормированных значений, уровень которых варьировал от 0,0 до 3,5, были построены первичные ландшафты для 10-мерного пространства в программе Statistica 6.0 (Statsoft, США). По Y-оси ландшафта были представлены изученные виды активности в виде их сокращенных названий (АМПК – изменение активности АМПК; РТР1В – изменение активности РТР1В; DPP4 – изменение активности DPP4; GK – изменение активности глюкокиназы; GP – изменение активности гликогенфосфорилазы; MRI – изменение неферментативного гликозилирования белков; CLB – регликирующая активность; АОх – антиоксидантная активность; АТR1 – ангиотензиновая (АТ<sub>1</sub>) активность; ADP – влияние на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов), по Z-оси ландшафта находилась шкала нормированных значений биологической активности, уровню которых также соответствовал цвет от зеленого (менее активный) до красного (более активный).

После первичного построения ландшафтов из них были исключены показатели изменения АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, так как эти значения оказались значительно выше других и негативно отражались на целостном восприятии ландшафта. В конечном варианте были построены 5 ландшафтов для 9-мерного пространства – для каждой из групп (DPO, DP, DP+BI, DP+ImBI) по отдельности и всех вместе.

### 2.8.2 Медианное и супремальное оценивание перспективности классов изучаемых соединений

Показано, что математическое ожидание величины активности в ряду соединений одного и того же химического класса является показателем вклада базовой структуры в активность соединений данного ряда [Голендер В. Е., 1978]. В случае отсутствия информации о характере распределения, несмещенной и состоятельной оценкой математического ожидания является медиана (середина упорядоченного ряда наблюдений) [Глотов Н. В., 1982]

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

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

Второй составляющей в общей биологической активности соединения является суммарный вклад в эту активность заместителей, присоединенных к базовой химической структуре. Чем лабильнее основная химическая структура в отношении введения в нее заместителей, усиливающих или ослабляющих активность соединения, тем больше будет



дисперсия фармакологической активности в ряду исследуемых веществ. Поскольку поиск новых лекарственных средств ориентирован, прежде всего, на высокоактивные соединения, то для оценки перспективности анализируемого класса, с точки зрения усиления активности базовой структуры, имеет смысл рассматривать супремальные оценки ряда, то есть оценки, отражающие максимальные значения среди всех полученных величин фармакологической активности.

Наиболее естественным способом оценки вариабельности в данном случае является функция

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

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

При увеличении объема выборки функция максимума асимптотически приближается к супремуму функции, описывающей зависимость «структура – активность». Однако в эту величину входит также активность базовой структуры, отражаемая через медианную оценку. Следовательно, оценкой лабильности базовой структуры на введение в нее заместителей, усиливающих активность, будет показатель

$$\Delta (X) = \sup (X) - M (X).$$

Расчет медианных и супремальных оценок выполняли для нормированных показателей. Графики медианных оценок активности базовых структур  $M (X)$  и их оценок лабильности на введение заместителей  $\Delta (X)$  были построены с помощью Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office, США).

Таким образом, для оценки перспективности конкретного химического класса как источника веществ с высокой биологической активностью можно использовать оценку вклада базовой структуры, основанную на расчете медианы в ряду активности соединений. Степень влияния на базовую структуру вводимых в нее заместителей, усиливающих активность соединения, т.е. лабильность базовой структуры, будет отражать разница между супремальной и медианной оценками.

### 2.8.3 Многомерный дисперсионный анализ. Множественные сравнения. Сравнительная оценка привилегированности подструктур

На первом этапе с целью выявления различий между 4-мя химическими классами изучаемых соединений, содержащих в составе привилегированные структуры, был выполнен однофакторный многомерный дисперсионный анализ ANOVA всей исходной выборки с использованием критерия Уилкса в программе Statistica 6.0 (Statsoft, США). При этом в качестве независимых переменных выступали виды фармакологической активности, а в качестве факторов (зависимые переменные) – химические классы изучаемых соединений.

Многомерный дисперсионный анализ ANOVA используется для обнаружения основных эффектов и эффектов взаимодействия категориальных переменных в отношении множества зависимых интервальных переменных. ANOVA использует в качестве предикторов одну категориальную независимую переменную и тестирует различия в средних зависимой переменной в отношении различных категорий независимых переменных [McDonald J. H., 2014].

На следующем этапе для каждой переменной (вида активности) выполняли сравнения всех четырех групп в совокупности по нескольким статистическим критериям для того, чтобы оценить «чувствительность» конкретного показателя активности к изменению привилегированности базовой структуры соединения, – критерию Краскела-Уоллиса и хи-квадрат. Критерий Краскела-Уоллиса предназначен для проверки равенства  $k$  медиан нескольких выборок, и является непараметрической альтернативой однофакторному одномерному дисперсионному анализу, за исключением того, что этот критерий основан на рангах исходных значений, а не на средних [McDonald J. H., 2014]. Критерий хи-квадрат используется при проверке гипотез о согласии наблюдаемых выборочных данных с предполагаемым законом распределения случайной величины [Greenwood P. E., 1996]. По результатам сравнения для каждой активности присваивали индексы достоверности различий в баллах в зависимости от достоверности различия групп  $p$ : Ind = 0 – отсутствие влияния ( $p \geq 0,2$ ); Ind = 1 – очень слабое (тенденция) ( $0,1 < p < 0,2$ ); Ind = 2 – слабое недостоверное ( $0,05 < p < 0,1$ ); Ind = 3 – выраженное статистически достоверное ( $0,01 < p < 0,05$ ); Ind = 4 – сильное статистически достоверное ( $0,001 < p < 0,01$ ); Ind = 5 – очень сильное статистически достоверное ( $p < 0,001$ ).

Также для каждой переменной выполняли множественные парные сравнения групп между собой по Манну-Уитни и по медианному тесту для оценки влияния типа структуры на уровень активности. С помощью критерия Манна-Уитни проверяется гипотеза о равенстве средних рангов, а по медианному тесту для всех независимых выборок вычисляется общая медиана; затем подсчитывается, какое количество измеряемых величин находится ниже и выше медианы [Siegel S., 1988]. По результатам сравнения каждой пары групп по каждой активности также присваивали индексы достоверности Ind в зависимости от  $p$ -значений по шкале, описанной выше. Для каждой пары групп сумма значений Ind по всем видам активности являлась условным отражением изменения привилегированности при переходе от класса к классу.

По результатам всех сравнений по описанным выше статистическим критериям были рассчитаны средние ранги различий между 4-мя группами химических классов, которые в совокупности отражали вклад изменения привилегированной базовой структуры изучаемых соединений в общий уровень активности (отдельно по видам).

#### 2.8.4 Методы системной биологии. Биологические сети. Расчет антидиабетического функционала сетевого профиля новых соединений

Современная биология стала производителем огромного массива экспериментальных данных. Их осмысливание было бы невозможным без привлечения современных информационных технологий, эффективных методов анализа данных и моделирования биологических систем и процессов на различных уровнях организации живой материи: от молекулярно-генетического: включая организменный и заканчивая экосистемным и биосферным [Колчанов Н. А., 2008]. В качестве решения поставленных задач современной биологии возникает системная биология с ее интегративными экспериментальными подходами (системная транскриптомика, протеомика, метаболомика и др.) и привлечением методов биоинформатики.

Многие методы и подходы теоретической системной биологии могут напрямую использоваться для практических задач фармакологии. Одним из таких подходов является анализ сетевыми методами (*network analysis (англ.)*) [Chen S., 2016; Katsila T., 2016; Zhang W. J., 2016], который позволяет выбирать мишени и анализировать их эффективность на ранних этапах разработки соединений-кандидатов, подбирать оптимальное соотношение ингибирования/активирования мишеней для разработки средств с мультитаргетным действием, искать молекулярные основы показанной неэффективности соединений-кандидатов, а также планировать адекватную экспериментальную работу в исследованиях *in vivo*.

Построение сети, которая отражала взаимное влияние фармакологических активностей изученных соединений по результатам скрининговых исследований, проводилось в программе Gephi (The Gephi Consortium, Франция). При этом веса вершин соответствовали медианам нормированных значений фармакологической активности, а веса ребер – коэффициентам корреляции Спирмена (были указаны значимые величины с  $p \leq 0,1$ ). Связи между вершинами были обозначены цветом: синий соответствовал отрицательному влиянию активностей друг на друга, красный – положительному. Далее был рассчитан функционал сетевого профиля для всех испытанных соединений по следующей формуле

$$F_0 = \sum_{i=j+1}^L \sum_{j=1}^{L-2} (M_i + M_j) \cdot R_{ij},$$

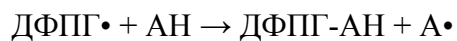
где  $M_i$ ,  $M_j$  – медианы нормированных значений  $i$ -го или  $j$ -го вида активности;  $R_{ij}$  – коэффициент корреляции Спирмена активностей  $i$  и  $j$ ;  $L$  – число видов активности; при этом полагали, что  $R_{ij} = 0$ , если его значимость  $p > 0,1$ .

Он отражает суммарную среднюю величину всех изученных видов активности с учетом их взаимного влияния друг на друга. Затем для каждого соединения были рассчитаны значения антидиабетического функционала сетевого профиля по фармакологической сети, построенной по данным для всех соединений. Для их расчета в выше приведенную формулу вместо значений

медиан вставляли нормированные значения фармакологической активности для конкретного соединения, при этом коэффициенты корреляции между видами активности оставались теми же. Полученный антидиабетический функционал сетевого профиля отражал способность соединения проявлять эффективный антидиабетический эффект в условиях целостного организма (с учетом положительного и отрицательного влияния различных видов активности друг на друга), т.е. его перспективность для изучения *in vivo*.

## 2.9 Методы изучения механизмов антиоксидантного действия наиболее активных соединений на моделях *in vitro*

Одним из способов оценки антиоксидантной активности (АОА) является колориметрия свободных радикалов, основанная на реакции ДФПГ• (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), растворенного в этаноле, с образцом антиоксиданта (АН) по схеме:



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

Антирадикальная активность (АРА) изучалась по способности веществ инактивировать свободный стабильный радикал 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ•) (Sigma, США) [Glavind J., 1963]. Использовался спиртовой раствор стабильного радикала ДФПГ•, который имеет максимум поглощения при длине волны 517 нм, исчезающий при добавлении веществ с антиоксидантными свойствами. Антирадикальную активность определяют по падению оптической плотности. Веществ изучались в концентрации 10 мкмоль/л. В качестве препарата сравнения использовали водорастворимый аналог токоферола – тролокс, вводимый в пробу в аналогичной концентрации.

Спиртовой раствор ДФПГ• готовили таким образом, чтобы экстинкция при длине волны 517 нм составила 0,5. Замеряли исходную экстинкцию, к полученному раствору ДФПГ• в объеме 2,7 мл добавляли 0,3 мл изучаемого вещества и далее измеряли оптическую плотность через 5 минут на спектрофотометре PD-303UV (APEL, Япония) при 517 нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см. После измерения добавлялся концентрированный 0,1 Н раствор  $\alpha$ -пирогаллола в объеме 50 мкл, который инициировал процесс окисления ДФПГ• до полного окончания реакции. Рассчитывали  $\Delta$  оптической плотности по отношению к пирогаллолу. Активность веществ сравнивали с контрольными показателями пирогаллола, который полностью подавляет радикал ДФПГ•.

Для исследования АРА соединений также применялась модель окисления 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS•) [Rice-Evans C., 1994]. Метод основан

на ингибировании антиоксидантными веществами окисления АВТС• (максимум поглощения при длине волны 660, 734 и 820 нм). При инкубации АВТС• с Нб и  $H_2O_2$  образуется относительно стабильный катион-радикал АВТС<sup>+</sup>, с максимумом поглощения при длине волны 734 нм. В присутствии антиоксидантов обнаруживается период индукции перед появлением окраски. Низкомолекулярные антиоксиданты задерживают образование окраски пропорционально своему количеству. Процесс подавления максимума поглощения фиксируется по временным интервалам и определяется спектрофотометрическим методом.

Раствор 0,612 ммоль/л перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) готовился *ex tempore* из 30% раствора методом разведений: в пробирку с 4,5 мл воды добавляли 0,5 мл 30% раствора  $H_2O_2$ , затем 0,1 мл приготовленного раствора приливали в пробирку с 4,9 мл воды. Раствор АВТС• (0,5 мг/мл) готовится заранее и хранится 2-3 месяца при 2-8°C. Раствор Нб (1 мг/мл) готовится *ex tempore* и хранится в течение дня при комнатной температуре.

Реакционная среда общим объемом 3 мл содержала 0,3 мл Нб (1 мг/мл) и 0,6 мл АВТС• (0,5 мг/мл) (Sigma, США) в фосфатном буфере (рН 6,8). В пробу вносили 0,3 мл исследуемого вещества в необходимой концентрации и добавляли 1,2 мл фосфатного буфера. Тщательно перемешивали и измеряли оптическую плотность при длине волны 734 нм, которая служила как фоновое значение, относительно которого проводились все дальнейшие измерения. После этого инициирование окисления АВТС• осуществляли введением 0,6 мл раствора  $H_2O_2$  (0,612 ммоль/л) в фосфатном буфере. Оптическую плотность измеряли при длине волны 734 нм в течение 30 мин с интервалом в 5 мин на спектрофотометре PD-303UV (APEL, Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 10 мм. В контрольном образце содержание фосфатного буфера увеличивалось до 1,5 мл. Активность веществ выражали в процентах по отношению к пробе без соединения на 10 мин реакции. Вещества тестировали в дозе 10 мкмоль/л, для анализа зависимости «доза-эффект» и расчета показателя  $IC_{50}$  вещества изучали в диапазоне концентраций от 10 до 100 мкмоль/л. В качестве вещества сравнения использовали тролокс (Sigma, США), вводимый в пробы в аналогичных концентрациях.

Метод исследования антирадикальной активности на модели гемоглобин (Нб)- $H_2O_2$ -люминол-зависимой хемилюминесценции. В данном методе АРА соединений исследовали на модели образования свободных радикалов в системе Нб- $H_2O_2$ -люминол с помощью измерения кинетики ее хемилюминесценции (ХЛ) [Теселкин Ю. О., 1997], которую регистрировали при 37°C в течение 10 мин на хемилюминометре Lum-100 (ООО «ДИСофт», Россия).

При взаимодействии с некоторыми реакционноспособными молекулами (свободные радикалы, активные формы кислорода) люминол подвергается окислению, в ходе которого испускаются кванты ХЛ. В связи с этим люминол используют в качестве *хемилюминесцентного зонда* на активные формы кислорода. При взаимодействии метгемоглобина и  $H_2O_2$  образуются

радикалы-инициаторы окисления люминола, в качестве которых выступают феррил-радикалы гемоглобина и гидроксильные радикалы.

Реакционная среда общим объемом 1 мл содержала 50 мкл Нв (0,2 мг/мл), 100 мкл люминола (конечная концентрация – 1 мкмоль/л) (Serva, Германия), 0,1 мл исследуемого вещества либо аналогичный объем буфера в контроле и фосфатный буфер (50 ммоль/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 мкмоль/л ЭДТА, рН 7,4) до общего объема 1 мл. Инициирование свободно-радикального окисления люминола осуществляли введением 50 мкл 0,025% раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  в фосфатном буфере, интенсивность ХЛ измеряли при 37°C в течение 10 мин на хемилюминометре Lum-100 (ООО «ДИСофт», Россия). В состав буфера добавляли ЭДТА, чтобы исключить разложение  $\text{H}_2\text{O}_2$  тяжелыми металлами, присутствующими в следовых количествах в воде и химических реактивах. Для всех полученных кинетических кривых ХЛ рассчитывали интеграл под кинетической кривой за время равное 10 мин. Активность веществ выражали в процентах по отношению к «контрольной кинетике» ХЛ модельной системы без добавления исследуемых соединений. Вещества тестировали в дозе 1 мкмоль/л, для анализа зависимости «доза-эффект» и расчета показателя  $\text{IC}_{50}$  вещества изучали в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мкмоль/л. В качестве вещества сравнения использовали тролокс (Sigma, США), вводимый в пробы в аналогичных концентрациях.

## 2.10 Исследование нефрозащитного действия наиболее активных соединений на модели экспериментального стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс<sup>5</sup>

Продолжительность эксперимента составила 90 дней. Дизайн исследования приведен в таблице 2.5.

На 60-й день после введения стрептозотоцина (STZ) животные были распределены на 4 группы по 5 шт. в каждой: интактная (животные без модельной патологии), контрольная (модельная патология без введения соединений), DF-5 (модельная патология и введение вещества DF-5), ALT-771 (модельная патология и введение вещества сравнения ALT-711).

Таблица 2.5 – Дизайн исследования.

Манипуляция	День эксперимента		
	1-60	61-90	91
Введение STZ 45 мг/кг	1		
Развитие патологии	1-60		
Контроль развития патологии		61	
Введение соединений		61-90	

<sup>5</sup> Морфологические исследования были проведены совместно с сотрудником кафедры патологической анатомии к.м.н. Н. Г. Паньшиным под руководством заведующего кафедрой д.м.н., профессора А. В. Смирнова, за что выражаем благодарность и глубокую признательность.

Продолжение табл. 2.5

Манипуляция	День эксперимента		
	1-60	61-90	91
Масса тела	1, и далее еженедельно	Еженедельно	
Определение концентрации глюкозы в крови	3, и далее ежедневно	Ежедневно	
Определение уровня гликированного гемоглобина HbA <sub>1c</sub>		90	
Определение суточной экскреции альбумина и уровня диуреза		90	
Эвтаназия			
Морфологические исследования почечной ткани			

Экспериментальную форму СД с формированием патологической картины диабетической нефропатии моделировали с помощью однократного в/в введения STZ в хвостовую вену в дозе 45 мг/кг крысам-самцам линии Sprague-Dawley массой 200-230 г [Wei M., 2003]. Перед применением STZ растворяли в холодном 0,1 М цитратном буферном растворе (pH 4,5). Количественное измерение концентрации глюкозы в плазме крови проводили на 3-и сутки после введения цитотоксина и далее ежедневно, в утренние часы, натощак, с помощью глюкометра «Глюкокард» (Россия), делая надрез кончика хвоста, в течение всего срока эксперимента продолжительностью 90 дней. В эксперимент включали животных с уровнем глюкозы натощак более 15 ммоль/л. Начиная с 60-го дня после индукции патологии, крысам ежедневно вводили тестируемые соединения в течение 30 дней.

#### Ход эксперимента

Животным интактной группы (без СД) 1 раз в сутки (в 9:00 часов) вводили в/ж через зонд 1% водный раствор КМЦ (Sigma, США), которую в свою очередь предварительно растворяли в чистой дистиллированной воде (1% раствор, т.е. 1 мг/100 мл воды).

Животным контрольной группы (СД без введения исследуемых веществ) 1 раз в сутки (в 9:00 часов) также вводили в/ж через зонд 1% водный раствор КМЦ.

Животным группы DF-5 (СД + DF-5) 1 раз в сутки (в 9:00 часов) в/ж через зонд вводили вещество DF-5 (12,5 мг/кг) в смеси с 1% водным раствором КМЦ.

Животным группы ALT-711 (СД + ALT-711) 1 раз в сутки (в 9:00 часов) в/ж через зонд вводили вещество ALT-711 (12,5 мг/кг) в смеси с 1% водным раствором КМЦ.

В ходе исследования для оценки фармакологической активности тестируемых соединений массу тела животных определяли еженедельно, а концентрацию глюкозы в крови – ежедневно. Также было проведено определение уровня гликированного гемоглобина HbA<sub>1c</sub> в цельной крови на 90-е сутки с использованием набора реагентов «Диабет-тест» (ООО Фосфосорб, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Влияние соединений на экскреторную функцию почек крыс-самцов со стрептозотоцин-индуцированным СД определяли на 90-е сутки, оценивая диурез (мл/кг/сутки), белок мочи (г/л), экскрецию белка (мг/кг/сутки). Для этого животных помещали на 24 часа в метаболические камеры для сбора мочи с целью исследования суточной экскреции альбумина с помощью набора для определения концентрации общего белка в моче и ликворе методом с пирогалловым красным (кат. В 06.03, Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

*Морфологические исследования.* По окончании эксперимента на 91-е сутки у животных после эвтаназии производили забор материала для исследования почки: производили исследование образцов ткани, взятых на уровне ворот почки. Вырезали продольные и поперечные фрагменты, включающие корковое и мозговое вещество. Образцы ткани фиксировали в течение 24 часов в 10%-ом растворе нейтрального забуференного формалина (рН 7,4), обезвоживали и заливали в парафин по общепринятой гистологической методике. На роторном микротоме изготавливали срезы толщиной 3-5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, по Массону, Sirius Red.

Для проведения иммуногистохимического исследования (ИГХ) использовались моноклональные антитела к фибронектину (GeneTex), конечным продуктам гликирования (AGEs) (Abcam) и рецепторам к конечным продуктам гликирования (RAGE) (GeneTex). Процедуры депарафинизации, демаскировки антигенов, визуализации, окрашивания гематоксилином проводили в соответствии с протоколами фирм производителей антител с последующим анализом иммунофенотипа.

Гистологические препараты фотографировали цифровой камерой Axiosam 105 color (Карл Цейс, Германия, 5 мегапикселей) на базе микроскопа Axiosam plus (Карл Цейс, Германия) с использованием объектива x10; x40 и окуляра x10. При морфологическом исследовании оценивали наличие изменений в почках в виде изменений соединительной ткани и наличия воспалительной инфильтрации. С помощью морфометрического метода исследования (с использованием программы «ZEN Pro 2012» (Карл Цейс, Германия) определяли площадь клубочка ( $\text{мкм}^2$ ), площадь соединительной ткани в клубочке ( $\text{мкм}^2$ ), площадь ИГХ позитивного материала в клубочке ( $\text{мкм}^2$ ).

## **2.11. Исследование гипогликемического действия наиболее активных соединений при введении интактным животным**

Предварительно перед изучением соединения AZH-141 на экспериментальной модели СД проводилось определение гипогликемического эффекта [Holland G. F., 1961] на половозрелых



нелинейных крысах-самцах (по 5 шт. в группе) массой 200-250 г, содержащихся в стандартных условиях вивария, с естественным световым режимом, при свободном доступе к пище и воде.

Изучение гипогликемического действия веществ проводилось на интактных животных, которые в течение 6 часов находились на свободном питьевом режиме при полной пищевой депривации. Исследуемое вещество AZH-141 и препарат сравнения метформин вводились однократно в/ж с помощью зонда в дозе 300 мг/кг. Контрольной группе животных вводился эквивалентный объем растворителя (1% водный раствор КМЦ) в/ж. Определение концентрации глюкозы проводилось в пробах, взятых из надреза кончика хвоста, перед введением изучаемых соединений и через 2, 4, 6 часов после введения с помощью биохимического анализатора Biosen C\_Line (EKF Diagnostics, Германия). Показателем гипогликемической активности служила величина концентрации глюкозы в крови (ммоль/л).

## 2.12 Исследование антидиабетогенного эффекта наиболее активных соединений на экспериментальной модели стрептозотцин-индуцированного сахарного диабета у крыс, находящихся на высокожировой диете<sup>6</sup>

Продолжительность эксперимента составила 42 дня. Дизайн исследования приведен в таблице 2.6.

На 7-й день после введения STZ животные были распределены на 3 группы по 5 шт. в каждой: контрольная (модельная патология + рацион «высокожировая диета» без введения соединений), AZH-141 (модельная патология + рацион «высокожировая диета» и введение соединения AZH-141), метформин (модельная патология + рацион «высокожировая диета» и введение препарата сравнения метформина).

Таблица 2.6 – Дизайн исследования.

Манипуляция	День эксперимента		
	1-14	15-21	22-42
Высокожировая диета			
Введение STZ 35 мг/кг		15	
Развитие патологии			
Контроль развития патологии		21	
Введение соединений			
Масса тела	1, 8	15	22, 29, 36, 42
Определение концентрации глюкозы в крови	1, 8	15, 21	22, 26, 31, 35, 42
Пероральный тест толерантности к глюкозе			42
Эвтаназия			42
Морфологические исследования жировой ткани			42

<sup>6</sup> Выражаем благодарность к.х.н. Д. А. Бабкову за помощь в проведении исследования.

Экспериментальную форму СД [Srinivasan K., 2005] моделировали с помощью однократного в/б введения раствора STZ в холодном 0,1 М цитратном буфере (pH 4,5) в дозе 35 мг/кг крысам-самцам линии Sprague-Dawley массой 200-230 г.

Перед инъекцией цитотоксина животные 2 недели получали высокожировую диету (58% жиров, 25% белка, 17% углеводов от общего количества калорий) наряду со стандартным рационом вивария. Данная модель приводит к развитию толерантности к глюкозе за счет нарушения ее утилизации на рецепторном уровне.

Высокожировая диета: комбикорм для крыс экструдированный (13000 кДж/кг; белок 19%, жиры 5%, клетчатка 4%, лизин 1,2%, метионин + цистеин 0,7%, кальций 0,6-0,9%, фосфор 0,6-0,9%, натрий 0,20-0,25%), жир свиной, казеин, метионин, витаминно-минеральный премикс «Ушастик» (Россия). В 1 кг премикса содержится витамина А – 1000000 МЕ, витамина D<sub>3</sub> – 300000 МЕ, витамина Е – 1,0 г, витамина В<sub>2</sub> – 0,6 г, витамина В<sub>12</sub> – 12 мг, железо – 20 г, медь – 4 г, марганец – 6 г, цинк – 10 г, кобальт – 0,08 г, йод – 0,4 г. Компоненты отвешивали в соответствии с таблицей 2.7 из расчета 30 г смеси на 1 животное в сутки, измельчали и смешивали до однородности. Хранили при +4 °С.

Таблица 2.7 – Состав высокожировой диеты.

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

Количественное измерение уровня глюкозы в плазме крови первый раз проводили через неделю после начала содержания крыс на высокожировой диете и далее еженедельно до начала эксперимента, в утренние часы, натощак, с помощью биохимического анализатора Biosen C\_Line (EKF Diagnostics, Германия), делая надрез кончика хвоста. Общий срок моделирования СД 2 типа у крыс на высокожировой диете составил 3 недели. В эксперимент включали животных с уровнем глюкозы натощак более 15 ммоль/л. Начиная с 7-го дня после введения STZ, крысам ежедневно вводили тестируемые соединения в течение 21 суток.

#### Ход эксперимента

Животным контрольной группы (СД + «высокожировая диета» без введения исследуемых субстанций) 1 раз в сутки (в 9:00 часов) вводили в/ж через зонд 1% водный раствор КМЦ.

Животным группы метформина (СД + «высокожировая диета» и введение метформина) 1 раз в сутки (в 9:00 часов) вводили в/ж через зонд метформин (450 мг/кг) в смеси с 1% водным раствором КМЦ.

Животным группы AZH-141 (СД + «высокожировая диета» и введение AZH-141) 1 раз в сутки (в 9:00 часов) в/ж через зонд вводили вещество AZH-141 (30 мг/кг) в смеси с 1% водным раствором КМЦ.

В ходе исследования для оценки фармакологической активности тестируемых соединений массу тела животных определяли еженедельно, а концентрацию глюкозы в крови – на 1-е, 5-е, 10-е, 15-е и 21-е сутки введения.

Для оценки изменения толерантности к глюкозе проводили стандартный пероральный тест толерантности к глюкозе (ПГТТ). Тест проводили на 21-е сутки в 12:00, т.е. через 3 часа после введения исследуемых веществ. ПГТТ проводили на неанестезированных крысах, голодавших с 9:00. Животным в/ж вводили раствор глюкозы в концентрации, эквивалентной 2 г/кг веса животного. Производился последовательный забор образцов крови из хвостовой вены перед (0 минут) и спустя 15, 30, 60, 90 и 120 минут после введения глюкозы. Сразу после забора крови проводили измерение концентрации глюкозы в плазме.

По окончании эксперимента на 21-е сутки у животных после эвтаназии производили забор белой жировой ткани (ретроперитонеальной, эпидидимальной и мезентериальной), образцы промывались физиологическим раствором и взвешивались.

### **2.13 Методы статистической обработки**

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

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

### ГЛАВА 3. ПОИСК НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СРЕДИ ЛИНКЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БИФЕНИЛА И НЕКОНДЕНСИРОВАННЫХ АЗОЛОВ

#### 3.1 Изучение антиангиотензинового (AT<sub>1</sub>) действия соединений

Изучение уровня ингибирования AT II-индуцированной сократительной активности изолированной портальной вены крыс было проведено для 7 соединений, содержащих подструктуру бифенила, под лабораторными шифрами «AZHT», «LOSAZ», «RUI» из которых 2 вещества относятся к бромидам 4-метил- и 4,5-диметил-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазола, 5 соединений – бромиды 1-R<sub>1</sub>-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]имидазолия.

В таблице 3.1 приведены результаты тестирования веществ на данной активности. При этом эффект препарата сравнения телмисартана составил 99,3%. Проведенные исследования позволили установить, что как AT<sub>1</sub>-ингибиторы все изученные соединения являются неактивными, так как не было обнаружено статистически достоверных различий их AT<sub>1</sub>-ингибирующей активности с показателями контроля в концентрации 10 мкмоль/л.

#### 3.2 Влияние соединений на процесс АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов

У изученных соединений был выявлен различный уровень влияния на функциональную активность тромбоцитов в концентрации 100 мкмоль/л. В таблице 3.1 приведены результаты блокирующего влияния соединений на АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированную агрегацию тромбоцитов. Антиагрегантный эффект препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты составил 27,8%. Из 7 изученных веществ наиболее активным оказалось 4-бромбифенилсодержащее производное тиазола (AZHT-9). Так, вещество AZHT-9 достоверно блокировало АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированную агрегацию тромбоцитов кролика на 73,9%, превосходя препарат сравнения в 2,7 раза, соответственно. Соединения под шифром AZHT-7, LOSAZ-33, LOSAZ-34 по проявленной активности были сравнимы с ацетилсалициловой кислотой. Производные имидазолия RUI-25, RUI-26, RUI-27, содержащие атом водорода вместо атома брома в 4 положении бифенила, уступали по антиагрегантной активности препарату сравнения в 2,6, 2,2 и 1,6 раза, соответственно (табл. 3.1).

В результате проведенного исследования способности ряда производных бифенила ингибировать агрегацию тромбоцитов из 7 соединений было отобрано для дозозависимого изучения бромид 4,5-диметил-3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазол-3-ил под шифром AZHT-9, проявивший наиболее высокую активность.

Таблица 3.1 – Влияние имидазольных и тиазольных производных бифенила на выраженность АТ<sub>1</sub>-опосредованного сосудистого спазма и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Соединения	Изменение сосудистого спазмогенного эффекта ангиотензина II (M±m), Δ%	Изменение АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированной агрегации тромбоцитов, (M±m), Δ%
1	2	3
<b>Бромиды 4-метил- и 4,5-диметил-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазола</b>		
AZHT-7	12,7±12,7	32,2±14,7*
AZHT-9	6,3±4,4	73,9±7,6*
<b>Бромиды 1-R<sub>1</sub>-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]имидазолия</b>		
LOSAZ-33	7,9±7,9	35,5±3,5*
LOSAZ-34	0,0	28,1±8,7*
RUI-25	0,0	10,9±1,7*
RUI-26	13,0±13,0	12,6±1,7*
RUI-27	0,0	17,2±4,7*
<b>Вещества сравнения</b>		
Телмисартан	99,3±1,0*	–
АСК	–	27,8±3,1*

Примечание: АСК – ацетилсалициловая кислота; концентрация изучаемых соединений при определении антиагрегантной активности составляла 100 мкмоль/л, при определении антиангиотензиновой (АТ<sub>1</sub>) активности – 10 мкмоль/л; \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни, p<0,05).

### 3.3 Изучение антигликирующей активности соединений

В ходе проведенных экспериментов было показано, что среди изученных производных бифенила 5 веществ обладают антигликирующей активностью (табл. 3.2). При этом эффект вещества сравнения аминогуанидина составил 57,8%. Соединения AZHT-7, AZHT-9, LOSAZ-33, LOSAZ-34, RUI-25 достоверно подавляли специфическую флуоресценцию гликированного БСА в диапазоне от 16,9 до 47,3%. Изученные вещества проявили средний и низкий уровень антигликирующей активности и уступали по данному показателю веществу сравнения аминогуанидину.

### 3.4 Изучение регликирующей активности соединений

Исследование способности соединений регликовать гликированный БСА *in vitro* проводили по предварительно разработанному и валидированному методу [Спасов А. А., 2016г]. Активность вещества сравнения ALT-711 на данной модели составила 18,0%. При изучении регликирующего действия было обнаружено одно соединение (AZHT-9), активность которого статистически достоверно отличалась от контроля. Однако уровень активности AZHT-9 не превышал соответствующий уровень регликирующего действия ALT-711 (табл. 3.2).

### 3.5 Действие производных бифенила на аскорбат-зависимое перекисное окисление липидов

Показано, что соединения AZHT-9, RUI-26 и RUI-27 проявили низкий уровень антиоксидантной активности, оказавшийся более чем в 7,2 раза ниже уровня аналогичной активности вещества сравнения дибунола (табл. 3.2).

Таблица 3.2 – Антигликирующие, регликирующие и антиоксидантные свойства имидазольевых и тиазольевых производных бифенила.

Соединения	Изменение неферментативного гликозилирования белков (M±m), %	Регликирование гликированного БСА (M±m), %	Антиоксидантная активность (ингибирование аскорбат-зависимого ПОЛ) (M±m), %
1	2	3	4
<b>Бромиды 4-метил- и 4,5-диметил-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазола</b>			
AZHT-7	47,3±8,2*	5,8±0,5	0,4±1,3
AZHT-9	19,5±7,4*	12,7±0,3*	12,8±1,2*
<b>Бромиды 1-R<sub>1</sub>-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]имидазолия</b>			
LOSAZ-33	24,2±1,2*	5,9±0,5	0,9±0,3
LOSAZ-34	36,5±2,2*	7,3±0,3	7,8±1,3
RUI-25	16,9±7,2*	0,4±0,2	1,7±0,4
RUI-26	-17,7±7,4	-0,3±0,1	13,5±1,8*
RUI-27	0,9±3,6	1,5±0,5	10,9±0,1*
<b>Вещества сравнения</b>			
Аминогуанидин	57,8±0,6*	–	–
ALT-711	–	18,0±0,5*	–
Дибунол	–	–	93,0±0,8*

Примечание: концентрация изучаемых соединений при определении антигликирующей и регликирующей активности составила 1 ммоль/л, при определении антиоксидантной активности – 10 мкмоль/л; \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни, p<0,05).

### 3.6 Исследование влияния соединений на активность дипептидилпептидазы-4

При изучении влияния соединений на активность ДПП-4 было найдено три соединения, активность которых статистически достоверно отличалась от показателей контроля. Показано, что изученные имидазольевые и тиазольевые производные бифенила AZHT-7, RUI-25, RUI-26 проявили низкий уровень ДПП-4-ингибирующей активности, оказавшийся более чем в 5,4 раза ниже уровня аналогичной активности препарата сравнения вилдаглиптина (табл. 3.3). В качестве ингибиторов ДПП-4 все протестированные соединения в целом являются малоэффективными.

### 3.7 Действие веществ на активность гликогенфосфорилазы

Ни для одного из представленных соединений активность в отношении гликогенфосфорилазы не отличалась статистически достоверно от контроля. В то время как активность экспериментального ингибитора гликогенфосфорилазы CP-316819 составила 94,1%.

В качестве ингибиторов гликогенфосфорилазы все протестированные соединения являются неэффективными (табл. 3.3).

### 3.8 Влияние соединений на активность протеинтирозинфосфатазы 1В

Изучение биологических свойств веществ показало, что имидазолиевые и тиазолиевые производные бифенила незначительно ингибируют РТР1В и уступают по активности веществу сравнения, экспериментальному ингибитору РТР1В, NSC-87877, активность которого на данной модели составила 68,9% (табл. 3.3). Только для четырех исследованных соединений ингибирующая активность в отношении РТР1В статистически достоверно отличалась от контроля. Наибольший уровень активности на данной модели, который оказался в 4 раза ниже уровня аналогичной активности NSC-87877, был обнаружен у бромида 4,5-диметил-3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазол-3-ил (AZHT-9).

Таблица 3.3 – Влияние имидазолиевых и тиазолиевых производных бифенила на активность ферментов гликогенфосфорилазы, ДПП-4, РТР1В, АМРК и глюкокиназы.

Соединения	Изменение активности ферментов (M±m), %				
	ДПП-4	Гликогенфосфорилаза	РТР1В	АМРК	Глюкокиназа
1	2	3	4	5	6
<b>Бромиды 4-метил- и 4,5-диметил-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазола</b>					
AZHT-7	12,7±4,0*	13,2±12,9	5,1±4,1	94,2±3,7*	9,2±1,5
AZHT-9	5,5±3,5	-6,3±15,3	17,2±0,3*	87,2±1,8*	4,8±6,7
<b>Бромиды 1-R<sub>1</sub>-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]имидазолия</b>					
LOSAZ-33	8,8±3,9	11,6±12,0	13,9±5,0*	146,2±6,0*	2,5±2,8
LOSAZ-34	6,0±6,0	13,1±8,6	12,4±1,3*	3,2±0,6	6,1±7,0
RUI-25	13,6±2,2*	14,1±10,9	5,8±1,9	...	1,8±1,6
RUI-26	18,2±5,7*	-2,4±8,1	4,7±8,9	140,0±7,4*	1,1±4,3
RUI-27	10,9±6,5	11,5±10,0	13,1±3,9*	113,2±13,2*	9,4±4,8
<b>Вещества сравнения</b>					
Вилдаглиптин	97,8±1,8*	–	–	–	–
CP-316819	–	94,1±4,8*	–	–	–
NSC-87877	–	–	68,9±7,3*	–	–
AICAR	–	–	–	178,1±6,4*	–
RO4389620	–	–	–	–	171,0 <sup>&amp;</sup>

Примечание: концентрация исследуемых соединений составила 100 мкмоль/л; ... – не исследовалось; <sup>&</sup> – по данным литературы; \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни, p<0,05).

### 3.9 Изучение влияния соединений на активность АМФ-активируемой протеинкиназы

Все изученные соединения продемонстрировали различный уровень влияния на активность АМРК в концентрации 100 мкмоль/л. В таблице 3.3 приведены результаты активирующего влияния исследованных соединений на АМРК. Активирующий эффект вещества сравнения AICAR составил 178,1%. Из 7 изученных веществ наиболее активными оказались

соединения под шифрами AZHT-7, AZHT-9, LOSAZ-33, RUI-26, RUI-27. Максимальные эффекты были отмечены у бромидов N<sup>1</sup>-замещенного-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]имидазолия LOSAZ-33 и RUI-26 (146,2% и 140,0% активирование, соответственно).

### 3.10 Действие соединений на активность глюкокиназы

В качестве активаторов глюкокиназы все изученные соединения являются неэффективными (табл. 3.3). Ни для одного из протестированных веществ активирующее действие на глюкокиназу не отличалось статистически достоверно от контроля. При этом согласно данным литературы эффект известного экспериментального активатора глюкокиназы RO4389620 составил 171,0% [De Ceuninck F., 2013].

### 3.11 Анализ взаимосвязи между структурой и фармакологической активностью изучаемых соединений

При оценке зависимости активности от химической структуры в ряду изучаемых соединений, содержащих подструктуру бифенила, под лабораторными шифрами «AZHT», «LOSAZ», «RUI» из которых 2 вещества относятся к бромидам 4-метил- и 4,5-диметил-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазола, 5 соединений – бромиды 1-R<sub>1</sub>-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]имидазолия были обнаружены некоторые закономерности.

У исследованных соединений выявлен различный уровень влияния на АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированную агрегацию тромбоцитов кролика. Среди изученных бромидов 4-метил- и 4,5-диметил-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазола отмечены четко выраженные закономерности, связанные с заменой в C<sup>4</sup>- и C<sup>5</sup>-положениях тиазола различных радикалов. Наиболее активным соединением оказалось соединение AZHT-9, содержащее метил в C<sup>4</sup>-, C<sup>5</sup>-положениях тиазола, и атом брома в 4-ом положении бифенила.

Среди бромидов N<sup>1</sup>-замещенного-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]имидазолия наибольший антиагрегантный эффект проявило соединение LOSAZ-33, у которого в качестве заместителя в N<sup>1</sup>-положении имидазола находилась метильная группа, а в 4-ом положении бифенила – атом брома. Замена метильного радикала на винильный в N<sup>1</sup>-положении имидазола приводила к незначительному снижению антиагрегантной активности у соединения LOSAZ-34. Низкий значимый уровень активности был отмечен у веществ под шифром «RUI», содержащих атом водорода вместо атома брома в 4-ом положении бифенила.

При оценке зависимости антигликирующей активности от химической структуры также были выявлены некоторые закономерности. В молекуле AZHT-7 с метильным заместителем в C<sup>4</sup>-положении тиазола, а также метилом в 4-ом положении бифенила антигликирующая



активность была значительно выше, чем у второго изученного бромида 4-метил- и 4,5-диметил-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазола AZHT-9.

Среди бромидов N<sup>1</sup>-замещенного-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]имидазолия наибольший антигликирующий эффект был отмечен у соединения LOSAZ-34 с винильным радикалом в N<sup>1</sup>-положении имидазола, чуть меньший эффект проявило соединение LOSAZ-33 с метильной группой в N<sup>1</sup>-положении имидазола. Наименьший значимый уровень антигликирующей активности показан для соединения RUI-25, содержащего атом водорода вместо атома брома в 4-ом положении бифенила и метильный радикал в N<sup>1</sup>-положении имидазола.

Исследованные соединения проявили различный уровень активирующего действия в отношении АМРК. Из изученных линкерных производных наибольшее количество активных соединений было обнаружено в группе бромидов N<sup>1</sup>-замещенного-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]имидазолия (LOSAZ-33, RUI-26, RUI-27). Внутри группы самый высокий уровень активности выявлен у соединения LOSAZ-33, содержащего метильную группу в N<sup>1</sup>-положении имидазола и атом брома в 4-ом положении бифенила. Также сходный чуть менее высокий уровень активности был отмечен у изученных бромидов 4-метил- и 4,5-диметил-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазола (AZHT-7, AZHT-9).

У нескольких изученных имидазолиевых и тиазолиевых производных бифенила выявлены статистически значимые антиоксидантные, регликирующие, ингибирующие РТР1В и ДПП-4 свойства. Однако, в скрининговых концентрациях процент активности данных соединений составил не более 20%.

### **3.12 Определение показателя EC<sub>50</sub> наиболее активных соединений**

Для соединения с наибольшим уровнем подавления АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированной агрегации тромбоцитов, бромида 4,5-диметил-3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазол-3-ил (AZHT-9), была определена его полумаксимальная эффективная концентрация. Так, показатель EC<sub>50</sub> для указанного вещества был значительно ниже, чем у соответствующего препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты.

Таким образом, соединение AZHT-9 по показателю EC<sub>50</sub> превосходит препарат сравнения в 350 раз (табл. 3.4).

Таблица 3.4 – Влияние соединения под шифром AZHT-9 на АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro*.

Шифр	% ингибирования агрегации тромбоцитов (M±m)				EC <sub>50</sub> , мкмоль/л, (R <sup>2</sup> )
	Концентрация, 1 ммоль/л	Концентрация, 100 мкмоль/л	Концентрация, 10 мкмоль/л	Концентрация, 1 мкмоль/л	
AZHT-9	...	73,88±7,55 <sup>*#</sup>	53,15±9,73 <sup>*#</sup>	42,41±3,29 <sup>*#</sup>	3,25 (0,92)
АСК	49,22±9,76 <sup>*</sup>	27,81±3,09 <sup>*</sup>	9,78±1,69 <sup>*</sup>	0,0	1140 (0,99)

Примечание: АСК – ацетилсалициловая кислота; ... – не изучалось; \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо ( $p < 0,05$ , критерий Краскела-Уоллиса с постестом Данна); # – отличие относительно показателя ацетилсалициловой кислоты статистически значимо ( $p < 0,05$ , критерий Краскела-Уоллиса с постестом Данна).

### 3.13 Заключение

В результате проведенного поиска соединений с высоким уровнем биологической активности среди 7 новых линкерных имидазольных и тиазольных производных бифенила и изучения зависимости фармакологической активности соединений от их химической структуры было выявлено, что данные производные способны проявлять антиагрегантное, антигликирующее и активирующее действие в отношении АМПК различной степени выраженности.

На основании проведенных исследований было установлено, что бромид 4,5-диметил-3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазол-3-ил характеризуется наличием выраженного антиагрегантного действия, умеренной активирующей активностью в отношении АМФ-активируемой протеинкиназы, а также слабыми антигликирующими, регулируемыми и РТР1В-ингибирующими свойствами. Данное высокоактивное соединение под шифром AZHT-9 превосходит препарат сравнения ацетилсалициловую кислоту по показателю EC<sub>50</sub> в 350 раз, что делает его перспективным соединением для дальнейших исследований *in vivo*.

**ГЛАВА 4. ПОИСК НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СРЕДИ  
ЛИНКЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БИФЕНИЛА, СОПРЯЖЕННЫХ С  
КОНДЕНСИРОВАННЫМИ АЗОЛАМИ**

**4.1 Изучение ангиотензинового (AT<sub>1</sub>) действия в ряду производных бифенила, содержащих подструктуру бензимидазола**

Изучение влияния на ангиотензиновые AT<sub>1</sub>-рецепторы проводилось для 14 соединений, содержащих 2 привилегированные подструктуры – бифенил и бензимидазол, под лабораторными шифрами «AZH», «DF» из которых 5 веществ относятся к 1-диалкиламиноалкил-3-бифенил-2-иминобензимидазолинам, одно соединение представляет собой бромид 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия, 7 соединений – 9-замещенные 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолы, еще одно соединение является 4'-(2,3-дигидро-9*H*-имидазо[1,2-*a*]бензимидазол-9-ил-метил)бифенил-2-карбонитрилом.

При изучении влияния соединений на активность AT<sub>1</sub>-рецепторов было найдено два вещества, активность которых статистически достоверно отличалась от показателей контроля. Показано, что соединения AZH-141 и AZH-143 проявили низкий уровень AT<sub>1</sub>-ингибирующей активности, 14,3% и 21,9%, соответственно, оказавшийся более чем в 4,5 раза ниже уровня аналогичной активности препарата сравнения телмисартана. В таблицах 4.1 и 4.2 приведены полные результаты тестирования веществ в концентрации 10 мкмоль/л на данной активности. Проведенные исследования позволили установить, что как AT<sub>1</sub>-ингибиторы изученные соединения в целом являются малоактивными.

Таблица 4.1 – Влияние производных бифенила, сопряженных с бензимидазолом, на выраженность AT<sub>1</sub>-опосредованного сосудистого спазма и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Соединения	Изменение сосудистого спазмогенного эффекта ангиотензина II (M±m), Δ%	Изменение АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированной агрегации тромбоцитов, (M±m), Δ%
1	2	3
<b>Гидробромиды 1-диалкиламиноалкил-3-бифенил-2-иминобензимидазолины</b>		
AZH-133	2,7±0,8	48,3±13,8*
AZH-134	0,0	52,2±13,4*
AZH-135	0,0	6,9±2,7
AZH-136	1,73±0,52	77,3±8,7*
AZH-141	14,35±0,32*	89,4±4,9*
<b>Бромид 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия</b>		
AZH-137	0,0	46,5±8,4*
<b>Вещества сравнения</b>		
Телмисартан	99,3±1,0*	–

Продолжение табл. 4.1

Соединения	Изменение сосудистого спазмогенного эффекта ангиотензина II ( $M \pm m$ ), $\Delta\%$	Изменение АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированной агрегации тромбоцитов, ( $M \pm m$ ), $\Delta\%$
1	2	3
АСК	–	27,8 $\pm$ 3,1*

Примечание: АСК – ацетилсалициловая кислота; концентрация изучаемых соединений при определении антиагрегантной активности составляла 100 мкмоль/л, при определении антиангиотензиновой (АТ<sub>1</sub>) активности – 10 мкмоль/л; \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ).

#### 4.2 Влияние соединений на процесс АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов

У всех изученных соединения обнаружен различный уровень влияния на функциональную активность тромбоцитов в концентрации 100 мкмоль/л. В таблицах 4.1 и 4.2 приведены результаты блокирующего влияния соединений на АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированную агрегацию тромбоцитов. Антиагрегантный эффект препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты составил 27,8%. Из 14 изученных веществ наиболее активными оказались соединения под шифрами AZH-141 и AZH-136. Так, вещества AZH-141 и AZH-136 достоверно блокировали АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированную агрегацию тромбоцитов кролика на 89,4% и 77,3%, превосходя препарат сравнения в 3,2 и 2,8 раза, соответственно. Соединения AZH-133, AZH-134, AZH-137, AZH-143 также достоверно ингибировали функциональную активность тромбоцитов в диапазоне от 46,5 до 57,1%, превосходя ацетилсалициловую кислоту. Вещества под шифрами DF-1, DF-7 уступали по антиагрегантной активности препарату сравнения в 1,5 раза (табл. 4.1, 4.2).

В результате проведенного исследования способности ряда производных бифенила и бензимидазола ингибировать агрегацию тромбоцитов из 14 соединений было отобрано для дозозависимого изучения два соединения под шифрами AZH-141 и AZH-136, проявившие наиболее высокую активность.

Таблица 4.2 – Влияние производных бифенила, сопряженных с имидазобензимидазолом, на выраженность АТ<sub>1</sub>-опосредованного сосудистого спазма и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Соединения	Изменение сосудистого спазмогенного эффекта ангиотензина II ( $M \pm m$ ), $\Delta\%$	Изменение АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированной агрегации тромбоцитов, ( $M \pm m$ ), $\Delta\%$
1	2	3
4'-(2,3-дигидро-9H-имидазо[1,2-a]бензимидазол-9-ил-метил)бифенил-2-карбонитрил AZH-143	21,9 $\pm$ 8,9*	57,1 $\pm$ 8,1*

Продолжение табл. 4.2

Соединения	Изменение сосудистого спазмогенного эффекта ангиотензина II ( $M \pm m$ ), $\Delta\%$	Изменение АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированной агрегации тромбоцитов, ( $M \pm m$ ), $\Delta\%$
1	2	3
<b>9-замещенные 2-дифенилимидазо[1,2-<i>a</i>]бензимидазолы</b>		
DF-1	0,0	17,7 $\pm$ 4,3*
DF-2	0,0	2,0 $\pm$ 1,6
DF-4	0,0	6,1 $\pm$ 2,4
DF-5	0,0	-16,4 $\pm$ 1,4
DF-6	0,0	1,6 $\pm$ 1,1
DF-7	0,0	18,2 $\pm$ 2,8*
DF-8	0,0	9,4 $\pm$ 0,5*
<b>Вещества сравнения</b>		
Телмисартан	99,3 $\pm$ 1,0*	–
АСК	–	27,8 $\pm$ 3,1*

Примечание: АСК – ацетилсалициловая кислота; концентрация изучаемых соединений при определении антиагрегантной активности составляла 100 мкмоль/л, при определении антиангиотензиновой (АТ<sub>1</sub>) активности – 10 мкмоль/л; \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ).

#### 4.3 Изучение антигликирующей активности соединений

В результате проведенных экспериментов показано, что среди изученных производных бифенила, сопряженных с бензимидазолом, 3 вещества обладают антигликирующей активностью (табл. 4.3, 4.4). Соединения AZH-137, DF-7, DF-8 достоверно подавляли специфическую флуоресценцию гликированного БСА в диапазоне от 13,4 до 22,0%. При этом активность вещества сравнения известного ингибитора неферментативного гликозилирования аминоксидина составила 57,8%. Изученные вещества проявили средний и низкий уровень антигликирующей активности и уступали веществу сравнения аминоксидину.

#### 4.4. Изучение регликирующей активности соединений

При изучении регликирующего действия было обнаружено ряд соединений с высокой эффективностью. Наиболее выраженное действие на данной модели обнаружено у вещества DF-5. Активность вещества сравнения ALT-711 на данной модели составила 18,0% в концентрации 1 ммоль/л. Соединение DF-5 достоверно регликировало гликированный БСА, полученный по описанной ранее методике, на 45,4%, превосходя ALT-711 в 2,5 раза. Соединение под шифром DF-4 по уровню проявленного эффекта было сопоставимо с ALT-711. Вещества под шифрами DF-1 и DF-6 уступали по регликирующей активности ALT-711 в 1,5 раза (табл. 4.4).

Таким образом, для дозозависимого изучения способности регулировать гликированный БСА был выбран 9-бензил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол под шифром DF-5, для которого показана наиболее высокая активность на данной модели.

Таблица 4.3 – Антигликирующие, регулирующие и антиоксидантные свойства производных бифенила, сопряженных с бензимидазолом.

Соединения	Изменение неферментативного гликозилирования белков (M±m), %	Регликирование гликированного БСА (M±m), %	Антиоксидантная активность (ингибирование аскорбат-зависимого ПОЛ) (M±m), %
1	2	3	4
<b>Гидробромиды 1-диалкиламиноалкил-3-бифенил-2-иминобензимидазолины</b>			
AZH-133	-11,9±6,2	0,8±1,3	11,0±0,5*
AZH-134	-10,0±2,8	2,3±2,3	37,3±0,7*
AZH-135	4,5±2,1	3,6±1,4	54,6±0,5*
AZH-136	-66,7±15,5*	7,7±1,6	33,9±0,3*
AZH-141	-3,0±1,1	-5,5±4,9	6,3±1,4
<b>Бромид 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия</b>			
AZH-137	18,1±4,7*	3,7±0,3	32,7±0,9*
<b>Вещества сравнения</b>			
Аминогуанидин	57,8±0,6*	–	–
ALT-711	–	18,0±0,5*	–
Дибунол	–	–	93,0±0,8*

Примечание: концентрация изучаемых соединений при определении антигликирующей и регулирующей активности составила 1 ммоль/л, при определении антиоксидантной активности – 10 мкмоль/л; \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ).

#### 4.5. Действие изучаемых веществ на аскорбат-зависимое перекисное окисление липидов

Модель аскорбат-индуцируемого ПОЛ является распространённой моделью для первичного тестирования веществ на наличие антиоксидантной активности и относится к так называемым фермент-независимым методам [Прайор У., 1970; Ланкин В. З., 1975].

Исследуемые соединения в различной степени выраженности ингибировали аскорбат-зависимое ПОЛ. Было установлено, что наибольшую активность проявил ряд синтетических комплексов под шифром «DF», состоящих из имидазо[1,2-*a*]бензимидазола и бифенила, диапазон процента ингибирования которых в концентрации 10 мкмоль/л составил от 87,9% до 94,3% (табл. 4.4), что соизмеримо с уровнем активности вещества сравнения дибунула.

Вещество AZH-135 незначительно слабее, в среднем в 1,7 раза, по сравнению с дибунолом подавляло процесс аскорбат-зависимого ПОЛ (табл. 4.3).

Три соединения AZH-134, AZH-136 и AZH-137 проявили умеренную антиоксидантную активность в диапазоне от 32,7% до 37,3%, уступая веществу сравнения дибунолу (табл. 4.3).

Низко- и неактивными оказались вещества под шифрами AZH-133, AZH-141, AZH-143, которые не проявили ингибирующую активность в отношении аскорбат-зависимого ПОЛ (табл. 4.3, 4.4).

Результаты исследования антиоксидантной активности (табл. 4.4) свидетельствуют о том, что все исследованные 9-замещенные 2-дифенилимидазо[1,2-а]бензимидазолы в концентрации 10 мкмоль/л значительно ингибируют процесс аскорбат-зависимого ПОЛ, что сопоставимо по эффективности с веществом сравнения дибунолом.

Таблица 4.4 – Антигликирующие, регликирующие и антиоксидантные свойства производных бифенила, сопряженных с имидазобензимидазолом.

Соединения	Изменение неферментативного гликозилирования белков (M±m), %	Регликирование гликированного БСА (M±m), %	Антиоксидантная активность (ингибирование аскорбат-зависимого ПОЛ) (M±m), %
1	2	3	4
<b>4'-(2,3-дигидро-9H-имидазо[1,2-а]бензимидазол-9-ил-метил)бифенил-2-карбонитрил</b>			
AZH-143	8,57±2,69	-3,62±5,02	0,19±0,22
<b>9-замещенные 2-дифенилимидазо[1,2-а]бензимидазолы</b>			
DF-1	-46,4±26,8	11,6±1,0*	94,3±2,7*
DF-2	-1,9±3,4	5,6±0,1	91,8±1,1*
DF-4	-64,5±30,3*	18,7±3,7*	91,5±1,3*
DF-5	-23,9±4,5	45,4±4,5*	87,9±2,4*
DF-6	-2,8±6,9	12,0±4,8*	92,2±1,1*
DF-7	13,4±1,4*	6,6±0,4	93,5±6,2*
DF-8	22,0±1,3*	4,3±3,9	92,7±0,8*
<b>Вещества сравнения</b>			
Аминогуанидин	57,8±0,6*	–	–
ALT-711	–	18,0±0,5*	–
Дибунол	–	–	93,0±0,8*

Примечание: концентрация изучаемых соединений при определении антигликирующей и регликирующей активности составила 1 ммоль/л, при определении антиоксидантной активности – 10 мкмоль/л; \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни, p<0,05).

#### 4.6 Изучение активности в отношении дипептидилпептидазы-4 среди производных бифенила, содержащих подструктуру бензимидазола

При изучении влияния соединений на активность ДПП-4 было найдено два соединения, активность которых статистически достоверно отличалась от показателей контроля. Выявлено, что соединения AZH-134, DF-7 проявили низкий уровень ДПП-4-ингибирующей активности, оказавшийся более чем в 7,1 раза ниже уровня аналогичной активности препарата сравнения вилдаглиптина (табл. 4.5, 4.6). В качестве ингибиторов ДПП-4 все протестированные соединения являются малоэффективными.

#### 4.7 Действие веществ на активность гликогенфосфорилазы

Только у одного из протестированных производных бифенила, сопряженных с бензимидазолом, соединения AZH-141, выявлена статистически достоверная ингибирующая активность в отношении гликогенфосфорилазы, которая составила 34,5%. Однако по уровню активности соединения AZH-141 уступает веществу сравнения CP-316819 (табл. 4.5). В целом ингибирующая активность в отношении гликогенфосфорилазы у протестированных соединений является низкой (табл. 4.5, 4.6).

#### 4.8 Влияние соединений на активность протеинтирозинфосфатазы 1В

Изучение биологических свойств веществ показало, что среди производных бифенила, сопряженных с бензимидазолом, обнаружены соединения, способные значительно ингибировать активность РТР1В и превосходящие по эффективности вещество сравнения NSC-87877 (табл. 4.5, 4.6). Наибольший уровень активности на данной модели, который оказался в 1,5 раза выше уровня аналогичного эффекта NSC-87877 и составил 100,9%, был обнаружен у соединения AZH-137. Менее активными, чем вещество AZH-137, но также достоверно ингибировавшие РТР1В, превосходя NSC-87877, оказались соединения AZH-141, DF-6, DF-7. А вещества под шифрами AZH-135, DF-1, DF-2 уступали по влиянию на активность РТР1В веществу сравнения приблизительно в 1,3 раза. Для остальных исследованных соединений ингибирующая активность в отношении РТР1В была статистически достоверной, но оставалась невысокой (табл. 4.5, 4.6).

В результате проведенного исследования способности ряда производных бифенила, сопряженных с бензимидазолом, ингибировать активность РТР1В из 14 соединений было отобрано для дозозависимого изучения два соединения под шифрами AZH-137 и AZH-141, проявившие наиболее высокую активность.

Таблица 4.5 – Влияние производных бифенила, сопряженных с бензимидазолом, на активность ферментов гликогенфосфорилазы, ДПП-4, РТР1В, АМРК и глюкокиназы.

Соединения	Изменение активности ферментов (M±m), %				
	ДПП-4	Гликогенфосфорилаза	РТР1В	АМРК	Глюкокиназа
1	2	3	4	5	6
<b>Гидробромиды 1-диалкиламиноалкил-3-бифенил-2-иминобензимидазолины</b>					
AZH-133	8,0±5,2	-13,3±24,0	19,6±0,9*	59,5±1,4*	2,8±2,7
AZH-134	18,4±4,7*	5,6±10,1	23,9±0,1*	72,8±3,9*	2,6±2,7
AZH-135	1,8±1,8	-17,2±9,4	53,5±5,8*	57,6±1,6*	5,5±5,5
AZH-136	7,1±3,2	6,1±10,2	26,1±2,6*	67,4±18,7*	2,4±2,4
AZH-141	8,4±3,4	34,5±10,1*	82,1±14,2*	74,8±8,0*	4,0±4,2
<b>Бромид 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия</b>					
AZH-137	5,3±3,1	7,0±19,0	100,9±0,2*	-19,6±1,0	8,1±9,9
<b>Вещества сравнения</b>					
Вилдаглиптин	97,8±1,8*	–	–	–	–



Продолжение табл. 4.5

Соединения	Изменение активности ферментов (M±m), %				
	ДПП-4	Гликогенфосфорилаза	РТР1В	АМПК	Глюкокиназа
1	2	3	4	5	6
CP-316819	–	94,1±4,8*	–	–	–
NSC-87877	–	–	68,9±7,3*	–	–
AICAR	–	–	–	178,1±6,4*	–
RO4389620	–	–	–	–	171,0 <sup>&amp;</sup>

Примечание: концентрация исследуемых соединений составила 100 мкмоль/л; <sup>&</sup> – по данным литературы; \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни, p<0,05).

#### 4.9 Изучение действия веществ на АМФ-активируемую протеинкиназу

Для всех изученных соединений был продемонстрирован различный уровень влияния на активность АМПК в концентрации 100 мкмоль/л, результаты данного скрининга приведены в таблицах 4.5 и 4.6. Активирующий эффект вещества сравнения АICAR составил 178,1%. При изучении соответствующей активности обнаружено, что соединения AZH-143 и DF-4 в скрининговой концентрации активируют АМПК на уровне вещества сравнения АICAR (162,7% и 173,5% активирование, соответственно). Соединение DF-8 также проявляет статистически значимую активность, но в 1,5 раза меньшую, чем у вещества сравнения.

Таблица 4.6 – Влияние производных бифенила, сопряженных с имидазобензимидазолом, на активность ферментов гликогенфосфорилазы, ДПП-4, РТР1В, АМПК и глюкокиназы.

Соединения	Изменение активности ферментов (M±m), %				
	ДПП-4	Гликогенфосфорилаза	РТР1В	АМПК	Глюкокиназа
1	2	3	4	5	6
<b>4'-(2,3-дигидро-9H-имидазо[1,2-a]бензимидазол-9-ил-метил)бифенил-2-карбонитрил</b>					
AZH-143	2,9±1,6	39,2±34,6	9,7±2,6	162,7±35,1*	8,3±7,7
<b>9-замещенные 2-дифенилимидазо[1,2-a]бензимидазолы</b>					
DF-1	5,7±2,6	-42,3±6,3*	59,2±17,2*	...	3,4±4,2
DF-2	7,4±4,1	-23,2±11,6	55,1±5,8*	-65,2±2,0*	2,9±3,6
DF-4	3,2±1,9	1,3±1,3	35,2±11,1*	173,5±23,0*	8,8±4,2
DF-5	0,0	-20,9±14,1	43,0±11,4*	...	5,9±7,9
DF-6	4,7±2,5	13,2±37,8	75,6±10,1*	56,3±6,4*	5,8±7,6
DF-7	13,7±4,8*	-30,4±12,4	85,4±3,0*	-13,9±1,0	4,3±5,5
DF-8	6,5±3,9	-6,2±2,5	31,3±7,3*	112,5±5,7*	2,5±5,5
<b>Вещества сравнения</b>					
Вилдаглиптин	97,8±1,8*	–	–	–	–
CP-316819	–	94,1±4,8*	–	–	–
NSC-87877	–	–	68,9±7,3*	–	–
AICAR	–	–	–	178,1±6,4*	–
RO4389620	–	–	–	–	171,0 <sup>&amp;</sup>

Примечание: концентрация исследуемых соединений составила 100 мкмоль/л; ... – не исследовалось; <sup>&</sup> – по данным литературы; \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни, p<0,05).

#### 4.10 Действие соединений на активность глюкокиназы

В результате изучения действия соединений на активность глюкокиназы все протестированные соединения можно отнести к неактивным (табл. 4.5, 4.6). Ни для одного из исследованных веществ активирующее действие на глюкокиназу не являлось статистически значимым. При этом согласно данным литературы эффект известного экспериментального активатора глюкокиназы RO4389620 составил 171,0% [De Ceuninck F., 2013].

#### 4.11 Анализ взаимосвязи между структурой и фармакологической активностью изучаемых соединений

Был проведён анализ зависимости между биологической активностью и химической структурой новых производных, содержащих две привилегированные подструктуры – бифенил и бензимидазол.

Из изученных линкерных структур наибольшее количество соединений с выраженной антиагрегантной активностью было выявлено в группе, содержащей 2-иминобензимидазолин. В положении N<sup>3</sup> у всех соединений располагается незамещенный бифенильный радикал. Изменение антиагрегантных свойств среди 1-диалкиламиноалкил-3-бифенил-2-иминобензимидазолинов наблюдалось в зависимости от структуры заместителей в N<sup>1</sup>-положении. Максимальное антиагрегантное действие внутри данной группы выявлено у соединения AZH-141 с диметиламиноэтильным заместителем в положении N<sup>1</sup> иминобензимидазолина. Другое высокоактивное соединение из данной группы вещество AZH-136 в положении N<sup>1</sup> имеет пирролидиноэтильный заместитель.

У соединений, проявивших умеренное антиагрегантное действие, снижение данного вида биологической активности наблюдалось при появлении в положении N<sup>1</sup> диэтиламиноэтильного (AZH-134) или морфолиноэтильного радикалов (AZH-133). Наличие пиперидиноэтильного заместителя вместо пирролидиноэтильного радикала характеризовалось резким снижением данного вида активности среди соединений этой группы (AZH-135).

При анализе зависимости полученных данных биологической активности от химической структуры 9-замещенных 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов было показано, что изменение силы антиагрегантного действия у активных веществ данной группы зависело от заместителей в положении N<sup>9</sup>. У вещества DF-1 в положении N<sup>9</sup> находится метильный радикал, а у вещества DF-7 – диэтиламиноэтильный радикал, что обуславливает появление у данных веществ умеренных антиагрегантных свойств.

Также умеренные антиагрегантные свойства были показаны для бромида 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия (AZH-137) и 4'-(2,3-дигидро-9*H*-имидазо[1,2-*a*]бензимидазол-9-ил-метил)бифенил-2-карбонитрила (AZH-143).

Наибольшее количество веществ с регулируемыми свойствами из изученных линкерных производных было выявлено среди 9-замещенных 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов. Изменение регулирующей активности внутри группы зависело от структуры заместителей в положении N<sup>9</sup> имидазобензимидазола. В положении N<sup>2</sup> у всех производных располагается незамещенный бифенильный заместитель. Максимальная регулирующая активность была обнаружена у соединения DF-5, в положении N<sup>9</sup> у которого располагается бензил. Наличие бутильного радикала вместо бензильного заместителя характеризовалось резким снижением данного вида активности среди соединений данной группы (DF-4). Последующее снижение регулирующей активности наблюдалось при появлении в положении N<sup>9</sup> диметиламиноэтильного или диэтиламиноэтильного радикалов (DF-6, DF-7). Также снижение регулирующей активности у веществ данной группы наблюдалось при расположении в положении N<sup>9</sup> этильного, метильного и морфолиноэтильного заместителей (DF-2, DF-1, DF-8).

У исследованных соединений выявлен различный уровень антиоксидантной активности. Среди гидробромидов 2-иминобензимидазолина наибольшим ингибирующим эффектом в отношении аскорбат-зависимого ПОЛ обладает вещество AZH-135, у которого в положении N<sup>1</sup> находится пиперидиноэтильный заместитель. У соединений, проявивших умеренное антиоксидантное действие, снижение данного вида биологической активности наблюдалось при появлении пирролидиноэтильного или диэтиламиноэтильного заместителей (AZH-136, AZH-134) в положении N<sup>1</sup>. В группе низкоактивных гидробромидов 2-иминобензимидазолина снижение антиоксидантной активности наблюдалось, когда в положении N<sup>1</sup> у соединений располагался диметиламиноэтильный или морфолиноэтильный радикалы (AZH-141, AZH-133).

Как следует из данных таблицы 4.4, для протонированных форм ряда 2-(4-бифенил)имидазобензимидазола характерна выраженная антиоксидантная активность в концентрации 10 мкмоль/л на модели аскорбат-зависимого ПОЛ. Высокие антиоксидантные свойства данных структур, видимо, обусловлены свойствами самого имидазобензимидазольного трицикла, который, как известно, характеризуется довольно высокой  $\pi$ -избыточностью [Пожарский А. Ф., 1985].

У бромида 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия (AZH-137) была обнаружена умеренная антиоксидантная активность, в то же время 4'-(2,3-дигидро-9*H*-имидазо[1,2-*a*]бензимидазол-9-ил-метил)бифенил-2-карбонитрил (AZH-143) не показал антиоксидантных свойств на данной модели.

Из всех изученных комплексных соединений бифенила и бензимидазола наибольшее количество веществ с ингибирующим действием в отношении РТР1В было выявлено среди производных ряда 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола. Изменение РТР1В-ингибирующей активности внутри данной группы зависело от структуры заместителей в положении N<sup>9</sup>

имидазобензимидазола. Максимальный уровень активности был обнаружен у соединения DF-7, в положении N<sup>9</sup> у которого располагался диэтиламиноэтильный радикал. Другое высокоактивное соединение из данной группы вещество DF-6 в положении N<sup>9</sup> имеет диметиламиноэтильный заместитель. Наличие этильного или метильного радикалов характеризовалось резким снижением данного вида активности среди соединений этой группы (DF-1, DF-2). Последующее снижение ингибирующей активности в отношении РТР1В наблюдалось при появлении в N<sup>9</sup>-положении бензильного, бутильного и морфолиноэтильного радикалов (DF-5, DF-4, DF-8).

Среди изученных гидробромидов 2-иминобензимидазолина максимальным ингибирующим эффектом в отношении РТР1В обладает соединение AZH-141, что обусловлено наличием диметиламиноэтильного радикала в его структуре. Также высокой активностью характеризуется другое вещество из данной группы, которое содержит пиперидиноэтильный заместитель, – AZH-135. У соединений, проявивших умеренное РТР1В-ингибирующее действие, снижение данного вида биологической активности наблюдалось при появлении в положении N<sup>1</sup> диэтиламиноэтильного (AZH-134), морфолиноэтильного (AZH-133) или пирролидиноэтильного радикалов (AZH-136).

У бромида 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия (AZH-137) была обнаружена самая высокая РТР1В-ингибирующая активность среди всех исследованных линкерных структур.

Исследованные соединения проявили различный уровень активизирующего действия в отношении АМРК. Наиболее активные соединения оказались в группе 9-замещенных 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов (DF-4, DF-8). Наиболее выраженное действие выявлено у вещества DF-4, содержащего бутильную группу в N<sup>9</sup>-положении. Другое высокоактивное соединение из данной группы, вещество DF-8, в положении N<sup>9</sup> имеет морфолиноэтильный заместитель. Умеренным уровнем активности характеризовались все изученные гидробромиды 2-иминобензимидазолина. У 4'-(2,3-дигидро-9*H*-имидазо[1,2-*a*]бензимидазол-9-ил-метил)бифенил-2-карбонитрила (AZH-143) также выявлено высокое АМРК-активирующее действие.

У некоторых из изученных соединений также обнаружены статистически значимые антиангиотензиновые (АТ<sub>1</sub>), антигликирующие, ингибирующие ДПП-4 и гликогенфосфорилазу эффекты. Однако, в скрининговых концентрациях процент активности данных веществ составил не более 30%.

#### 4.12 Определение показателей EC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> и LD<sub>50</sub> наиболее активных соединений

На основании проведенных исследований было установлено, что для линкерных производных 3-бифенил-2-иминобензимидазолина характерны выраженные антиагрегантные

свойства. Для наиболее активных соединений, гидробромида 1-(2,2-диметиламиноэтил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин (AZH-141) и гидробромида 1-(2-пирролидин-4-ил-этил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин (AZH-136), была изучена зависимость степени подавления АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированной агрегации тромбоцитов в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкмоль/л.

В концентрациях 100 и 10 мкмоль/л диметиламиноэтильное производное AZH-141 по степени ингибирования агрегации тромбоцитов достоверно в 3,2 и 7,5 раза, соответственно, превышало активность ацетилсалициловой кислоты. Антиагрегантное действие соединения AZH-136 с пирролидиноэтильным заместителем в положении N<sup>1</sup> в концентрациях 100 и 10 мкмоль/л статистически значимо в 2,7 и 4,4 раза, соответственно, превосходило аналогичный эффект препарат сравнения (табл. 4.7).

На основании полученных результатов для исследуемых соединений и ацетилсалициловой кислоты были рассчитаны соответствующие показатели EC<sub>50</sub>. Так, соединения AZH-141 и AZH-136 по показателю EC<sub>50</sub> превосходили препарат сравнения в 493,5 и 140,9 раза, соответственно (табл. 4.7).

Таблица 4.7 – Влияние соединений под шифрами AZH-141 и AZH-136 на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro*.

Шифр	% ингибирования агрегации тромбоцитов (M±m)				EC <sub>50</sub> , мкмоль/л, (R <sup>2</sup> )
	Концентрация, 1 ммоль/л	Концентрация, 100 мкмоль/л	Концентрация, 10 мкмоль/л	Концентрация, 1 мкмоль/л	
AZH-141	...	89,42±4,90* <sup>#</sup>	73,11±3,42* <sup>#</sup>	37,12±13,16* <sup>#</sup>	2,31 (0,98)
AZH-136	...	77,27±8,65* <sup>#</sup>	42,78±1,35* <sup>#</sup>	17,41±3,89* <sup>#</sup>	8,09 (0,91)
Ацетилсалициловая кислота	49,22±9,76*	27,81±3,09*	9,78±1,69*	0,0	1140 (0,99)

Примечание: ... – не изучалось; \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (p<0,05, критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна); <sup>#</sup> – отличие относительно показателя ацетилсалициловой кислоты статистически значимо (p<0,05, критерий Краскела-Уоллиса с посттестом Данна).

Для линкерных производных 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола было характерно наличие регликирующих свойств. Среди данной группы наиболее высокой регликирующей активностью характеризуется бензильное производное 2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола (DF-5), для которого данный эффект также был изучен дозозависимо. По показателю IC<sub>50</sub> соединение DF-5 (1,62 ммоль/л) превосходило ALT-711 (6,35 ммоль/л) в 3,9 раза.

Способность DF-5 разрывать поперечные сшивки гликированных белков *in vitro* также оценивали с помощью метода ELISA по разрушению AGE сшивок БСА-коллаген [Ли С., 2012].

Результаты проведенных исследований *in vitro* показали, что вещество DF-5 обладает способностью к разрыву поперечных сшивок в гликированном коллагене, превосходя вещество сравнения ALT-711. Так, полученное значение  $IC_{50}$  для DF-5, которое составило 0,31 ммоль/л, оказалось в 6,1 раза ниже, чем у вещества сравнения ALT-711 – 1,89 ммоль/л (по литературным данным 1,67 ммоль/л [Kim J., 2015]) (рис. 4.1, 4.2). Таким образом, по результатам проведенных исследований с использованием двух моделей можно заключить, что производное 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола (DF-5) функционирует как разрыватель поперечных сшивок в гликированных белках.

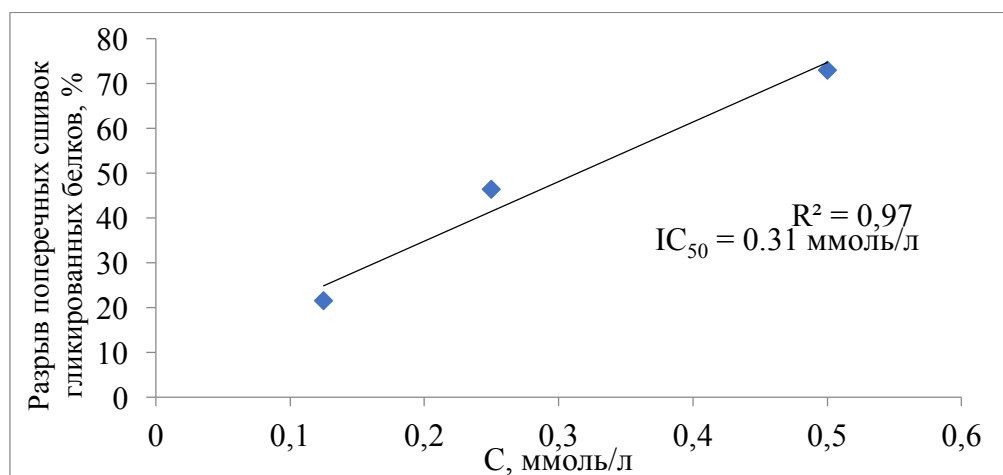


Рисунок 4.1. Зависимость разрывающей активности соединения DF-5 от его концентрации. По оси абсцисс – концентрация соединения DF-5, ммоль/л; по оси ординат – ингибирование флуоресценции, % (n=5).

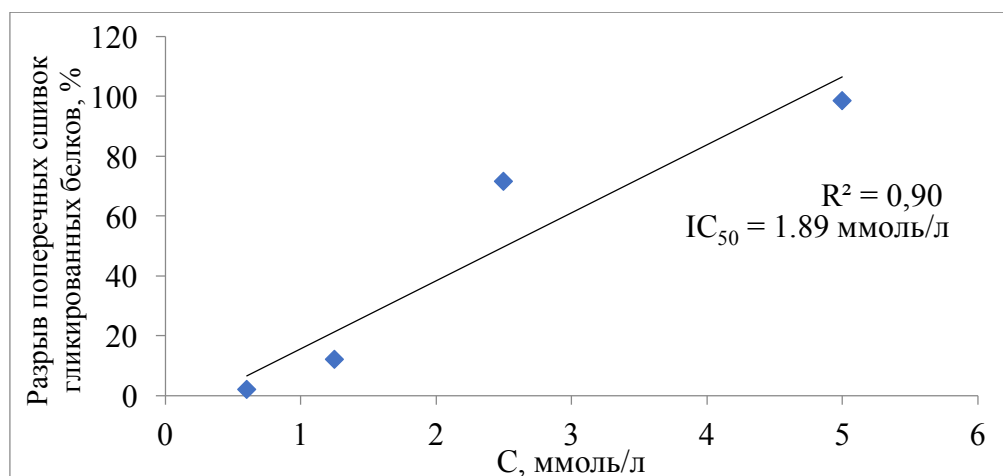


Рисунок 4.2. Зависимость разрывающей активности соединения ALT-711 от его концентрации. По оси абсцисс – концентрация соединения ALT-711, ммоль/л; по оси ординат – ингибирование флуоресценции, % (n=5).

Для веществ с наибольшим уровнем подавления аскорбат-зависимого ПОЛ, производных 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола под шифрами «DF», были рассчитаны их показатели  $IC_{50}$ . По полученным значениям  $IC_{50}$  вещества DF-1 и DF-6 превосходили тролокс в 95,3 и 50,3

раза, соответственно, а DF-1 также было сопоставимо с дибунолом (табл. 4.8). Поэтому данные соединения были выбраны для изучения антирадикальных свойств на различных моделях.

Таблица 4.8 – Антиоксидантная активность 9-замещенных 2-дифенилимидазо[1,2-а]бензимидазолов под шифром «DF» и веществ сравнения (показатель IC<sub>50</sub>).

Соединение	IC <sub>50</sub> , мкмоль/л, (R <sup>2</sup> )
DF-1	0,19 (0,97)
DF-2	2,37 (0,99)
DF-4	1,22 (0,98)
DF-5	1,63 (0,96)
DF-6	0,36 (0,91)
DF-7	1,88 (0,99)
DF-8	1,01 (0,99)
Тролокс	18,1 (0,95)
Дибунол	0,27 (0,93)

Для изученных производных бифенила, сопряженных с бензимидазолом, с наибольшим уровнем ингибирования активности РТР1В – бромида 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия (AZH-137) и гидробромида 1-(2,2-диметиламиноэтил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин (AZH-141) – были определены их значения IC<sub>50</sub>. В концентрации 100 мкмоль/л вещества AZH-137 и AZH-141 по степени РТР1В-ингибирующего эффекта превосходили NSC-87877 в 1,5 и 1,2 раза, соответственно. Так, показатель IC<sub>50</sub> для вещества AZH-137 и вещества сравнения NSC-87877 незначительно различался. В то же время IC<sub>50</sub> для NSC-87877 была ниже в 4,8 раза, чем соответствующий показатель для соединения AZH-141 (табл. 4.9).

Таблица 4.9 – Влияние комплексных соединений бифенила и бензимидазола под шифрами AZH-137 и AZH-141, и вещества сравнения NSC-87877 (в концентрации 100 мкмоль/л) на активность фермента РТР1В.

Соединение	% ингибирования (M±m)	IC <sub>50</sub> , мкмоль/л, (R <sup>2</sup> )
AZH-137	100,93±0,20 <sup>*#</sup>	29,3 (0,95)
AZH-141	82,11±14,16 <sup>*</sup>	97,2 (0,92)
NSC-87877	68,90±7,32 <sup>*</sup>	20,5 (0,97)

Примечание: \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни); # – отличие относительно показателя NSC-87877 статистически значимо (p<0,05, U-критерий Манна-Уитни).

На одном из этапов исследований у наиболее активных соединений была определена их острая токсичность с расчетом показателя LD<sub>50</sub>. При этом вещества вводились однократно в/б мышам обоего пола (см. главу 2).

При в/б введении мышам изучаемых соединений в токсико-летальных дозах через 30 минут у животных наблюдали симптомы раздражения брюшины, снижение двигательной активности и мышечного тонуса, тремор и гибель в течение 2 часов на фоне судорог и асфиксии, а при использовании меньших доз наблюдали симптомы раздражения брюшины и снижение спонтанной двигательной активности. Гибель мышей происходила в зависимости от введенной дозы в течение 2 недель.

При изучении острой токсичности соединения DF-6 было найдено, что значение LD<sub>50</sub> для данного вещества составляет 122,3±10,8 мг/кг. Значение LD<sub>50</sub> для вещества AZH-137 составило 56,8±17,4 мг/кг, а для AZH-141 – 163,8±24,5 мг/кг. Выявленные величины LD<sub>50</sub> позволяют отнести DF-6, AZH-137 и AZH-141 к 3 классу умеренно токсичных соединений [ГОСТ 12.1.007-76, 2007].

#### 4.13 Изучение возможных механизмов действия соединений DF-1 и DF-6 на свободно-радикальные процессы

##### 4.13.1 Взаимодействие соединений со стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом

Как известно,ДФПГ• является свободным радикалом, который легко присоединяет электрон или протон водорода от Н-донорных молекул, становясь стабильным [Georgetti S. R., 2003] и обесцвечиваясь при этом.

Метод Glavind J. (1963) является одним из наиболее распространенных, позволяющих судить о наличии либо отсутствии у веществ антирадикальных свойств.

При исследовании антирадикальной активности веществ DF-1 и DF-6 было установлено, что их активность (% ингибирования реакции) в концентрации 10 мкмоль/л была невысокой и составила 8,01% для DF-1, и 9,95% для DF-6 (табл. 4.10), что, возможно, объясняется затрудненностью взаимодействия изучаемых соединений с данным радикалом из-за стерических характеристик строения молекулы вещества. В то же время эффект вещества сравнения тролокса составил 89,15%

Таблица 4.10 – Антирадикальная активность соединений DF-1 и DF-6, и вещества сравнения на модели взаимодействия с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ•) *in vitro*.

Соединение	% ингибирования (M±m)
	Концентрация, 10 мкмоль/л
DF-1	8,01±0,46 <sup>*#</sup>
DF-6	9,95±0,91 <sup>*#</sup>
Тролокс	89,15±0,25 <sup>*</sup>

Примечание: \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (p<0,05, критерий Краскела-Уоллиса с постестом Данна); # – отличие относительно показателя тролокса статистически значимо (p<0,05, критерий Краскела-Уоллиса с постестом Данна).



#### 4.13.2 Антирадикальная активность соединений на модели окисления 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты)

Метод основан на ингибировании антиоксидантами реакции окисления радикала 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS•) Rice-Evans C. (1994). При инкубации ABTS• с Hb и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> образуется относительно стабильный катион-радикал ABTS<sup>+</sup>, соединения с антирадикальными свойствами восстанавливают ABTS<sup>+</sup> до ABTS• и обесцвечивают его раствор [Alam M. N., 2013].

В результате изучения антирадикальной активности в тесте с ABTS• в высоких концентрациях в пробе (50 мкмоль и 100 мкмоль/л) исследуемые вещества DF-1, DF-6 и вещество сравнения тролокс значительно ингибировали реакцию окисления ABTS• (табл. 4.11). Однако при снижении концентрации до 10 мкмоль/л вещества не проявили достаточно выраженного антирадикального эффекта, который составил 31,5% для DF-1 и 12,7% для DF-6. По показателю IC<sub>50</sub> вещество DF-1 (22,4 мкмоль/л) превосходило тролокс (49,5 мкмоль/л) и вещество DF-6 (50,1 мкмоль/л) в 2,2 раза (табл. 4.11).

Таблица 4.11 – Влияние соединений DF-1 и DF-6, и вещества сравнения на реакцию окисления 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) (ABTS•) на 10-й минуте.

Соединение	% ингибирования (M±m)			IC <sub>50</sub> , мкмоль/л, (R <sup>2</sup> )
	Концентрация, 100 мкмоль/л	Концентрация, 50 мкмоль/л	Концентрация, 10 мкмоль/л	
DF-1	80,39±0,79 <sup>*#</sup>	90,87±1,19 <sup>*#</sup>	31,48±1,24 <sup>*#</sup>	22,4 (0,99)
DF-6	76,82±1,63 <sup>*#</sup>	67,17±1,41 <sup>*</sup>	12,72±1,63 <sup>*#</sup>	50,1 (0,81)
Тролокс	99,83±0,17 <sup>*</sup>	67,04±2,56 <sup>*</sup>	0,77±0,32	49,5 (0,99)

Примечание: \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (p<0,05, критерий Краскела-Уоллиса с постестом Данна); # – отличие относительно показателя тролокса статистически значимо (p<0,05, критерий Краскела-Уоллиса с постестом Данна).

Таким образом, в отношении подавления окисления радикала 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты) наиболее активным оказался 9-метил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол (DF-1).

#### 4.13.2 Антирадикальная активность соединений на модели образования свободных радикалов в системе гемоглобин-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-люминол

При взаимодействии с некоторыми реакционноспособными молекулами (свободные радикалы, активные формы кислорода) люминол подвергается окислению, в ходе которого испускаются кванты ХЛ. В связи с этим люминол используют в качестве хемилюминесцентного зонда на активные формы кислорода. Введение в модельную систему ингибиторов окисления (антиоксидантов) приводит к изменению параметров кинетики ХЛ люминола. Это изменение проявляется в увеличении латентного периода, уменьшении светосуммы и интенсивности

свечения. Характер изменения указанных параметров зависит от механизма действия исследуемого вещества [Kobayashi H., 2001].

В данном методе антирадикальную активность соединений исследовали на модели образования свободных радикалов в системе Hb-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-люминол с помощью измерения кинетики ее ХЛ [Теселкин Ю. О., 1997]. Для анализа полученных результатов для всех полученных кинетических кривых ХЛ рассчитывали интеграл под кинетической кривой за время равное 10 мин.

Исследуемые соединения и тролокс на модели Hb-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-люминол-зависимой ХЛ обладали способностью к перехвату активных форм кислорода и радикалов люминола, образующихся в реакционной системе. Однако у соединений DF-1 и DF-6 данные свойства оказались более выраженными, что подтверждается также их показателями IC<sub>50</sub> – 0,27 мкмоль/л и 0,29 мкмоль/л, соответственно, против 1,6 мкмоль/л у тролокса (табл. 4.12).

Таблица 4.12 – Антирадикальная активность соединений DF-1 и DF-6, и вещества сравнения на модели Hb-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-люминол-зависимой хемилюминесценции *in vitro*.

Соединение	% ингибирования (M±m)			IC <sub>50</sub> , мкмоль/л, (R <sup>2</sup> )
	Концентрация, 10 мкмоль/л	Концентрация, 1 мкмоль/л	Концентрация, 0,1 мкмоль/л	
DF-1	97,97±0,32*	97,37±0,20* <sup>#</sup>	36,80±5,03* <sup>#</sup>	0,27 (0,76)
DF-6	99,32±0,38*	97,23±0,29* <sup>#</sup>	26,50±5,83* <sup>#</sup>	0,29 (0,99)
Тролокс	95,74±4,26*	40,04±3,23*	0,30±0,18	1,5 (0,96)

Примечание: \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (p<0,05, критерий Краскела-Уоллиса с постестом Данна); <sup>#</sup> – отличие относительно показателя тролокса статистически значимо (p<0,05, критерий Краскела-Уоллиса с постестом Данна).

Таким образом, у 9-замещенных 2-дифенилимидазо[1,2-а]бензимидазолов выявлены выраженные антиоксидантные свойства на модели аскорбат-зависимого ПОЛ, соизмеримые с активностью вещества сравнения дибунола в эквимольной концентрации 10 мкмоль/л. На моделях изучения антирадикальных свойств оба соединения, 9-метил-2-бифенилимидазо[1,2-а]бензимидазол (DF-1) и 9-диметиламиноэтил-2-бифенилимидазо[1,2-а]бензимидазол (DF-6), оказались в равной степени активными в отношении активных форм кислорода и радикалов люминола, влияя на люминол-зависимую ХЛ, их активность в скрининговой концентрации 1 мкмоль/л была более чем в 2 раза выше, чем аналогичная для тролокса; тогда как вещество DF-1, обладало наибольшей эффективностью в отношении радикала ABTS•, подавляя реакцию окисления в 40 раз сильнее, чем тролокс в эквимольной концентрации 1 мкмоль/л.

#### 4.14 Заключение

В результате экспериментального изучения биологической активности 14 новых линкерных производных, содержащих 2 привилегированные подструктуры – бифенил и

бензимидазол, и исследования зависимости их фармакологической активности от химической структуры было выявлено, что для данных комплексов характерны различной степени выраженности антиагрегантные, антиоксидантные и регулирующие свойства, активирующий АМПК и ингибирующий РТР1В эффекты и способность разрывать сшивки гликированных белков.

Для гидробромида 1-(2,2-диметиламиноэтил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин (AZH-141) и гидробромида 1-(2-пирролидин-4-ил-этил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин (AZH-136) показано наличие выраженных антиагрегантных свойств. Кроме того, соединения AZH-141 и AZH-136 по показателям  $EC_{50}$  превосходят ацетилсалициловую кислоту в 493,5 и 140,9 раза, соответственно, что позволяет считать их перспективными соединениями для дальнейших исследований *in vivo*.

Среди гибридных линкерных структур были выявлены две молекулы – 9-метил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол (DF-1) и 9-диметиламиноэтил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол (DF-6) – с высокими антиоксидантными и антирадикальными свойствами, для которых также была рассчитана их  $IC_{50}$ . С учетом полученных экспериментальных данных, сведений о водорастворимости и рассчитанном значении  $LD_{50}$  для соединения DF-6, оно было рекомендовано к углубленному изучению его антиоксидантных свойств на моделях *in vivo*.

В группе бифенилов, сопряженных с имидазобензимидазолом, выраженной регулирующей активностью и способностью разрывать сшивки гликированных белков, которые превосходят аналогичную активность вещества сравнения ALT-711, обладает 9-бензил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол под шифром DF-5. DF-5 было рекомендовано к дальнейшему изучению его антидиабетических свойств на модели экспериментального сахарного диабета *in vivo*.

В качестве средств с потенциальной антидиабетической активностью, которые влияют на активность ферментов, участвующих в различных стадиях патогенеза сахарного диабета типа 2, были выделены 4'-(2,3-дигидро-9*H*-имидазо[1,2-*a*]бензимидазол-9-ил-метил)бифенил-2-карбонитрил (AZH-143) с выраженным активирующим действием в отношении АМПК, гидробромид 1-(2,2-диметиламиноэтил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин (AZH-141) с высокой РТР1В-ингибирующей активностью и умеренной способностью активировать АМПК и бромид 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия (AZH-137) с наибольшим уровнем подавления РТР1В.

Таким образом, основанием для дальнейшего изучения антидиабетического потенциала вещества AZH-141 на модели экспериментального сахарного диабета послужило его установленное эффективное влияние на активность ферментов РТР1В и АМПК.

## ГЛАВА 5. ПОИСК НОВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СРЕДИ ПРОИЗВОДНЫХ ДИФЕНИЛОКСИДА

### 5.1 Изучение антиангиотензинового (AT<sub>1</sub>) действия в ряду производных дифенилоксида

Исследование влияние на ангиотензиновые AT<sub>1</sub>-рецепторы было проведено для 14 производных дифенилоксида под лабораторными шифрами «TONS» из которых 7 соединений относятся к эфирам 3-феноксифенилкарбоксимидовой кислоты и *N*-(бензоил)феноксифенилкарбоксимидовой кислоты, 1 вещество является производным *N*-бензоил-*N'*-3-феноксibenзамидина, 1 соединение представляет собой эфир 3-феноксibenзойной кислоты, 2 вещества относятся к производным 3-феноксibenзоила и 3 соединения – к производным 3-феноксифенила.

Препарат сравнения телмисартан показал высокую эффективность на данной модели, полностью подавляя сократительный эффект ангиотензина II, так, уровень его AT<sub>1</sub>-ингибирующей активности составил 99,3%. В то же время среди данной группы производных дифенилоксида не удалось обнаружить соединений, которые обладают антиангиотензиновым (AT<sub>1</sub>) действием. В таблице 5.1 приведены результаты тестирования веществ на данный активности. Таким образом, по результатам проведенных исследований установлено, что как AT<sub>1</sub>-ингибиторы все изученные соединения данного ряда являются неактивными, так как не было обнаружено статистически достоверных различий их антиангиотензиновой (AT<sub>1</sub>) активности с контрольными показателями в концентрации 10 мкмоль/л.

Таблица 5.1 – Влияние производных дифенилоксида на выраженность AT<sub>1</sub>-опосредованного сосудистого спазма и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов.

Соединения	Изменение сосудистого спазмогенного эффекта ангиотензина II (M±m), Δ%	Изменение АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированной агрегации тромбоцитов, (M±m), Δ%
1	2	3
<b>Эфиры 3-феноксифенилкарбоксимидовой кислоты и <i>N</i>-(бензоил)феноксифенилкарбоксимидовой кислоты</b>		
TONS-511	2,9±0,9	2,1±1,1
TONS-508	2,6±1,8	26,1±2,7*
TONS-232	3,5±3,5	8,3±8,3
TONS-227	6,9±3,4	3,1±1,7
TONS-226	17,5±10,7	4,0±2,3
TONS-462	7,7±7,7	29,4±1,0*
TONS-495	1,2±0,6	35,2±3,3*
<b><i>N</i>-Бензоил-<i>N'</i>-3-феноксibenзамидины</b>		
TONS-241	1,9±1,0	2,7±1,6
<b>Эфиры 3-феноксibenзойной кислоты</b>		
TONS-281	9,3±9,3	24,8±7,0*

Продолжение табл. 5.1

Соединения	Изменение сосудистого спазмогенного эффекта ангиотензина II ( $M \pm m$ ), $\Delta\%$	Изменение АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированной агрегации тромбоцитов, ( $M \pm m$ ), $\Delta\%$
1	2	3
<b>3-феноксibenзоилы</b>		
TONS-512	1,8 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 1,4
TONS-513	4,1 $\pm$ 2,5	4,3 $\pm$ 0,6
<b>3-феноксифенилы</b>		
TONS-503	1,7 $\pm$ 1,7	4,7 $\pm$ 3,8
TONS-504	9,9 $\pm$ 6,4	3,1 $\pm$ 2,1
TONS-514	4,4 $\pm$ 2,5	13,2 $\pm$ 0,8*
<b>Вещества сравнения</b>		
Телмисартан	99,3 $\pm$ 1,0*	–
АСК	–	27,8 $\pm$ 3,1*

Примечание: АСК – ацетилсалициловая кислота; концентрация изучаемых соединений при определении антиагрегантной активности составляла 100 мкмоль/л, при определении антиангиотензиновой (АТ<sub>1</sub>) активности – 10 мкмоль/л; \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ).

## 5.2 Влияние производных дифенилоксида на процесс АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов

У изученных соединений был выявлен различный уровень влияния на функциональную активность тромбоцитов в концентрации 100 мкмоль/л. В таблице 5.1 приведены результаты блокирующего влияния соединений на АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированную агрегацию тромбоцитов. Антиагрегантный эффект препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты составил 27,8%.

При изучении антиагрегантной активности наиболее сильный эффект был выявлен у *N*-бензоилзамещенного 3-феноксифенилимидата (TONS-495), который незначительно превосходил аналогичный эффект ацетилсалициловой кислоты на 7,4%. Другие производные 3-феноксibenзойной кислоты, *N*-бензоилзамещенный фенилимидат (TONS-462), пропилимидат (TONS-508) и 2-метил-2-(3-феноксibenзоат)пропионитрил (TONS-281), проявили умеренные антиагрегантные свойства, которые статистически незначимо отличались от активности препарата сравнения (табл. 5.1). Всего было найдено пять активных соединений, антиагрегантное действие которых статистически достоверно превосходит действие референтного препарата.

## 5.3 Изучение антигликирующей активности соединений

В ходе проведенных экспериментальных исследований было показано, что среди изученных производных дифенилоксида 10 веществ в различной степени обладают

способностью подавлять неферментативное гликозилирование белков (табл. 5.2). Ряд соединений достоверно подавлял специфическую флуоресценцию гликированного БСА в диапазоне от 11.9 до 27.1%. Уровень проявленной ими антигликирующей активности соответствовал среднему и низкому, и они уступали по своей эффективности веществу сравнения аминогуанидину, эффект которого составил 57,8%.

Таблица 5.2 – Антигликирующие, регликирующие и антиоксидантные свойства производных дифенилоксида.

Соединения	Изменение неферментативного гликозилирования белков (M±m), %	Регликирование гликированного БСА (M±m), %	Антиоксидантная активность (ингибирование аскорбат-зависимого ПОЛ) (M±m), %
1	2	3	4
<b>Эфиры 3-феноксифенилкарбоксимидовой кислоты и N-(бензоил)феноксифенилкарбоксимидовой кислоты</b>			
TONS-511	13,4±1,9*	3,8±2,3	-3,1±1,5
TONS-508	11,9±3,0*	-0,7±1,3	24,3±4,2*
TONS-232	3,2±0,8	4,3±0,4	-0,6±2,3
TONS-227	16,4±2,5*	1,6±1,0	-2,8±2,1
TONS-226	27,1±11,8*	3,3±2,0	-6,7±2,7
TONS-462	8,3±3,0	11,8±4,5*	7,4±6,2
TONS-495	12,8±0,8*	-0,2±0,3	20,4±1,7*
<b>N-Бензоил-N'-3-феноксибензамидины</b>			
TONS-241	23,9±0,6*	4,9±1,1	26,2±1,1*
<b>Эфиры 3-феноксибензойной кислоты</b>			
TONS-281	15,9±3,0*	5,9±2,8	-7,0±2,4
<b>3-феноксибензоилы</b>			
TONS-512	11,9±3,2*	4,0±2,1	-2,4±0,6
TONS-513	20,0±2,3*	0,3±0,1	7,9±0,7
<b>3-феноксифенилы</b>			
TONS-503	-22,1±2,2	1,6±1,1	8,1±3,5
TONS-504	0,6±2,8	5,9±1,8	0,2±1,4
TONS-514	13,7±2,7*	1,0±1,6	1,6±3,0
<b>Вещества сравнения</b>			
Аминогуанидин	57,8±0,6*	–	–
ALT-711	–	18,0±0,5*	–
Дибунол	–	–	93,0±0,8*

Примечание: концентрация изучаемых соединений при определении антигликирующей и регликирующей активности составила 1 ммоль/л, при определении антиоксидантной активности – 10 мкмоль/л; \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни, p<0,05).

#### 5.4 Исследование регликирующей активности соединений

Исследование способности соединений регликировать гликированный БСА *in vitro* проводили по предварительно разработанному и валидированному методу [Спасов А. А., 2016г].

Активность вещества сравнения ALT-711 на данной модели составила 18,0%. При изучении регулирующего эффекта было найдено только одно соединение, активность которого статистически достоверно отличалась от контроля – *N*-бензоилзамещенный фенилимидат 3-феноксibenзойной кислоты (TONS-462). Однако его уровень активности не превышал аналогичный эффект вещества сравнения (табл. 5.2).

### **5.5 Действие производных дифенилоксида на аскорбат-зависимое перекисное окисление липидов**

Показано, что для *N*-бензоилзамещенного 3-феноксифенилимидата (TONS-495), пропилимидата 3-феноксibenзойной кислоты (TONS-508) и *N*-бензоил-*N'*-4-бромфенил-3-феноксibenзамидина (TONS-241) был характерен низкий уровень антиоксидантной активности, оказавшийся более чем в 3,5 раза ниже уровня аналогичной активности вещества сравнения дибунола (табл. 5.2).

### **5.6 Влияние соединений на активность дипептидилпептидазы-4**

Наиболее высокий статистически значимый уровень ДПП-4-ингибирующей активности, который тем не менее оказался в 1,4 раза ниже уровня аналогичной активности вилдаглиптина, был выявлен у двух производных 3-феноксифенила с диметиламиноэтильным (TONS-503) и морфолиноэтильным (TONS-504) заместителями (табл. 5.3).

Изучение биологических свойств веществ показало, что другие производные 3-феноксibenзойной кислоты – *N*-бензоилзамещенный *n*-бутилимидат (TONS-232) и *N*-бензоилзамещенные имидаты (TONS-226, TONS-227) также ингибируют ДПП-4, но уступают по активности препарату сравнения вилдаглиптину (табл. 5.3). При этом только у TONS-227 был выявлен статистически значимый умеренный уровень ДПП-4-ингибирующей активности, который может быть обусловлен наличием довольно объемного заместителя у данного производного 3-феноксibenзойной кислоты.

### **5.7 Действие веществ на активность гликогенфосфорилазы**

По результатам исследований активность экспериментального ингибитора гликогенфосфорилазы CP-316819 на данной методике составила 94,1%. В то же время ни для одного из представленных производных феноксibenзола процентное изменение активности фермента гликогенфосфорилазы не являлось статистически достоверным. Таким образом, все изученные на данной методике производные дифенилоксида являются низкоактивными (табл. 5.3).

### 5.8 Влияние производных дифенилоксида на активность протеинтирозинфосфатазы 1В

Изучение фармакологических свойств веществ показало, что производные дифенилоксида незначительно ингибируют действие фермента РТР1В и уступают по активности веществу сравнения, экспериментальному ингибитору РТР1В, NSC-87877, активность которого на данной модели составила 68,9% (табл. 5.3). Только для двух протестированных веществ процентное изменение активности фермента РТР1В было статистически значимо относительно контроля. Наибольший уровень активности на данной модели, который оказался в 2,3 раза ниже уровня соответствующего эффекта вещества сравнения, был обнаружен у 2-метил-2-(3-феноксibenзоат)пропионитрила 3-феноксibenзойной кислоты (TONS-281).

Таблица 5.3 – Влияние производных дифенилоксида на активность ферментов гликогенфосфорилазы, ДПП-4, РТР1В, АМРК и глюкокиназы.

Соединения	Изменение активности ферментов (M±m), %				
	ДПП-4	Гликогенфосфорилаза	РТР1В	АМРК	Глюкокиназа
1	2	3	4	5	6
<b>Эфиры 3-феноксифенилкарбоксимидовой кислоты и N-(бензоил)феноксифенилкарбоксимидовой кислоты</b>					
TONS-511	21,0±13,3	-19,3±4,4	2,4±3,3	...	-1,0±0,4
TONS-508	9,1±5,2	-19,3±5,6	7,1±3,3	...	-1,3±1,2
TONS-232	39,8±18,0	-14,6±4,4	7,3±4,0	...	-0,2±0,7
TONS-227	56,1±15,9*	-0,2±5,2	1,8±0,1	...	-2,3±1,1
TONS-226	43,2±20,0	-15,8±2,3	2,1±2,9	...	-2,4±1,6
TONS-462	3,3±2,8	-14,4±16,7	4,6±3,5	...	-1,0±0,4
TONS-495	15,2±8,5	11,5±30,3	14,8±10,1	...	-1,3±1,2
<b>N-Бензоил-N'-3-феноксibenзамидины</b>					
TONS-241	13,7±7,9	-21,0±3,4	5,1±0,4	-17,6±2,6	-0,4±1,9
<b>Эфиры 3-феноксibenзойной кислоты</b>					
TONS-281	30,6±32,3	-9,7±6,3	30,4±0,2*	97,4±3,4*	16,5±2,6*
<b>3-феноксibenзоилы</b>					
TONS-512	14,2±5,0	10,0±10,3	11,2±1,0*	...	...
TONS-513	0,8±0,8	-11,9±4,2	6,8±4,9	91,0±16,0*	...
<b>3-феноксифенилы</b>					
TONS-503	69,1±9,1*	6,3±4,3	1,5±1,0	...	...
TONS-504	68,6±9,9*	-23,7±7,8	7,1±0,2	...	...
TONS-514	2,5±1,3	-8,7±6,1	-1,0±1,3	...	...
<b>Вещества сравнения</b>					
Вилдаглиптин	97,8±1,8*	–	–	–	–
CP-316819	–	94,1±4,8*	–	–	–
NSC-87877	–	–	68,9±7,3*	–	–
AICAR	–	–	–	178,1±6,4*	–
RO4389620	–	–	–	–	171,0 <sup>&amp;</sup>

Примечание: концентрация исследуемых соединений составила 100 мкмоль/л; ... – не исследовалось; & – по данным литературы; \* – отличие относительно показателя контроля статистически значимо (U-критерий Манна-Уитни, p<0,05).



## 5.9 Изучение влияния соединений на активность АМФ-активируемой протеинкиназы

В таблице 5.3 приведены результаты влияния исследованных соединений на активность АМПК в концентрации 100 мкмоль/л. Активирующий эффект вещества сравнения АICAR составил 178,1%. Из 3 изученных производных дифенилоксида наиболее активными оказались 2-метил-2-(3-феноксibenзоат)пропионитрил 3-феноксibenзойной кислоты (TONS-281) и 2-(3-феноксibenзоил)циклогексанон (TONS-513) (97,4% и 91,0% активирование, соответственно).

## 5.10 Действие соединений на активность глюкокиназы

По результатам экспериментальных исследований только для одного из протестированных соединений, 2-метил-2-(3-феноксibenзоат)пропионитрила 3-феноксibenзойной кислоты (TONS-281), процентное изменение активности фермента глюкокиназы было статистически достоверным и составило 16,5%. При этом согласно данным литературы эффект известного экспериментального активатора глюкокиназы RO4389620 составил 171,0% [De Ceuninck F., 2013]. Таким образом, в качестве активаторов глюкокиназы все изученные производные дифенилоксида являются малоэффективными (табл. 5.3).

## 5.11 Анализ взаимосвязи между структурой и фармакологической активностью изучаемых соединений

У исследованных производных дифенилоксида выявлен различный уровень влияния на АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированную агрегацию тромбоцитов кролика. Для изученных производных были отмечены четко выраженные закономерности, связанные с заменой во 2-ом положении 3-феноксифенила различных радикалов. Внутри группы эфиров *N*-(бензоил)феноксифенилкарбоксимидовой кислоты наиболее активным оказался 3-феноксифениловый (TONS-495). Немного меньший эффект на данной методике проявил фениловый эфир (TONS-462). Также сходный чуть менее высокий уровень активности был отмечен у изученных пропилового эфира 3-феноксифенилкарбоксимидовой кислоты (TONS-508) и 2-цианопропил-2-ового эфира 3-феноксibenзойной кислоты (TONS-281).

При оценке зависимости антигликирующей активности от химической структуры соединений также были выявлены некоторые закономерности. У изобутилового эфира *N*-(бензоил)феноксифенилкарбоксимидовой кислоты антигликирующий эффект оказался практически в два раза выше, чем у других эфиров *N*-(бензоил)феноксифенилкарбоксимидовой и 3-феноксифенилкарбоксимидовой кислот с данными свойствами. Также умеренный значимый уровень активности был отмечен у *N*-Бензоил-*N'*-4-бромфенил-3-феноксibenзамидина (TONS-241), 2-цианопропил-2-ового эфира 3-феноксibenзойной кислоты (TONS-281) и 2-(3-феноксibenзоил)циклогексанона (TONS-513).

Среди ряда эфиров 3-феноксифенилкарбоксимидовой кислоты антиоксидантные свойства обнаружены только у пропилового эфира (TONS-508), а внутри группы эфиров *N*-(бензоил)феноксифенилкарбоксимидовой кислоты – у 3-феноксифенилового (TONS-495). *N*-Бензоил-*N'*-4-бромфенил-3-феноксibenзамидин (TONS-241) также проявил сходный, в целом невысокий для производных 3-феноксibenзойной кислоты, уровень антиоксидантной активности.

Умеренная способность ингибировать активность фермента РТР1В выявлена только у 2-цианопропил-2-ового эфира 3-феноксibenзойной кислоты (TONS-281).

Из всех изученных производных дифенилоксида вещества с наибольшим ингибирующим действием в отношении ДПП-4 найдены среди производных 3-феноксифенила с заместителями во 2-ом положении – диметиламиноэтильным или морфолиноэтильным. Другие соединения с умеренным уровнем аналогической активности обнаружены среди эфиров *N*-(бензоил)феноксифенилкарбоксимидовой кислоты. При этом статистически значимый уровень ДПП-4-ингибирующего эффекта отмечен только у *втор*-бутильного эфира (TONS-227).

Для двух производных 3-феноксibenзойной кислоты показано статистически значимое активирование АМРК – 2-метил-2-(3-феноксibenзоат)пропионитрила 3-феноксibenзойной кислоты (TONS-281) и 2-(3-феноксibenзоил)циклогексанона (TONS-513).

У исследованного ряда новых производных дифенилоксида не выявлены антиангиотензиновые (АТ<sub>1</sub>) и регулирующие свойства, кроме того, они оказались низкоактивными в отношении влияния на функциональную активность ферментов гликогенфосфорилазы и глюкокиназы. В скрининговых концентрациях процент активности соединений на данных моделях составил не более 20%.

## 5.12 Заключение

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

## ГЛАВА 6. АНАЛИЗ *IN SILICO* РЕЗУЛЬТАТОВ СКРИНИНГОВЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ. ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНОСТИ КЛАССОВ ИЗУЧЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

### 6.1 Анализ общих ландшафтов фармакологической активности классов изучаемых соединений

На основе полученных результатов скрининговых исследований был построен общий ландшафт по 9 видам фармакологической активности для 35 изученных соединений, а также локальные ландшафты для каждого из четырех химических классов: 14 производных дифенилоксида (DPO); 7 производных дифенила, сопряженных с неконденсированными азолами (DP); 6 производных дифенила, сопряженных с бензимидазолом (DP+BI); 8 производных дифенила, сопряженных с имидазобензимидазолом (DP+ImBI)). Общий ландшафт представлен на рисунке 6.1, локальные ландшафты приведены в приложении А на рисунках А.1 – А.4.

При анализе общего ландшафта видно, что на нем, с одной стороны, хорошо просматриваются ярко выраженная антиоксидантная и регулирующая активности, с другой стороны – высокое РТР1В-ингибирующее и АМПК-активирующее действие. Значительный антиагрегантный эффект был характерен для всех изученных классов, но из-за высоких нормированных значений, которые оказались намного выше значений других активностей и негативно сказывались на целостном восприятии ландшафта, этот параметр не был включен в конечные ландшафты. Наглядно показано, что данные классы соединений, в целом, характеризуются наличием антидиабетического профиля эффектов (рис 6.1).

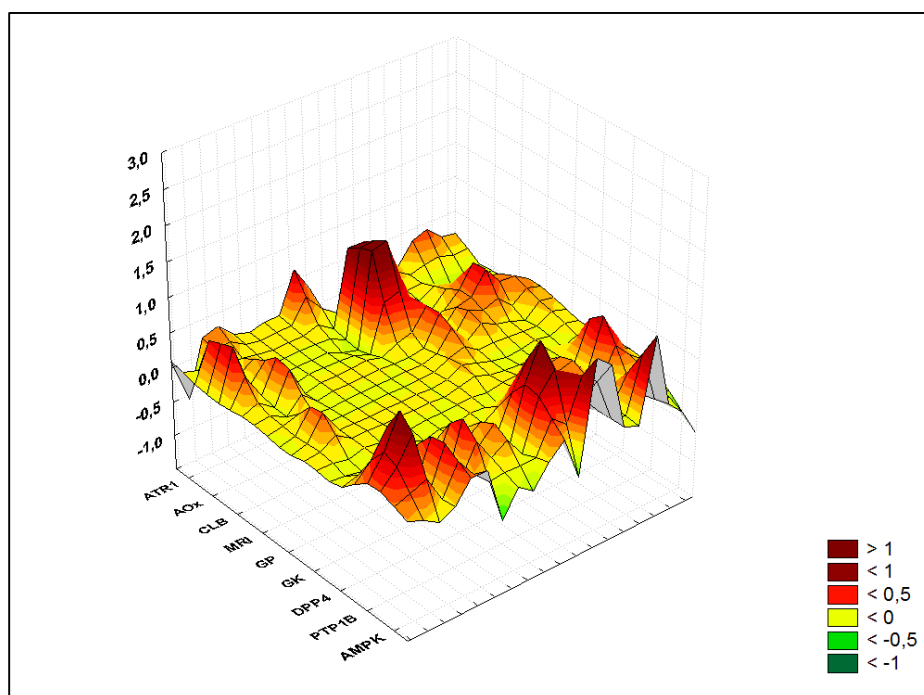


Рисунок 6.1. Общий ландшафт данных биологической активности изученных соединений.

При рассмотрении локальных ландшафтов по отдельным химическим классам видно, что в группе производных дифенилоксида ( $n=14$ ) наибольший вклад вносят ДПП4-ингибирующая и активирующая АМРК активности, также просматриваются антигликирующие и антиоксидантные свойства (рис. А.1 приложения А). Но, в целом, общий фармакологический профиль данной группы остается невысоким.

Анализ ландшафта для группы производных дифенила ( $n=7$ ) показал, что особенностью данной группы является наличие антигликирующих свойств и высокой активирующей активности в отношении АМРК (рис. А.2 приложения А).

При рассмотрении ландшафта фармакологической активности производных дифенила, сопряженных с бензимидазолом, ( $n=6$ ) видно, что наиболее характерны для данной группы следующие эффекты: РТР1В-ингибирующий > АМРК-активирующий > антиоксидантный (рис. А. 3 приложения А).

Из ландшафта фармакологической активности группы производных дифенила, сопряженных с имидазобензимидазолом, ( $n=8$ ) становится понятно, что по своей выраженности фармакологические эффекты распределяется следующим образом: антиоксидантный > регликирующий > РТР1В-ингибирующий > АМРК-активирующий (рис. А.4 приложения А).

Таким образом, при анализе ландшафтов фармакологической активности 4-х групп изученных соединений показано, что классы производных бифенила с бензимидазолом и с имидазобензимидазолом являются наиболее разнообразными по спектру проявленных эффектов веществами данных групп. Следовательно, они являются более перспективными для проведения экспериментального поиска соединений с высокой биологической активностью, преимущественно антидиабетического профиля.

## 6.2 Анализ графиков медианных и супремальных оценок классов изучаемых соединений

График медианных оценок для 10 видов фармакологической активности четырех химических классов изучаемых соединений представлен на рис. 6.2.

По сумме показателей  $M(X)$  наибольшую совокупную среднюю активность проявили соединения из группы производных дифенила, сопряженных с бензимидазолом (DP+BI). По значениям суммарных медианных оценок перспективность химических классов как источников веществ с высокой биологической активностью убывает в следующей последовательности: производные дифенила, сопряженные с бензимидазолом (DP+BI), сумма медиан  $S_M = 3,058$ ; производные дифенила, сопряженных с имидазобензимидазолом (DP+ImBI), сумма медиан  $S_M = 2,899$ ; производные дифенила, сопряженные с неконденсированными азолами (DP), сумма медиан  $S_M = 2,599$ ; производные дифенилоксида (DPO), сумма медиан  $S_M = 1,434$ .

Таким образом, по результатам анализа графика медианных оценок, было показано, что перспективным классом для поиска высокоактивных соединений, являются производные дифенила, сопряженные с бензимидазолом, с последующим введением в них заместителей.

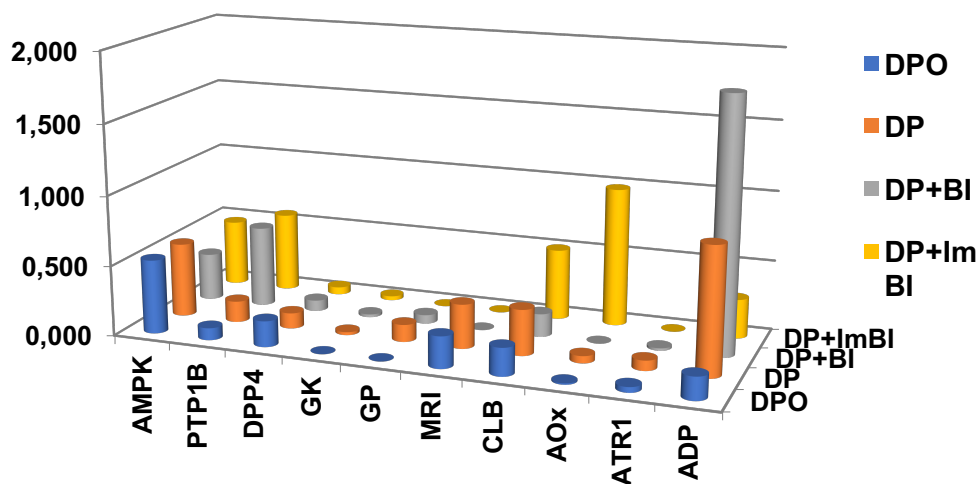


Рисунок 6.2. Оценка перспективности базовых химических структур четырех классов изучаемых соединений с использованием медианных оценок уровня фармакологической активности (абсолютные данные представлены в таблице А.1 приложения А). Примечание:

DPO – производные дифенилоксида; DP – производные дифенила, сопряженные с неконденсированными азолами; DP+BI – производные дифенила, сопряженные с бензимидазолом; DP+ImBI – производные дифенила, сопряженные с имидазобензимидазолом; АМПК – изменение активности АМПК; РТР1В – изменение активности РТР1В; DPP4 – изменение активности ДПП-4; GK – изменение активности глюкокиназы; GP – изменение активности гликогенфосфорилазы; MRI – изменение неферментативного гликозилирования белков; CLB – регликирующая активность; AOx – антиоксидантная активность; ATR1 – антиангиотензиновая (AT<sub>1</sub>) активность; ADP – влияние на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

Далее была рассчитана разница между супремальной и медианной оценками  $\Delta(X)$ , отражающая перспективность базовой структуры соединений, которая в тоже время будет наиболее лабильной в отношении различных заместителей, повышающих общий уровень активности. Для этого параметра также был рассчитан суммарный показатель  $S_{\Delta}$ .

Из рис. 6.3 видно, что лидерами по величине  $\Delta(X)$  являются производные дифенила, сопряженные с имидазобензимидазолом (DP+ImBI),  $S_{\Delta} = 6,120$ . Далее по убыванию  $\Delta(X)$  располагаются производные дифенила, сопряженные с бензимидазолом (DP+BI),  $S_{\Delta} = 4,328$ ; затем производные дифенила, сопряженные с неконденсированными азолами (DP),  $S_{\Delta} = 4,187$ ; и производные дифенилоксида (DPO),  $S_{\Delta} = 3,584$ .

Таким образом, по результатам анализа графика разницы между супремальной и медианной оценками химических классов наиболее перспективной базовой структурой, которая

в то же время будет лабильной в отношении введенных заместителей, увеличивающих активность, является дифенил, сопряженный с имидазобензимидазолом (DP+ImBI).

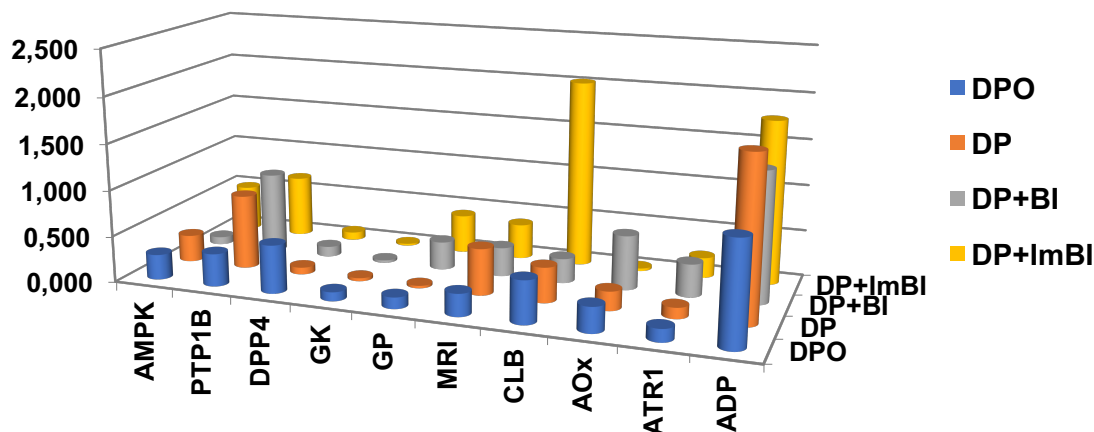


Рисунок 6.3. Оценка перспективности базовых химических структур четырех классов изучаемых соединений с использованием разницы между супремальными и медианными оценками уровня фармакологической активности (абсолютные данные представлены в таблице А.2 приложения А). Примечание: DPO – производные дифенилоксида; DP – производные дифенила, сопряженные с неконденсированными азолами; DP+BI – производные дифенила, сопряженные с бензимидазолом; DP+ImBI – производные дифенила, сопряженные с имидазобензимидазолом; AMPK – изменение активности AMPK; PTP1B – изменение активности PTP1B; DPP4 – изменение активности ДПП-4; GK – изменение активности глюкокиназы; GP – изменение активности гликогенфосфорилазы; MRI – изменение неферментативного гликозилирования белков; CLB – регулирующая активность; AOX – антиоксидантная активность; ATR1 – антиангиотензиновая (AT<sub>1</sub>) активность; ADP – влияние на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

Обобщая результаты анализа медианных и супремальных оценок можно утверждать, что из 4-х химических классов две изученные структуры, содержащие по два привилегированных фрагмента, достаточно перспективны для поиска высокоактивных соединений: DP+BI в большей степени за счет вклада базовой структуры, менее за счет варибельности заместителей; DP+ImBI, наоборот, в большей степени за введения заместителей, повышающих активность, а менее – за счет базовой структуры.

### 6.3 Результаты дисперсионного анализа и множественных сравнений. Оценка привилегированности классов изучаемых веществ

Однофакторный многомерный дисперсионный анализ (ANOVA) был выполнен с целью выявления различий между четырьмя химическими классами изученных соединений.

Согласно результатам ANOVA показано различие 4-х групп многомерных наблюдений в совокупности по всем переменным и по всем 4-м группам вместе. В нем рассматривалась модель вклада каждой независимой переменной (вид активности) в величину зависимого фактора

(соответствующего номера группы – 1, 2, 3, 4). При этом сдвиги, обусловленные постоянным (константным) и переменным вкладом в спектры активности всех 4-х групп статистически высоко достоверны (табл. 6.1). Постоянный фактор («intercept») можно трактовать как влияние базовой структуры, а переменный фактор («group») обеспечивается как изменением заместителей, так и сменой химических структур. По результатам ANOVA вклад постоянной составляющей в модель был значим, а вклад переменной составляющей тоже был значим, но меньше, чем постоянной.

Таким образом, показано, что типы структур сильнее влияют на общий спектр активности, чем заместители. Разница в группах, обусловленная базовой структурой, т.е. привилегированной подструктурой, была выше, чем та разница, которая была обусловлена разницей в заместителях. Можно трактовать, что исходный тип базовой структуры был более важен для уровня активности, чем ее изменение.

Таблица 6.1 – Значимость различия средних для четырех химических классов изучаемых соединений по совокупности 10 видов фармакологической активности по однофакторному многомерному дисперсионному анализу (ANOVA).

	Wilks	F	Effect df	Error df	p
<b>Intercept</b>	0,0229	34,06	10	8	1,80E-05
<b>Group</b>	0,0111	2,93	30	24	4,24E-03

Примечание: intercept – константа, group – оценки по выборочным средним, Wilks – значение критерия Уилкса, F – значение критерия Фишера, effect df – число степеней свободы фактора, error df – число степеней свободы ошибки, p – вероятность нулевой гипотезы. Таблица взята из выдачи программы Statistica 6.0.

В дополнение к ANOVA, по каждому виду активности проводили сравнения всех четырех групп в совокупности по нескольким статистическим критериям для того, чтобы оценить влияние типа базовой структуры на уровень конкретной активности.

На первом этапе с помощью сравнения по критериям хи-квадрат и Краскела-Уоллиса были показаны различия между четырьмя группами в совокупности и определена «чувствительность» конкретной фармакологической активности к изменению базовой структуры, т.е. изменению ее привилегированности. Так, например, по критерию Краскела-Уоллиса значение активности по отношению к АМРК четырех групп статистически не различается, т.е. уровень данного эффекта не зависит от степени привилегированности структуры соединения. В то же время для РТР1В-активности тип структуры и степень ее привилегированности очень сильно влияет на общий уровень активности (табл. 6.2).

Из таблицы 6.2 видно, что виды фармакологической активности, сильнее всего реагирующие на изменение типа базовой структуры, распределяются согласно рассчитанным рангам следующим образом: ингибирование РТР1В > антиагрегантная > антиоксидантная,

ингибирование ДПП4, активирование глюкокиназы, антигликирующая > ингибирование гликогенфосфорилазы, регликирующая, АТ<sub>1</sub>-антагонистическая > активирование АМРК.

При сравнении 4-х групп по критерию хи-квадрат было показано, что виды фармакологической активности, сильнее всего реагирующие на изменение типа базовой структуры, распределяются следующим образом: ингибирование РТР1В, ингибирование ДПП4 > регликирующая > активирование АМРК, ингибирование гликогенфосфорилазы, антигликирующая, антиагрегантная, АТ<sub>1</sub>-антагонистическая > активирование глюкокиназы > антиоксидантная (табл. 6.3).

Таблица 6.2 – Значимость сравнений k медиан для 4-х химических классов изучаемых соединений по совокупности 10 видов фармакологической активности по критерию Краскела-Уоллиса.

Активность	Н	р	К <sub>Н</sub>	Ранг
АМРК	2,10	0,5517	0	<b>10</b>
РТР1В	19,36	0,0002	5	<b>1</b>
DPP4	9,29	0,0257	3	<b>3</b>
GK	8,92	0,0304	3	<b>3</b>
GP	7,08	0,0695	2	<b>7</b>
MRI	7,99	0,0461	3	<b>3</b>
CLB	6,36	0,0954	2	<b>7</b>
АОх	11,12	0,0111	3	<b>3</b>
ATR1	7,69	0,0528	2	<b>7</b>
ADP	13,13	0,0044	4	<b>2</b>

Примечание: Н – значение Н-критерия, К<sub>Н</sub> – индекс значимости, отражающий достоверность влияния (0 баллов – отсутствие влияния; 1 балл – тенденция; 2 балла – слабое; 3 балла – выраженное статистически достоверное; 4 балла – сильное; 5 баллов – очень сильное), р – вероятность нулевой гипотезы.

Таблица 6.3 – Значимость сравнений распределений для 4-х химических классов изучаемых соединений по совокупности 10 видов фармакологической активности по критерию хи-квадрат.

Активность	Chi	р	К <sub>Chi</sub>	Ранг
АМРК	6,47	0,0908	2	<b>4</b>
РТР1В	15,09	0,0017	4	<b>1</b>
DPP4	11,86	0,0079	4	<b>1</b>
GK	5,55	0,1359	1	<b>9</b>
GP	6,44	0,0920	2	<b>4</b>
MRI	7,74	0,0517	2	<b>4</b>
CLB	8,81	0,0319	3	<b>3</b>
АОх	4,56	0,2069	0	<b>10</b>
ATR1	6,86	0,0767	2	<b>4</b>
ADP	7,74	0,0517	2	<b>4</b>

Примечание: Chi – значение критерия  $\chi^2$ , К<sub>Chi</sub> – индекс значимости, отражающий достоверность влияния (0 баллов – отсутствие влияния; 1 балл – тенденция; 2 балла – слабое; 3 балла – выраженное статистически достоверное; 4 балла – сильное; 5 баллов – очень сильное), р – вероятность нулевой гипотезы.



На следующем этапе для каждой переменной проводили множественные парные сравнения групп между собой по критерию Манну-Уитни и по медианному тесту. На основе полученных *p*-значений также присваивали индексы достоверности *Ind* в баллах по шкале, описанной в главе 2. Сумма индексов для одной переменной (вида активности) отражала «чувствительность» данной активности к изменению привилегированности.

Так, при сравнении групп по критерию Манна-Уитни было выявлено, что виды фармакологической активности, сильнее всего реагирующие на изменение типа базовой структуры, распределяются следующим образом: ингибирование РТР1В > антиагрегантная > антиоксидантная, антигликирующая > ингибирование ДПП4, активирование глюкокиназы > АТ<sub>1</sub>-антагонистическая > ингибирование гликогенфосфорилазы, регликирующая > активирование АМРК (табл. А.3 приложения А).

Из таблицы А.4 приложения А видно, что согласно сравнению химических классов по медианному тесту распределение видов активности по величине реагирования на изменение степени привилегированности структуры происходило следующим образом: ингибирование РТР1В > антиагрегантная > антиоксидантная, активирование глюкокиназы > ингибирование ДПП4 > АТ<sub>1</sub>-антагонистическая > ингибирование гликогенфосфорилазы, регликирующая > активирование АМРК, антигликирующая.

Также рассчитанная для каждой пары групп (одна из которых – производные дифенилоксида (DPO), которые не обладают свойствами привилегированных структур) сумма значений индексов по всем видам активности являлась условной метрикой «привилегированности» (табл. А.3, А.4 приложения А), так как при переходе от непривилегированных подструктур к привилегированным молекулам разница между числом и уровнем активностей двух этих групп должна повышаться. Распределение групп и по медианному тесту, и по критерию Манна-Уитни происходило следующим образом: производные дифенила, сопряженные с неконденсированными азолами (DP) < производные дифенила, сопряженные с бензимидазолом (DP+BI) < производные дифенила, сопряженные с имидазобензимидазолом (DP+ImBI). Таким образом, можно считать, что сочетание (DP+ImBI) условно является более «привилегированным», чем сочетание (DP+BI).

В конце данного этапа все полученные согласно описанным статистическим критериям ранги различий между 4-мя группами свели в единый средний ранг (табл. 6.4). Средний ранг изменчивости каждой переменной в зависимости от изменения привилегированности базовой структуры представлял обобщенную метрику «чувствительности» данной фармакологической активности к изменению базовой структуры. Полученные средние ранги отражали степень убывания изменения активности в зависимости от изменения типа структур.

Таблица 6.4 – Обобщенные средние ранги различий между 4-х химическими классами изучаемых соединений по совокупности 10 видов фармакологической активности по нескольким статистическим критериями.

Активность	H	Chi	U	z	Средний ранг
PTP1B	1	1	1	1	<b>1,00</b>
ADP	2	4	2	2	<b>2,50</b>
DPP4	3	1	5	5	<b>3,50</b>
MRI	3	4	3	9	<b>4,75</b>
АОх	3	10	3	3	<b>4,75</b>
GK	3	9	5	3	<b>5,00</b>
ATR1	7	4	7	6	<b>6,00</b>
CLB	7	3	8	7	<b>6,25</b>
GP	7	4	8	7	<b>6,50</b>
АМПК	10	4	10	9	<b>8,25</b>

Примечание: H – ранги, полученные согласно H-критерию Краскела-Уоллиса, Chi – ранги, полученные согласно критерию  $\chi^2$ , U – ранги, полученные согласно U-критерию Манна-Уитни, z – ранги, полученные согласно медианному тесту.

По результатам проведенных дисперсионного анализа и множественных сравнений было показано, что гибридные линкерные структуры, содержащие два привилегированных фрагмента (DP+BI и DP+ImBI), характеризуются большим числом и уровнем проявленной активности, чем две другие химические группы (DP и DPO). Выявлено, что изученные виды активности по-разному реагируют на изменение привилегированности соединений – от полного отсутствия реакции в случае АМПК-активирующего эффекта до очень высокой чувствительности в случае PTP1B-ингибирующего действия, что может быть связано с различными механизмами реализации этих активностей.

#### **6.4 Анализ показателей антидиабетического функционала сетевого профиля классов изучаемых соединений. Выбор соединений-лидеров для исследований *in vivo***

По результатам проведенных скрининговых испытаний 4-х химических классов изучаемых соединений была построена сетевая модель, которая отражала взаимное влияние различных видов фармакологической активности друг на друга (рис. 6.4). Взаимодействия, которые показаны на данной сети, возможны и рассматриваются только для конкретной изученной в нашем исследовании группы соединений, и не могут быть распространены на генеральную совокупность.

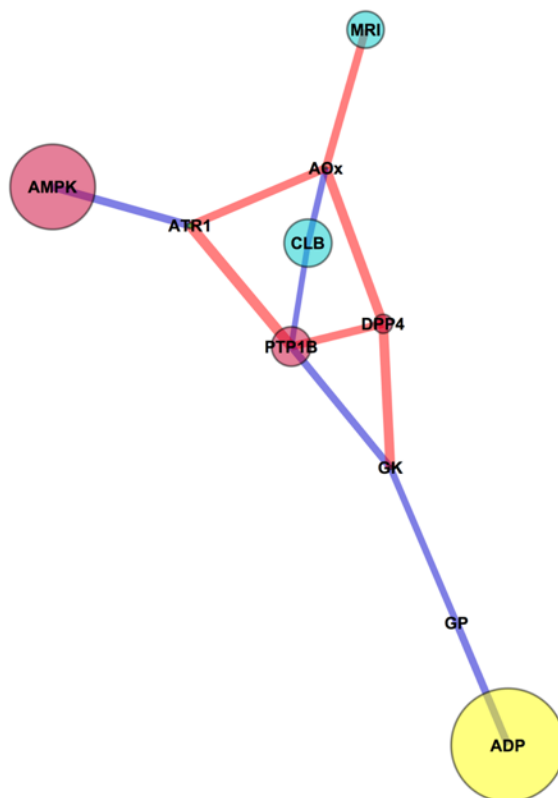


Рисунок 6.4. Биологическая сеть, отражающая взаимное влияние всех видов фармакологической активности, изученных для 4-х химических классов соединений в нашем исследовании. Синий цвет связей между вершинами соответствует отрицательному влиянию, красный – положительному. Диаметр окружностей соответствовал величине медианы, а толщина связей была пропорциональна коэффициенту корреляции ( $p \leq 0,1$ ).

Видно, что, согласно полученной корреляционной сети (рис. 6.4) для данной группы изученных производных бифенила и дифенилоксида, например, невозможно получить одновременно вещества с высокой АМРК-активирующей и АТ<sub>1</sub>-антагонистической активностью из-за взаимного ослабления этих активностей. С другой стороны, возможно взаимное усиление таких пар эффектов, как антиоксидантный и антигликирующий или РТР1В- и ДПП4-ингибирующий. Или увеличение антиоксидантных свойств у данных соединений будет приводить к уменьшению регулирующих.

На заключительном этапе был рассчитан общий функционал сетевого профиля для всех испытанных соединений по формуле, представленной в главе 2, и затем для каждого соединения также были рассчитаны значения антидиабетического функционала сетевого профиля. Значение антидиабетического сетевого функционала отражает способность соединения проявлять антидиабетическое действие в экспериментах *in vivo*.

Общий функционал сетевого профиля для всех соединений 4-х классов составил 0,239. Рассчитанные значения антидиабетического функционала сетевого профиля для каждого изученного соединения представлены в таблице А.5 приложения А. Для 10 веществ значения их

функционала превышали значения общего функционала сетевого профиля. Таким образом, данные соединения являются перспективными для изучения их антидиабетических свойств *in vivo*. Согласно полученным расчетам нами отобраны для дальнейших экспериментальных исследований *in vivo* соединение AZH-141 с самым высоким значением антидиабетического функционала (табл. А.5 приложения А) и вещество DF-5 с аналогичным высоким показателем и уникальным механизмом действия для изучения – способностью разрывать сшивки гликированных белков.

## 6.5 Заключение

Проведен анализ спектров фармакологической активности различных производных бифенила и дифенилоксида с использованием методов системной биологии и сетевой фармакологии. В результате проведенных расчетов, показано, что линкерные структуры, полученные в результате соединения единичной связью двух привилегированных структур – бифенила и неконденсированного (конденсированного) бензимидазола, обладают большей вариабельностью в аспекте проявления различных видов фармакологической активности.

Создана системная сетевая модель для отбора соединений для последующего углубленного изучения их в условиях целостного организма с учетом действия соединений на каждую мишень в отдельности и взаимного влияния этих мишеней друг на друга. Выявлены активные соединения для проведения углубленного изучения *in vivo*.

## ГЛАВА 7. ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НАИБОЛЕЕ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ИССЛЕДОВАНИЯХ *IN VIVO*

### 7.1 Исследование нефрозащитного действия соединения DF-5 в условиях экспериментальной диабетической нефропатии

Сахарный диабет занимает одно из первых мест в мире среди наиболее распространенных хронических заболеваний. В ряд социально значимых заболеваний СД ставят такие его особенности, как большая частота встречаемости, высокий риск инвалидизации и смертности больных [Donath M. Y., 2014].

Современная стратегия терапии СД направлена на поддержание оптимального уровня глюкозы в крови с помощью улучшения продукции инсулина и повышения чувствительности тканей к нему, а также на профилактику и уменьшение выраженности макро- и микрососудистых осложнений [Jain S., 2010; American Diabetes Association, 2014].

Диабетическая нефропатия является одним из основных осложнений сахарного диабета. И хотя лишь у 40% больных СД развивается диабетическая нефропатия, но она является в настоящее время ведущей причиной возникновения почечной недостаточности, которая часто приводит к обязательному диализному лечению [Gross J. L., 2005]. Хроническая гипергликемия вносит значимый вклад в развитие и прогрессирование сосудистых диабетических осложнений с помощью формирования конечных продуктов гликирования (AGEs), которые являются конечными продуктами неферментативного гликозилирования белков [Brownlee M., 1988]. AGEs также могут играть ключевую роль в патогенезе диабетической нефропатии, способствуя формированию нефроангиосклероза почечных клубочков. В организме нет ферментов, способных гидролизовать AGEs, в результате чего AGEs-модифицированные белки являются необратимыми продуктами [Спасов А. А., 2016д]. Способность разрывателей поперечных сшивок гликированных белков разрушать AGEs является возможным терапевтическим подходом к восстановлению эластичности коллагенового матрикса сосудистой системы, а также к терапии сосудистых осложнений СД и предотвращению их прогрессирования.

В нашем исследовании животные со стрептозотоцин-индуцированным СД в течение 30 дней получали соединение DF-5 с доказанной *in vitro* способностью разрушать сшивки гликированных белков или экспериментальный разрыватель сшивок гликированных белков, вещество сравнения ALT-711 (алагебриум). В течение всего периода исследования уровень глюкозы в крови экспериментальных животных был не ниже 15 ммоль/л, что способствовало формированию отдаленных последствий диабета. В конце эксперимента у животных определяли массу тела, содержание глюкозы в плазме крови и уровень гликированного гемоглобина HbA<sub>1c</sub> в цельной крови, оценивали экскреторную функцию почек, также проводили забор материала для

морфометрических исследований. С учетом данных литературы о результатах экспериментальных исследований *in vivo* соединения ALT-711 на различных моделях с формированием осложнений СД была выбрана оптимальная эффективная доза 12,5 мг/кг (в/ж) [Cheng G., 2005; Cheng G., 2007; Zhang B., 2014]. Соответственно, изучаемое вещество DF-5 исследовали в/ж в аналогичной дозе для вещества сравнения.

#### 7.1.1 Содержание в крови глюкозы и HbA<sub>1c</sub>, влияние соединений DF-5 и ALT-711 на массу тела животных

Выбранная нами модельная патология позволила воспроизвести хроническое повреждение почек при СД за счет формирования стойкой гипергликемии при длительном периоде моделирования диабета в течение двух месяцев. Развитие СД сопровождалось полидипсией, полиурией, животные были вялыми и апатичными. В эксперимент включали животных с концентрацией глюкозы в крови более 15 ммоль/л. Введение изучаемого соединения DF-5 и вещества сравнения ALT-711 в дозах 12,5 мг/кг в/ж крысам с экспериментальным СД 1 типа и диабетической нефропатией начинали спустя два месяца после инъекции цитотоксина.

Было показано, что динамика массы тела животных, получавших изучаемое вещество DF-5, статистически значимо отличалась от таковой в группе интактного контроля без СД, получавшей 1% водный раствор КМЦ, ( $p < 0,05$ ) и в группе контроля с СД, также получавшей 1% водный раствор КМЦ ( $p < 0,05$ ), – в течение всего срока исследования животные набирали вес, однако прирост массы тела все же был меньше, чем у животных без СД (табл. 7.1). В группе, получавшей вещество сравнения ALT-711, к концу исследования прирост массы тела по сравнению с контрольной группой с СД был незначительным и оказался намного ниже, чем у интактных животных без СД ( $p < 0,05$ ) (табл. 7.1).

Таким образом, динамика изменения массы тела имела схожий характер в группе соединения DF-5 и в группе вещества сравнения ALT-711.

По результатам исследования выявлено, что соединение DF-5, как и вещество сравнения ALT-711, при введении не оказывали статистически значимого влияния на базальный уровень глюкозы в плазме крови к концу исследования по сравнению с показателями контрольной группы животных с СД, получавших 1% водный раствор КМЦ (табл. 7.1). Во всех трех группах животных с СД уровень глюкозы оставался стабильно высоким (более 24 ммоль/л) к концу исследования по сравнению с группой интактного контроля без СД ( $p < 0,05$ ).

Уровень HbA<sub>1c</sub> в цельной крови во всех группах животных с СД к концу эксперимента был значимо выше аналогичного показателя интактной группы без СД, которая получала 1% водный раствор КМЦ ( $p < 0,05$ ). Однако, концентрация HbA<sub>1c</sub> в цельной крови у экспериментальных животных с СД, получавших DF-5, к концу исследования статистически

достоверно снизилась в 1,7 раза по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы с СД, получавшей 1% водный раствор КМЦ, ( $11,46 \pm 1,39\%$  против  $19,77 \pm 0,08\%$ ) ( $p < 0,05$ ) и была сопоставима с таковой в группе с СД, получавшей ALT-711 ( $11,46 \pm 1,39\%$  против  $12,30 \pm 1,88\%$ ) (табл. 7.1).

Аналогичная динамика наблюдалась и в группе вещества сравнения ALT-711, где уровень  $HbA_{1c}$  в цельной крови снизился в 2 раза на конец исследования по сравнению с контрольной группой крыс с СД ( $p < 0,05$ ) (табл. 7.1), также данный показатель для группы ALT-711 лишь незначительно превышал соответствующее значение для группы, получавшей DF-5.

Таким образом, было показано, что сформированная экспериментальная модель соответствовала изучаемой патологии – СД 1 типа. Животные с СД были менее склонны к набору массы тела, чем интактные животные (табл. 7.1). Изучаемые соединения DF-5 и ALT-711 при введении, наоборот, способствовали приросту массы тела животных. К концу исследования, примерно на 12-13 неделе, у животных с СД наблюдали повышенные уровни глюкозы и  $HbA_{1c}$  в крови по сравнению с группой интактного контроля, которые были частично снижены в группах, получающих ALT-711 или DF-5 (табл. 7.1).

Таблица 7.1 – Влияние соединений DF-5 (12,5 мг/кг в/ж) и ALT-711 (12,5 мг/кг в/ж) на массу тела (г;  $M \pm m$ ), базальный уровень глюкозы в плазме крови (натощак) (ммоль/л;  $M \pm m$ ), уровень  $HbA_{1c}$  (%;  $M \pm m$ ) крыс-самцов со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом и диабетической нефропатией к концу исследования (30-дневное введение).

Показатель	Интактный контроль	Контроль с СД	DF-5	ALT-711
Масса тела (г)	$464,57 \pm 19,21$	$319,25 \pm 18,19^*$	$392,00 \pm 29,58^{*\#}$	$347,00 \pm 19,23^*$
Уровень глюкозы в плазме крови (ммоль/л)	$6,81 \pm 0,86$	$29,30 \pm 0,83^*$	$27,85 \pm 1,31^*$	$24,90 \pm 0,94^*$
$HbA_{1c}$ (%)	$6,44 \pm 1,23$	$19,77 \pm 0,08^*$	$11,46 \pm 1,39^{*\#}$	$12,30 \pm 1,88^{*\#}$

Примечание: \* – различия с показателями интактного контроля достоверны,  $p < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни); # – различия с показателями контрольной группы (СД) достоверны,  $p < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни).

#### 7.1.2 Влияние соединений DF-5 и ALT-711 на экскреторную функцию почек

К концу исследования у контрольной группы животных с СД, получавших 1% водный раствор КМЦ, были зафиксированы лабораторные признаки развития почечной дисфункции, что нашло отражение в почти четырехкратной разнице в уровне протеинурии ( $0,057 \pm 0,006$  г/л) по сравнению с крысами без диабета, получавших 1% водный раствор КМЦ, ( $0,016 \pm 0,007$  г/л) ( $p < 0,05$ ) (табл. 7.2). Кроме того, по окончании исследования в группе с СД зафиксирована статистически достоверная разница с уровнем диуреза ( $74,06 \pm 10,32$  мл/кг/сутки против

28,71±4,39 мл/кг/сутки) и с уровнем суточной экскреции белка (4,04±0,33 мг/кг/сутки против 0,54±0,32 мг/кг/сутки) в интактной группе ( $p<0,05$ ) (табл. 7.2).

При введении животным с СД соединение DF-5 приводило к статистически значимому снижению количества белка в моче и уровню суточной экскреции белка практически в 2-2,5 раза ( $p<0,05$ ) по сравнению с группой контроля (табл. 7.2). Диурез в группе, получавшей DF-5, был снижен в сравнении с показателем группы контроля с СД, однако данная разница оказалась статистически недостоверной. В целом указанные выше эффекты для DF-5 были сопоставимы с проявленной активностью референтного вещества сравнения ALT-711 и статистически значимо от них не отличались.

Введение вещества сравнения ALT-711 также приводило к уменьшению концентрации белка в моче в 2,2 раза ( $p<0,05$ ) и снижению суточной экскреции белка в 2,1 раза ( $p<0,05$ ) к концу исследования по сравнению с аналогичными показателями крыс с СД, получавших 1% водный раствор КМЦ. Эффект ALT-711 на уровень диуреза незначимо отличался от значения соответствующего контроля с СД.

Таким образом, по результатам исследования была показана значительная разница в показателях диуреза и суточной экскреции белка у животных с СД по сравнению с животными интактной группы к концу исследования (табл. 7.2), что позволяет считать адекватной полученную экспериментальную модель СД с диабетической нефропатией. Данные изменения были скомпенсированы у животных, получавших ALT-711 или DF-5, при этом динамика изменения показателей, отражающих экскреторную функцию почек, имела схожий характер в группе соединения DF-5 и в группе вещества сравнения ALT-711 (табл. 7.2).

Таблица 7.2 – Влияние соединений DF-5 (12,5 мг/кг в/ж) и ALT-711 (12,5 мг/кг в/ж) на экскреторную функцию почек крыс-самцов со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом и диабетической нефропатией к концу исследования (30-дневное введение).

Показатель	Интактный контроль	Контроль с СД	DF-5	ALT-711
Диурез, мл/кг/сутки	28,71±4,39	74,06±10,32*	58,98±7,88*	67,09±17,24*
Белок мочи, г/л	0,016±0,007	0,057±0,006*	0,029±0,004*#	0,026±0,011*#
Экскреция белка, мг/кг/сутки	0,54±0,32	4,04±0,33*	1,64±0,92*#	1,88±0,41*#

Примечание: \* – различия с показателями интактного контроля достоверны,  $p<0,05$  (U-критерий Манна-Уитни); # – различия с показателями контрольной группы (СД) достоверны,  $p<0,05$  (U-критерий Манна-Уитни).

### 7.1.3 Морфологическое исследование почечной ткани

Для оценки влияния исследуемых соединений на состояние почечной ткани на модели экспериментального стрептозотоцинового СД типа 1 была проведена сравнительная



гистологическая оценка и иммуногистохимическое исследование образцов срезов почек. Использование гистохимии и иммуногистохимических маркеров позволяет выявить ранние изменения в стенках капилляров и мезангии клубочков, которые приводят к утолщению базальных мембран, плазматическому пропитыванию сосудистой стенки, дистрофии, пролиферации, а затем и атрофии эндотелиоцитов, перицитов и миоцитов.

Оценивали содержание компонентов межклеточного матрикса, таких как коллаген типа I и фибронектин, количество которых увеличивается при фиброзных изменениях тканей почек при диабетической нефропатии [Forbes J. M., 2003], а также накопление AGEs и рецепторов к ним (RAGE), которые также вовлекаются в прогрессирование фиброзных изменений при гломерулосклерозе.

У животных **интактной группы (без СД)** в корковом веществе почек определялись почечные тельца с сосудистыми клубочками эллипсоидной формы. Клубочковая капиллярная сеть в большинстве почечных телец характеризовалась хорошо различимой дольковой структурой, с формированием сосудистых долек (рис. 7.1). Хорошо определялась капсула почечных телец. Наружная и внутренняя стенки капсул почечных телец были выстланы однослойным плоским эпителием.

Проксимальные канальцы характеризовались выстилкой, представленной однослойным кубическим каемчатым эпителием. Форма просвета канальцев была округлой. Ядра эпителиоцитов характеризовались округлой формой, располагались в центральной части клеток. Цитоплазма отличалась умеренной ацидофилией. Люминальная поверхность эпителиоцитов характеризовалась хорошо выраженной щеточной каймой.

Тонкие канальцы были выстланы одним слоем плоских эпителиоцитов. Ядра эпителиоцитов имели овальную форму, располагались в центральной части клеток. Цитоплазма характеризовалась слабо выраженной ацидофилией.

Дистальные канальцы были образованы однослойным кубическим и низким призматическим эпителием. Форма просвета канальцев была округлой. Ядра эпителиоцитов характеризовались округлой формой, а цитоплазма – умеренной ацидофилией.

Собирательные трубочки были образованы одним слоем эпителиоцитов призматической формы.

Внутрипочечные кровеносные сосуды неравномерно полнокровны и иногда заполнены плазмой. Эндотелиальные клетки равномерны, эластические мембраны не утолщены, равномерно спирализованы. Вены полнокровны.

При окраске по Массону (рис. 7.5) срезов почек контрольных животных было выявлено, что относительная площадь соединительной ткани клубочков составила 4,6% (табл. 7.3).

По результатам иммуногистохимического исследования срезов почек интактных животных были определены следующие показатели: при использовании антител к фибронектину (рис. 7.9) выявлено, что относительная площадь фибронектин-позитивного материала составила 4,6%; при использовании антител к AGEs (рис. 7.13) обнаружено, что относительная площадь AGEs-позитивного материала составила 10,68%; при использовании антител к RAGE (рис. 7.17) отмечено, что относительная площадь RAGE-позитивного материала составила 9,1% (табл. 7.4).

При поляризационной микроскопии гистологических препаратов, окрашенных Sirius Red, у контрольных животных было выявлено незначительное количество коллагена I типа в почках в стенках артериол и капилляров клубочков (рис. 7.21).

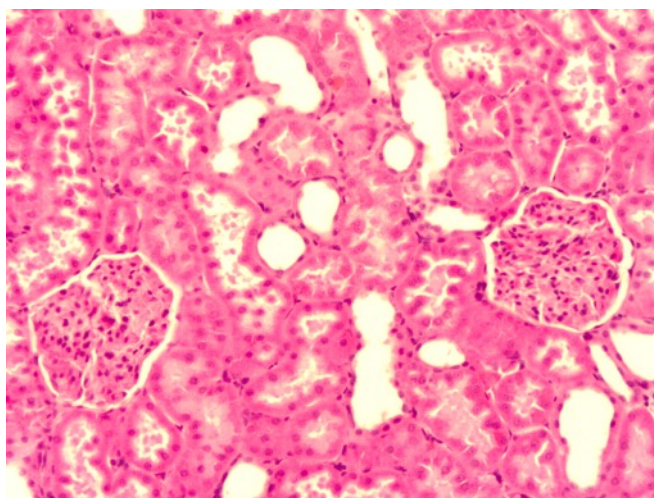


Рисунок 7.1. Кортикальное вещество почки  
Интактная группа. Объектив 10. Окраска  
гематоксилин-эозинном

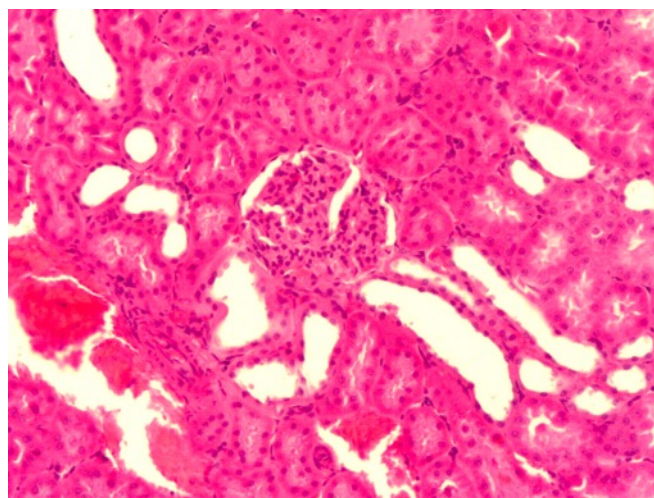


Рисунок 7.2. Кортикальное вещество почки  
Контрольная группа СД. Объектив 10.  
Окраска гематоксилин-эозинном

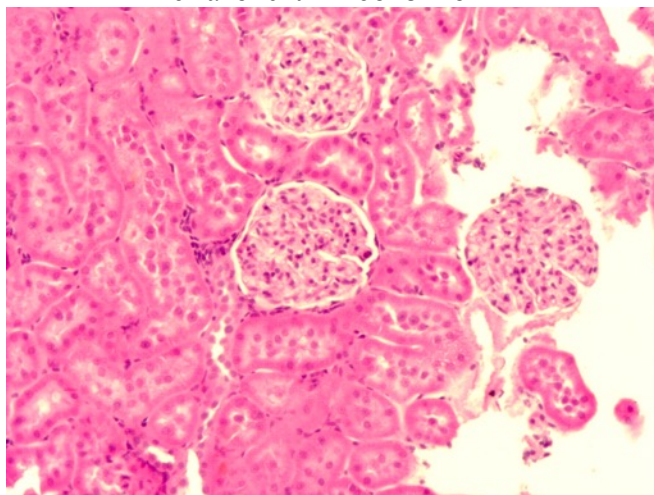


Рисунок 7.3. Кортикальное вещество почки  
Группа ALT-711 12,5 мг/кг. Объектив 10.  
Окраска гематоксилин-эозинном

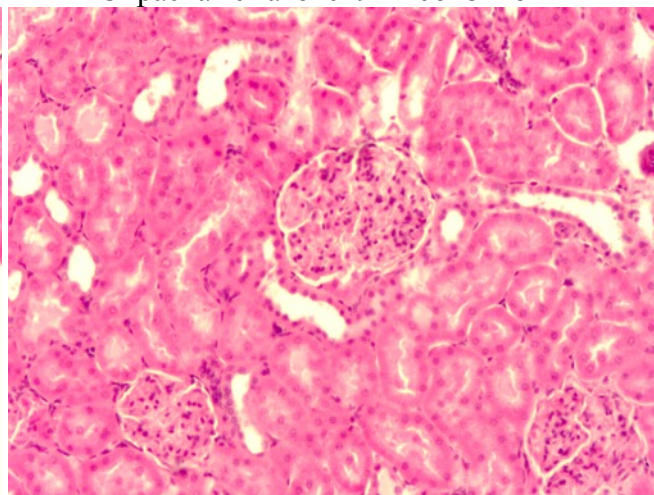


Рисунок 7.4. Кортикальное вещество почки  
Группа DF-5 12,5 мг/кг. Объектив 10.  
Окраска гематоксилин-эозинном

У животных **контрольной группы с СД** происходило уменьшение размеров почечных телец за счет дистрофических изменений. Выявлялись почечные тельца с уменьшенным просветом полости капсулы клубочка, вплоть до отсутствия таковой (рис. 7.2). Отмечалось образование синехий висцерального и париетального листков капсул клубочков. Отмечалось

очаговое утолщение базальной мембраны капилляров клубочков, расширение мезангия (т.е. сдавление капилляров клубочка снаружи, что приводит к сужению просвета микрососудов). В фенестрированных капиллярах клубочков отмечены нарушения кровообращения в виде полнокровия, явлений стаза и диапедеза эритроцитов.

Проксимальные каналцы характеризовались выстилкой, представленной однослойным кубическим каемчатым эпителием. Форма просвета каналцев была округлой. Тонкие каналцы были выстланы одним слоем плоских эпителиоцитов. Дистальные каналцы и собирательные трубочки характеризовались минимальными неспецифическими структурными изменениями.

Внутрипочечные кровеносные сосуды неравномерно полнокровны и иногда заполнены плазмой. Эндотелиальные клетки равномерны, эластические мембраны не утолщены. Вены полнокровны.

При проведении морфометрического исследования с окраской по Массону срезов почек животных с сахарным диабетом (рис. 7.6), выявлено, что площадь клубочков почек уменьшилась в 1,2 раза по сравнению с интактным контролем; площадь соединительной ткани увеличилась в 4,8 раза по сравнению с интактным контролем; относительная площадь соединительной ткани клубочков увеличилась в 5,8 раза по сравнению с интактным контролем (табл. 7.3).

При проведении иммуногистохимического исследования срезов почек контрольных животных получены следующие показатели: при использовании антител к фибронектину (рис. 7.10) выявлено, что относительная площадь фибронектин-позитивного материала увеличилась в 4,4 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактным контролем; при использовании антител к AGEs (рис. 7.14) выявлено, что относительная площадь AGEs-позитивного материала увеличилась в 2,9 раза по сравнению с интактным контролем; при использовании антител к RAGE (рис. 7.18) выявлено, что относительная площадь RAGE-позитивного материала увеличилась в 3,0 раза по сравнению с интактным контролем (табл. 7.4).

При поляризационной микроскопии гистологических препаратов, окрашенных Sirius Red, у животных с СД было выявлено умеренное увеличение количества коллагена I типа в почках в стенках артериол и капилляров клубочков (рис. 7.22).

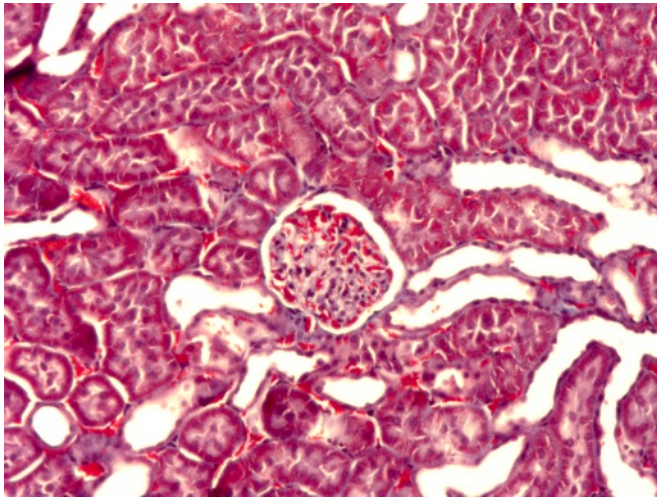


Рисунок 7.5. Кортиковое вещество почки  
Интактная группа. Объектив 10. Окраска по  
Массону

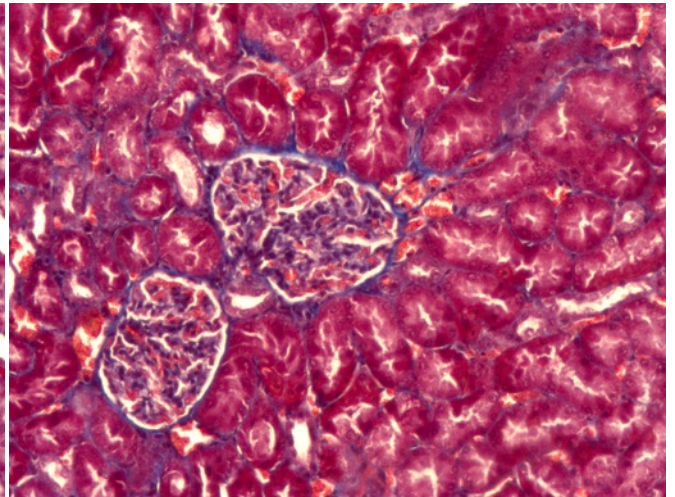


Рисунок 7.6. Кортиковое вещество почки  
Контрольная группа СД. Объектив 10.  
Окраска по Массону

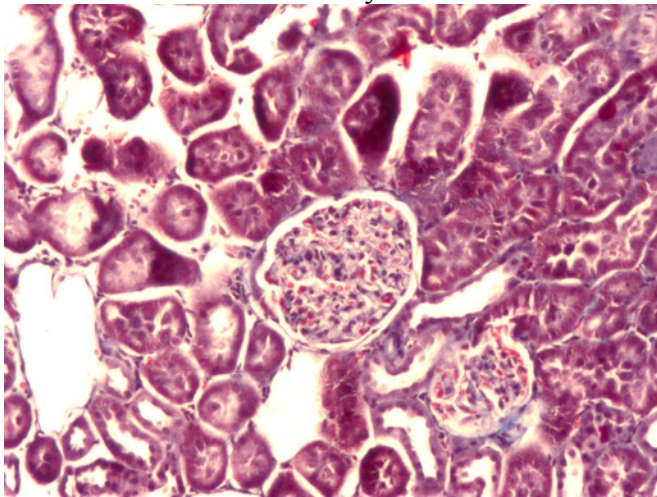


Рисунок 7.7. Кортиковое вещество почки  
Группа ALT-711 12,5 мг/кг. Объектив 10.  
Окраска по Массону

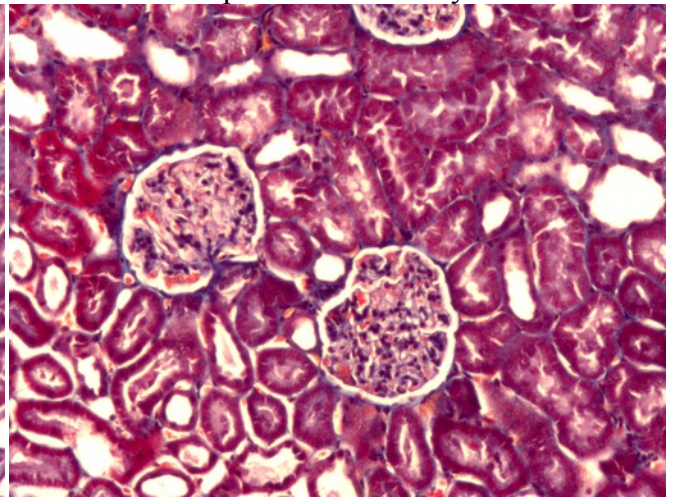


Рисунок 7.8. Кортиковое вещество почки  
Группа DF-5 12,5 мг/кг. Объектив 10.  
Окраска по Массону

В группе животных, получавших **ALT-711**, выявлялись почечные тельца с сосудистыми клубочками округлой формы. Хорошо определялась почечная капсула (рис. 7.3). Наружная и внутренняя стенки капсул почечных телец были выстланы однослойным плоским эпителием. Отмечалось образование единичных синехий висцерального и париетального листков капсул клубочков. Определялось очаговое утолщение базальной мембраны капилляров клубочков, расширение мезангия с гиперклеточностью. В капиллярах клубочков были отмечены нарушения кровообращения в виде полнокровия.

Проксимальные канальцы характеризовались выстилкой, представленной однослойным кубическим каемчатым эпителием. Форма просвета канальцев была округлой. Тонкие канальцы были выстланы одним слоем плоских эпителиоцитов. Собирательные трубочки были без изменений.

Внутрипочечные кровеносные сосуды были неравномерно полнокровны. Эндотелиальные клетки равномерны, эластические мембраны не утолщены. Вены полнокровны.

При окраске по Массону (рис. 7.7) срезов почек животных, получавших ALT-711, было выявлено, что площадь соединительной ткани клубочков уменьшилась в 2 раза по сравнению с контролем; относительная площадь соединительной ткани клубочков снизилась в 2,3 раза по сравнению с контролем (табл. 7.3).

При проведении иммуногистохимического исследования срезов почек животных, получавших ALT-711, были определены следующие показатели: при использовании антител к фибронектину (рис. 7.11) выявлено, что относительная площадь фибронектин-позитивного материала уменьшилась в 2,5 раза по сравнению с группой контроля; при использовании антител к AGEs (рис. 7.15) обнаружено, что относительная площадь AGEs-позитивного материала снизилась в 1,8 раза по сравнению с группой контроля; при использовании антител к RAGE (рис. 7.19) показано снижение относительной площади RAGE-позитивного материала в 2,1 раза по сравнению с контрольной группой (табл. 7.4).

При поляризационной микроскопии гистологических препаратов, окрашенных Sirius Red, у животных, получавших вещество сравнения ALT-711, было выявлено умеренное количество коллагена I типа в почках в стенках артериол и капилляров клубочков (рис. 7.23).

В группе животных, получавших соединение **DF-5**, выявлялись почечные тельца с клубочками округлой формы (рис. 7.4). Хорошо определялась почечная капсула. Наружная и внутренняя стенки капсул почечных телец были выстланы однослойным плоским эпителием. Определялось очаговое утолщение базальной мембраны капилляров клубочков, расширение мезангия. В капиллярах клубочков сохранялись нарушения кровообращения в виде полнокровия.

Проксимальные каналцы характеризовались выстилкой, представленной однослойным кубическим каемчатым эпителием. Форма просвета каналцев была округлой. Тонкие каналцы были выстланы одним слоем плоских эпителиоцитов. Собирательные трубочки были образованы одним слоем эпителиоцитов призматической формы.

Внутрипочечные кровеносные сосуды были неравномерно полнокровны. Эндотелиальные клетки равномерны, эластические мембраны не утолщены. Вены полнокровны.

При окраске по Массону (рис. 7.8) срезов почек животных, получавших DF-5, отмечалось снижение площади соединительной ткани в 1,4 раза по сравнению с контрольной группой; относительная площадь соединительной ткани клубочков снизилась в 1,6 раза по сравнению с контролем с СД (табл. 7.3).

При исследовании с использованием гистохимии и иммуногистохимических маркеров выявлено количественное снижение признаков ранних изменений в стенках капилляров и мезангии клубочков, которые приводят к утолщению базальных мембран, плазматическому

пропитыванию сосудистой стенки, дистрофии, пролиферации, а затем и атрофии эндотелиоцитов, перицитов и миоцитов.

Продемонстрировано, что при использовании антител к фибронектину (рис. 7.12) относительная площадь фибронектин-позитивного материала снизилась в 1,7 раза по сравнению с контролем. При использовании антител к AGEs (рис. 7.16) отмечалось снижение относительной площади AGEs-позитивного материала в 1,6 раза по сравнению с контролем. При использовании антител к RAGE (рис. 7.20) выявлено, что относительная площадь RAGE-позитивного материала уменьшилась в 1,6 раза по сравнению с контролем (табл. 7.4).

При поляризационной микроскопии гистологических препаратов, окрашенных Sirius Red, у животных, получавших DF-5, сохранялось умеренное количество коллагена I типа в стенках артериол и капилляров сосудистых клубочков почек (рис. 7.24).

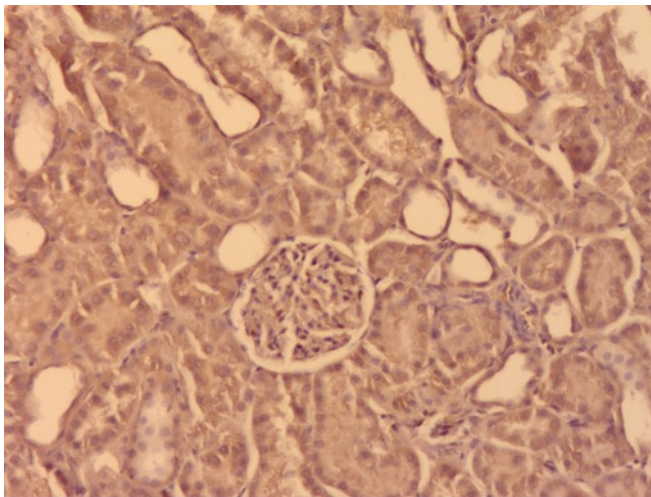


Рисунок 7.9. Кортикальное вещество почки  
Интактная группа. Объектив 10. Экспрессия  
иммунореактивного материала с антителами  
к фибронектину

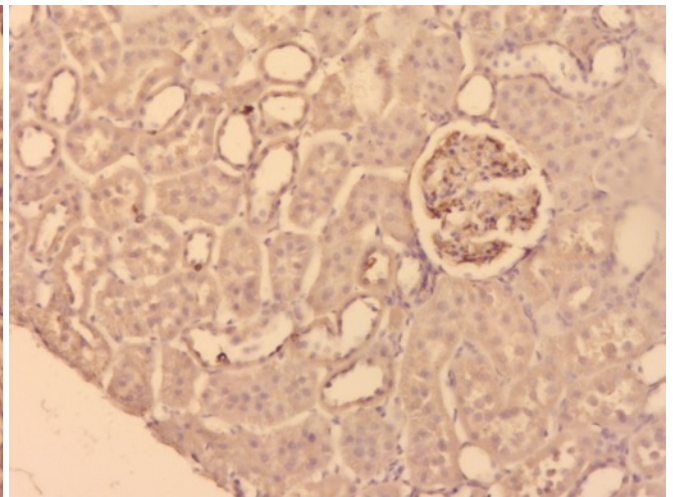


Рисунок 7.10. Кортикальное вещество почки  
Контрольная группа СД. Объектив 10.  
Экспрессия иммунореактивного материала с  
антителами к фибронектину

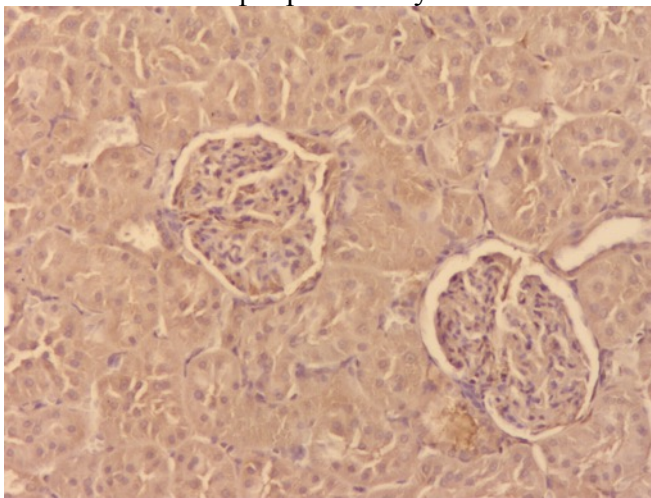


Рисунок 7.11. Кортикальное вещество почки  
Группа ALT-711 12,5 мг/кг. Объектив 10.  
Экспрессия иммунореактивного материала с  
антителами к фибронектину

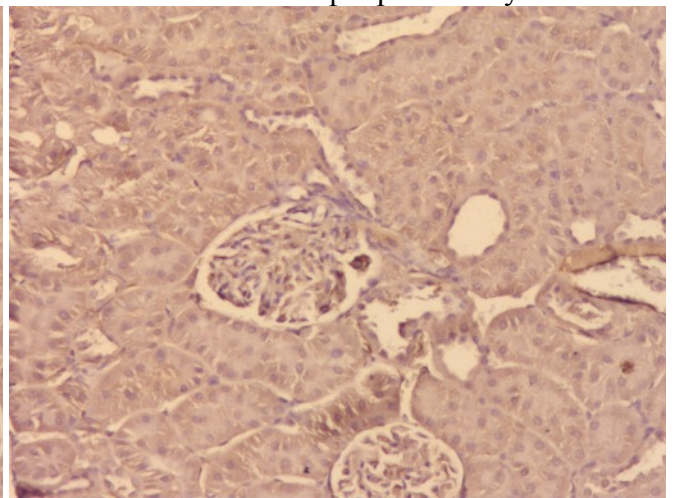


Рисунок 7.12. Кортикальное вещество почки  
Группа DF-5 12,5 мг/кг. Объектив 10.  
Экспрессия иммунореактивного материала с  
антителами к фибронектину

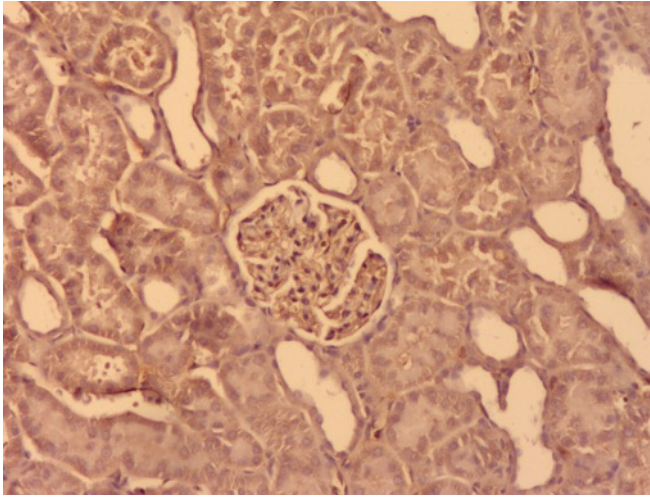


Рисунок 7.13. Кортикное вещество почки  
Интakтная группа. Объектив 10. Экспрессия  
иммунореактивного материала с антителами  
к AGEs

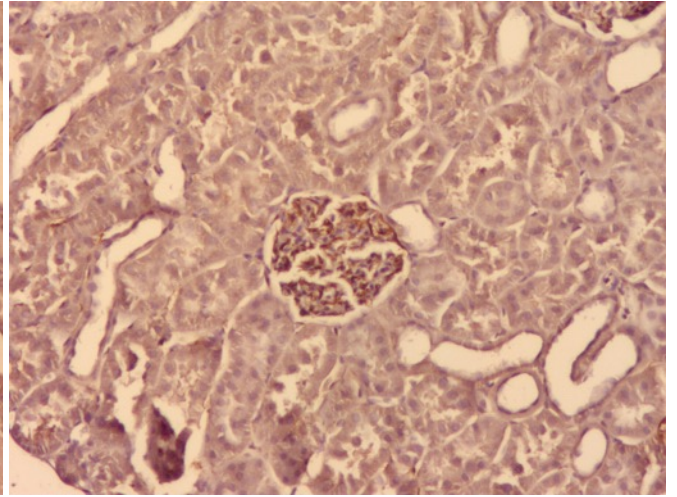


Рисунок 7.14. Кортикное вещество почки  
Контрольная группа СД. Объектив 10.  
Экспрессия иммунореактивного материала с  
антителами к AGEs

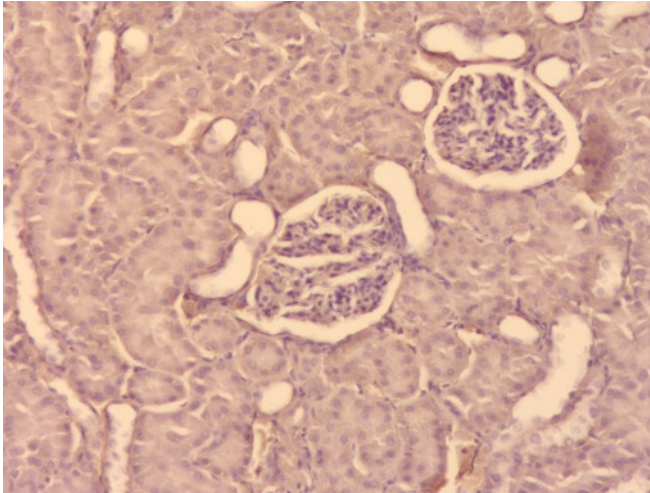


Рисунок 7.15. Кортикное вещество почки  
Группа ALT-711 12,5 мг/кг. Объектив 10.  
Экспрессия иммунореактивного материала с  
антителами к AGEs

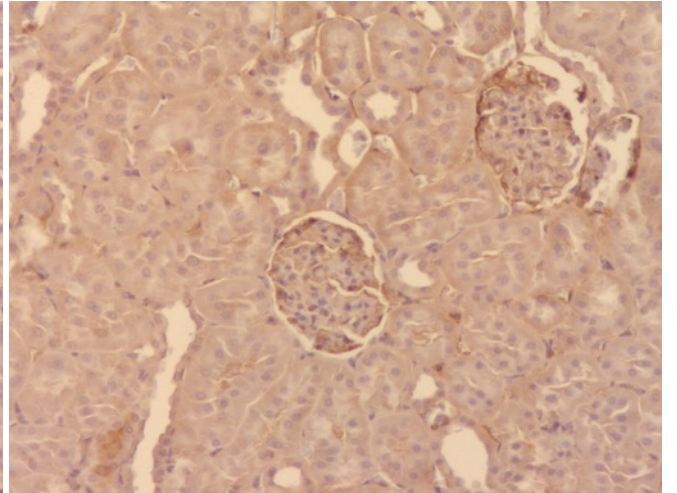


Рисунок 7.16. Кортикное вещество почки  
Группа DF-5 12,5 мг/кг. Объектив 10.  
Экспрессия иммунореактивного материала с  
антителами к AGEs

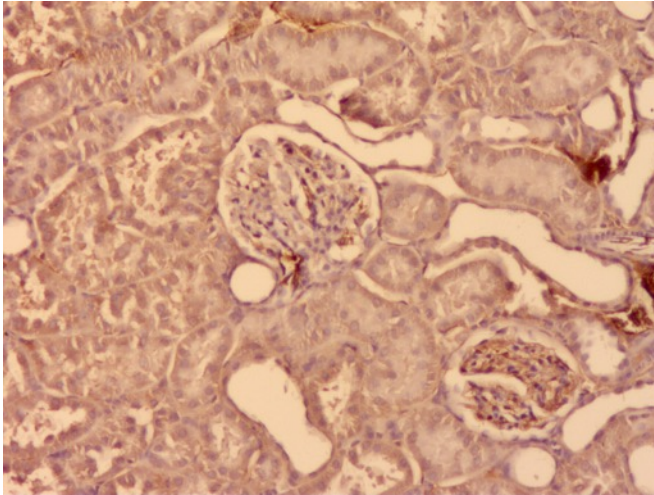


Рисунок 7.17. Кортиковое вещество почки  
Интактная группа. Объектив 10. Экспрессия  
иммунореактивного материала с антителами  
к RAGE

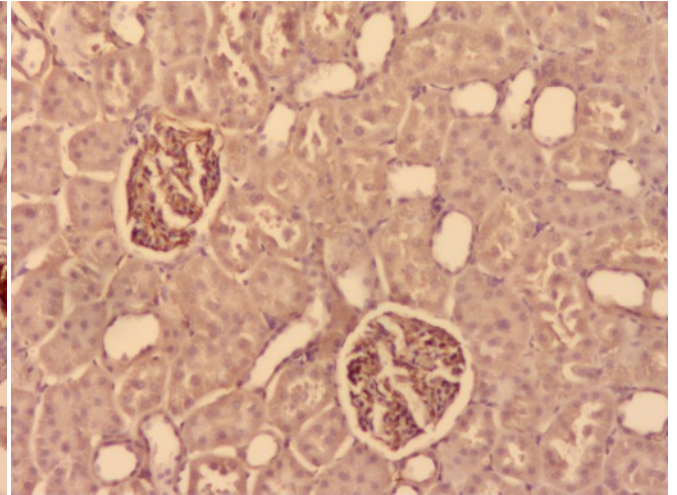


Рисунок 7.18. Кортиковое вещество почки  
Контрольная группа СД. Объектив 10.  
Экспрессия иммунореактивного материала с  
антителами к RAGE

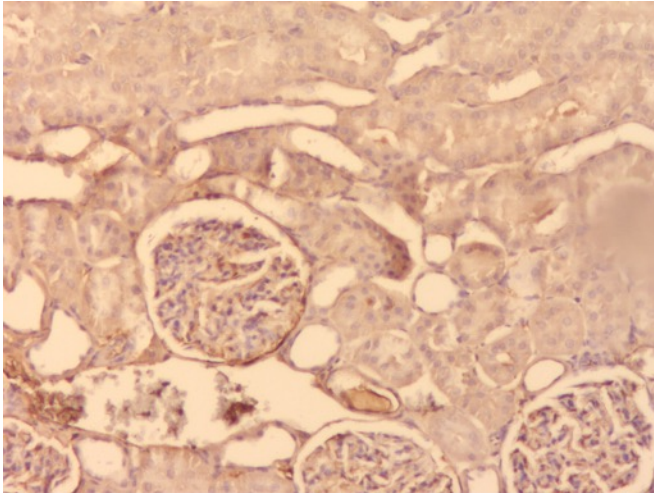


Рисунок 7.19. Кортиковое вещество почки  
Группа ALT-711 12,5 мг/кг. Объектив 10.  
Экспрессия иммунореактивного материала с  
антителами к RAGE

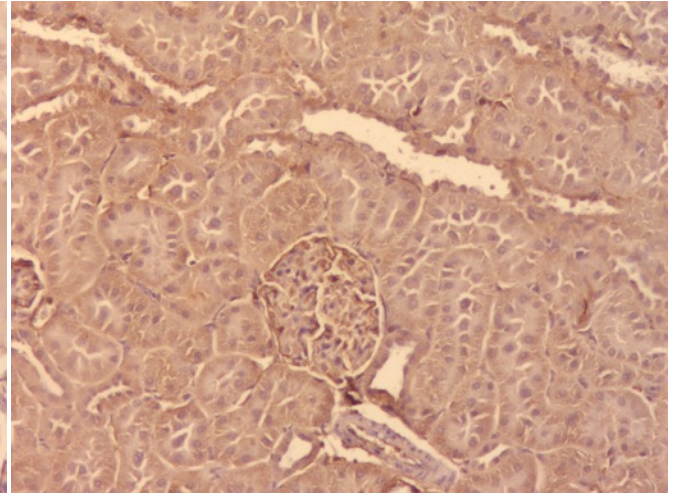


Рисунок 7.20. Кортиковое вещество почки  
Группа DF-5 12,5 мг/кг. Объектив 10.  
Экспрессия иммунореактивного материала с  
антителами к RAGE



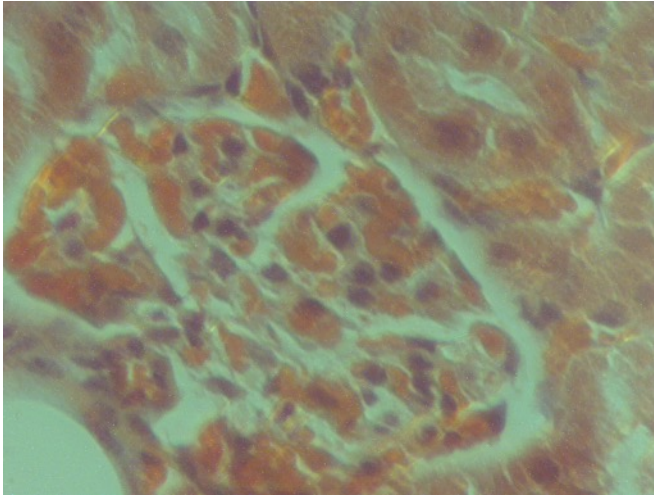


Рисунок 7.21. Кортикoвое вещество почки  
Интaктная группа. Объектив 40. Окраска  
почек Sirius Red (поляризационная  
микроскопия)

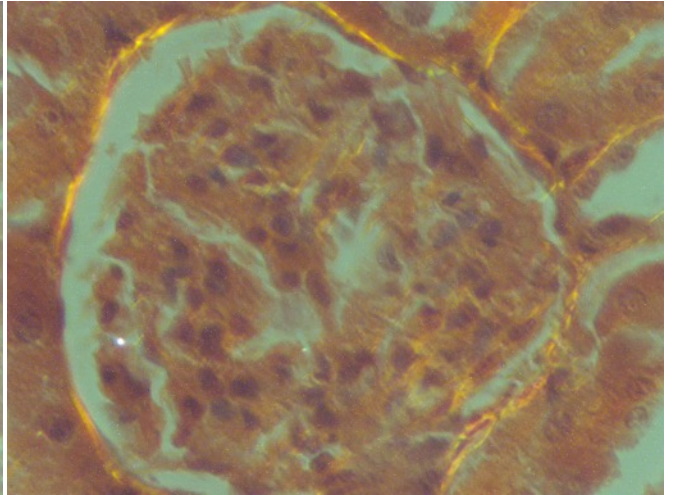


Рисунок 7.22. Кортикoвое вещество почки  
Контрольная группа СД. Объектив 40.  
Окраска почек Sirius Red (поляризационная  
микроскопия)

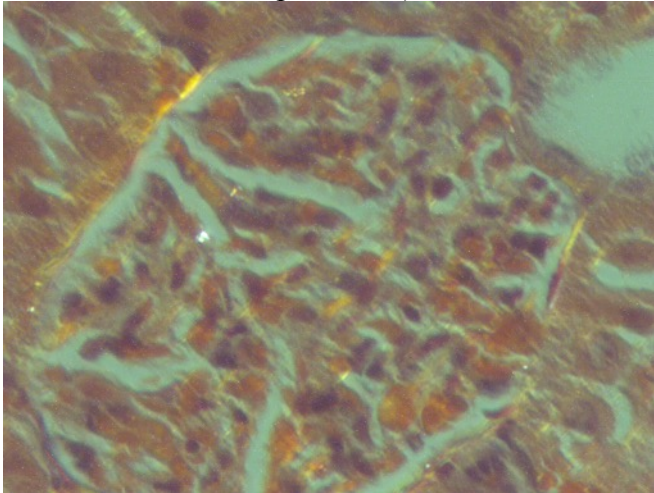


Рисунок 7.23. Кортикoвое вещество почки  
Группа ALT-711 12,5 мг/кг. Объектив 40.  
Окраска почек Sirius Red (поляризационная  
микроскопия)

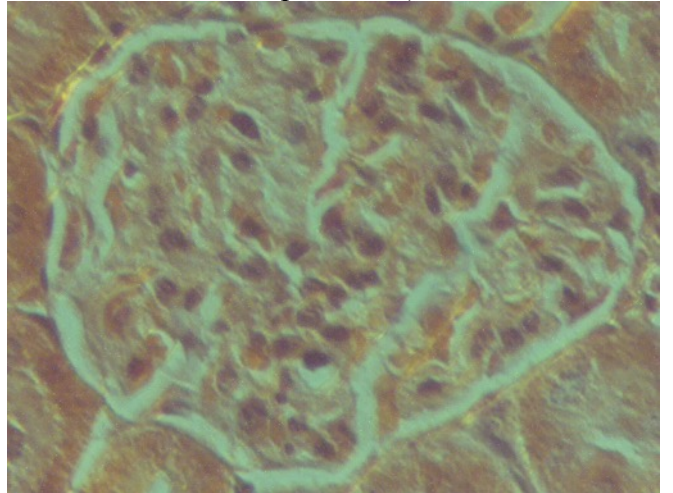


Рисунок 7.24. Кортикoвое вещество почки  
Группа DF-5 12,5 мг/кг. Объектив 40.  
Окраска почек Sirius Red (поляризационная  
микроскопия)

Таблица 7.3 – Морфометрическое исследование срезов почек, окрашенных по Массону, крыс-самцов со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом и диабетической нефропатией, получавших соединения DF-5 (12,5 мг/кг в/ж) и ALT-711 (12,5 мг/кг в/ж), к концу исследования (30-дневное введение).

Группа	Окраска по Массону		
	Площадь клубочка, мкм <sup>2</sup>	Площадь соединительной ткани, мкм <sup>2</sup>	Относительная площадь соединительной ткани, %
Интактный контроль	14885,17±1932,23	695,919±195,25	4,6
Контроль с СД	12572,63±1015,25 <sup>*</sup>	3356,46±1871,64 <sup>*</sup>	26,7 <sup>*</sup>
ALT-711	13968,94±856,26 <sup>#</sup>	1640,38±543,19 <sup>#</sup>	11,7 <sup>#</sup>
DF-5	14753,21±975,23 <sup>#</sup>	2397,29±832,43 <sup>#</sup>	16,2 <sup>#</sup>

Примечание: \* – различия с показателями интактного контроля достоверны,  $p < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни); # – различия с показателями контрольной группы (СД) достоверны,  $p < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни).

Таблица 7.4 – Морфометрическое иммуногистохимическое исследование срезов почек крыс-самцов со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом и диабетической нефропатией, получавших соединения DF-5 (12,5 мг/кг в/ж) и ALT-711 (12,5 мг/кг в/ж), к концу исследования (30-дневное введение).

Группа	ИГХ исследование – AGEs			ИГХ исследование – Фибронектин			ИГХ исследовании – RAGE		
	ПК, мкм <sup>2</sup>	ППМ, мкм <sup>2</sup>	ОППМ, %	ПК, мкм <sup>2</sup>	ППМ, мкм <sup>2</sup>	ОППМ, %	ПК, мкм <sup>2</sup>	ППМ, мкм <sup>2</sup>	ОППМ, %
Интактн ый контроль	15287,35±1759, 13	1634,04±759,1 7	10,68	14885,17±1932, 23	695,91±251,18	4,6	13147,28±1321, 18	1197,02±298,1 6	9,1
Контроль с СД	12121,19±1234, 57*	3746,13±1098, 73*	30,9*	12175,13±1317, 68*	2496,17±958,1 3*	20,5*	11921,14±1137, 05*	3215,79±1021, 79*	26,96*
ALT-711	13106,82±1346, 49 <sup>#</sup>	2117,85±732,4 3 <sup>#</sup>	17,48 <sup>#</sup>	13328,13±1028, 46 <sup>#</sup>	1095,15±251,1 9 <sup>#</sup>	8,21 <sup>#</sup>	13038,17±1154, 61 <sup>#</sup>	1637,81±422,1 7 <sup>#</sup>	12,56 <sup>#</sup>
DF-5	12982,17±971,5 6 <sup>#</sup>	2471,09±658,8 1 <sup>#</sup>	19,03 <sup>#</sup>	12993,46±765,2 4 <sup>#</sup>	1603,48±457,0 2 <sup>#</sup>	12,34 <sup>#</sup>	12896,25±881,0 2 <sup>#</sup>	2131,04±981,4 4 <sup>#</sup>	16,53 <sup>#</sup>

Примечание: ПК – площадь клубочка; ППМ – площадь позитивного материала; ОППМ – относительная площадь позитивного материала; ИГХ – иммуногистохимическое исследование; AGEs – конечные продукты гликирования; RAGE – рецептор к конечным продуктам гликирования; \* – различия с показателями интактного контроля достоверны,  $p < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни); <sup>#</sup> – различия с показателями контрольной группы (СД) достоверны,  $p < 0,05$  (U-критерий Манна-Уитни).

## 7.2. Изучение гипогликемической активности соединения AZH-141 при введении интактным крысам-самцам

С учетом данных современных научных исследований в области этиологии и патогенеза СД, по-прежнему актуальной считается задача по поиску и созданию инновационных антидиабетических соединений, воздействующих на ранее незадействованные мишени, играющие первостепенную роль в развитии СД. Ингибирование протеинтирозинфосфатазы 1В (PTP1B) является перспективным направлением поиска новых лекарственных средств для терапии СД типа 2. PTP1B играет главную роль из всех протеинфосфатаз в процессе дефосфорилирования рецептора инсулина и, как следствие, в модуляции инсулиновой сигнализации [Johnson T. O., 2002]. Другая мишень, АМФ-активируемая протеинкиназа (АМРК), является главным регулятором клеточного энергетического гомеостаза. При ее активации выявляются инсулин-сенситизирующие эффекты, что делает ее потенциальной мишенью в терапии СД 2 типа [Coughlan K.A., 2014].

Опираясь на результаты предыдущих исследований *in vitro* соединения AZH-141, с учетом выявленных у него ингибирующей PTP1B активности и способности активировать АМРК, а также на полученное для него самое высокое значение антидиабетического функционала в исследованиях *in vivo* мы оценили его антидиабетогенное действие при однократном в/ж введении интактным животным и при курсовом (21 день) введении животным со стрептозотоцин-индуцированным СД на фоне высокожировой диеты. Данная экспериментальная модель со смешанным рационом на основе высокожировой диеты и последующей индукцией СД с помощью инъекции стрептозотоцина приводит к увеличению массы тела животных, увеличению площади адипоцитов и постепенному развитию гипергликемии и инсулинорезистентности по рецепторному механизму. За счет увеличения площади адипоцитов происходит уменьшение количества инсулиновых рецепторов на единицу площади [Olefsky J. M., 1981].

С учетом данных литературы о проведении исследований *in vivo* по изучению активаторов АМРК на моделях СД и/или метаболического синдрома для соединения AZH-141 была выбрана доза 30 мг/кг (в/ж) [Cool B., 2006], а в качестве препарата сравнения был взят метформин в дозе 450 мг/кг (в/ж) как препарат со схожим механизмом действия [Zhou G., 2001], так как активация АМРК метформином вовлечена в его нормализующее действие на гипергликемию без стимуляции секреции инсулина и снижение глюконеогенеза в печени.

Согласно результатам проведенных исследований, соединение AZH-141 оказывает гипогликемический эффект у интактных животных при однократном в/ж введении в дозе 300 мг/кг. При изучении уровня гипогликемической активности соединения AZH-141 было выявлено, что при введении AZH-141 значительно снижает уровень глюкозы в плазме крови по

сравнению с контролем (1% водный раствор КМЦ) ( $4,66 \pm 0,11$  ммоль/л против  $5,59 \pm 0,11$  ммоль/л на 120 мин после введения;  $4,34 \pm 0,18$  ммоль/л против  $5,42 \pm 0,14$  ммоль/л на 360 мин после введения) ( $p < 0,05$ ), что сопоставимо с проявленной активностью препарата сравнения метформина (рис. 7.25). Также было показано, что AZH-141 через 2 часа после введения снижает уровень глюкозы на 12,5% по сравнению с исходными значениями в 0 ч, а к шестому часу наблюдений уровень гликемии уменьшается на 18,5% ( $p < 0,05$ ) (рис. 7.25).

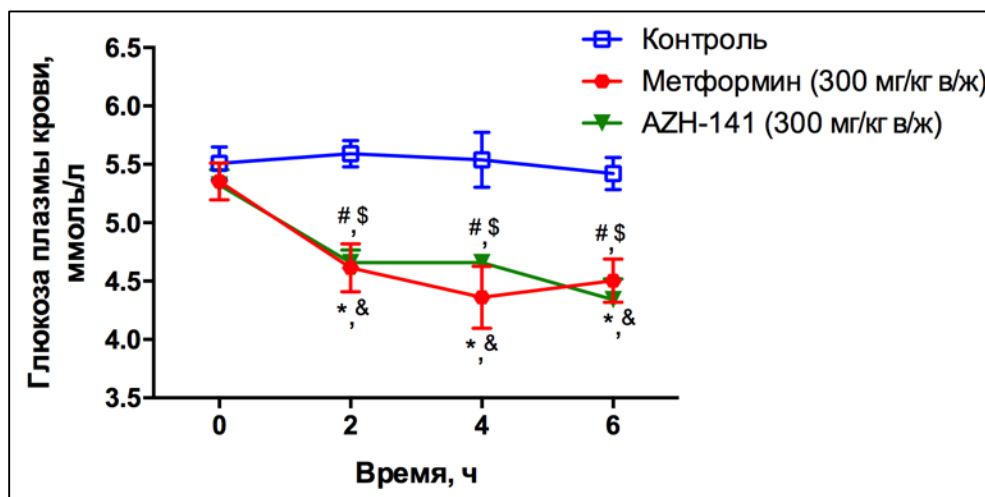


Рисунок 7.25. Влияние соединения AZH-141 и метформина при в/ж введении в дозе 300 мг/кг на уровень глюкозы в плазме крови (ммоль/л;  $M \pm m$ ) интактных крыс-самцов. Примечание: \* – различия с показателями группы контроля метформина статистически значимы ( $p < 0,05$ , непарный t-тест), & – различия с исходными показателями в 0 ч метформина статистически значимы ( $p < 0,05$ , парный t-тест), # – различия с показателями группы контроля соединения AZH-141 статистически значимы ( $p < 0,05$ , непарный t-тест), \$ – различия с исходными показателями в 0 ч соединения AZH-141 статистически значимы ( $p < 0,05$ , парный t-тест).

### 7.3 Изучение антидиабетической активности соединения AZH-141 на модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс, находящихся на высокожировой диете

#### 7.3.1 Влияние соединения AZH-141 и метформина на массу тела животных

Антидиабетическую активность соединения AZH-141 в дозе 30 мг/кг и препарата сравнения метформина в дозе 450 мг/кг изучали при в/ж введении на модели стрептозотоцин (35 мг/кг) – индуцированного сахарного диабета типа 2 у крыс-самцов, содержащихся на высокожировой диете (58% жиров, 25% белка, 17% углеводов от общего количества калорий). В эксперимент включали животных с уровнем глюкозы в плазме крови натощак  $> 15$  ммоль/л.

Гибель животных, включенных в эксперимент, не наблюдалась. В целом, динамика массы тела животных, получавших соединение AZH-141, статистически значимо не отличалась от таковой в группе отрицательного контроля (1% водный раствор КМЦ). В течение всего срока исследования животные контрольной группы набирали вес, в то же время масса тела животных,

получавших вещество AZH-141, немного снизилась, но данный эффект был статистически незначим по сравнению с исходными значениями массы тела крыс (рис. 7.26).

В группе крыс, получавших метформин, прирост массы тела также не наблюдался, средняя масса тела животных даже незначительно снизилась, однако, как и в случае с соединением AZH-141, не было выявлено статистически значимых различий массы тела животных на 21-е сутки введения метформина с их исходными показателями (рис. 7.26).

Таким образом, динамика изменения массы тела животных имела схожий характер в группе вещества AZH-141 и в группе препарата сравнения метформина.

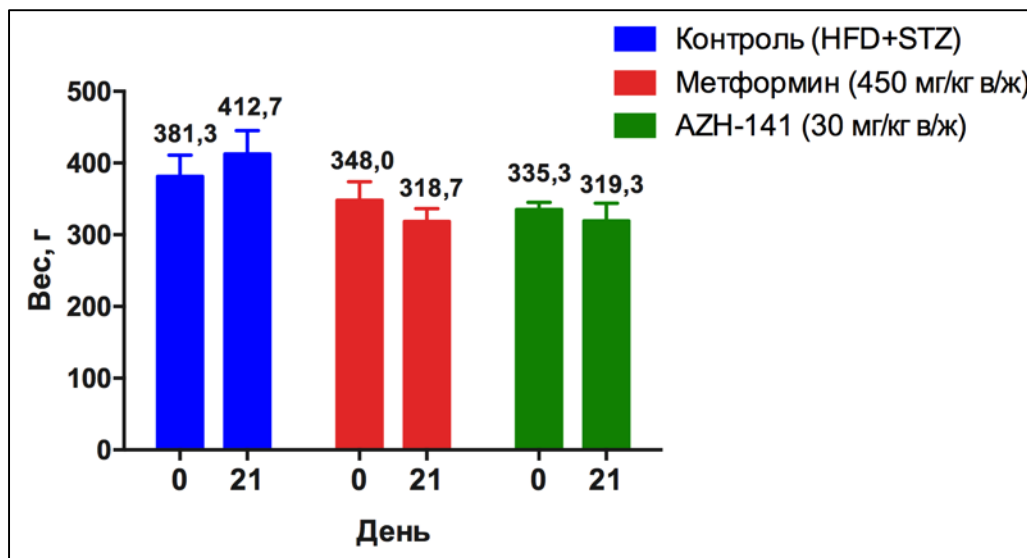


Рисунок 7.26. Влияние соединения AZH-141 (30 мг/кг в/ж) и метформина (450 мг/кг в/ж) на массу тела (г;  $M \pm m$ ) крыс-самцов со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом на фоне высокожировой диеты в течение 21-дневного введения.

### 7.3.2 Влияние соединения AZH-141 и метформина на уровень гликемии крови

Было показано, что применение соединения AZH-141 в течение 21 суток предотвращает прогрессирование СД 2 типа на фоне высокожировой диеты, и значительно снижает уровень глюкозы в плазме крови по сравнению как с исходными значениями ( $13,6 \pm 0,7$  ммоль/л против  $21,9 \pm 0,9$  ммоль/л) ( $p < 0,05$ ), так и с отрицательным контролем (1% водный раствор КМЦ) ( $13,6 \pm 0,7$  ммоль/л против  $21,4 \pm 1,8$  ммоль/л) ( $p < 0,05$ ) (таблица 7.5).

В то же время метформин, в отличие от соединения AZH-141, оказывал статистически значимое влияние на базальный уровень глюкозы в плазме крови в течение всего периода терапии, начиная с первого дня введения, по сравнению с исходными показателями и показателями отрицательного контроля (табл. 7.5).

Стоит отметить, что выраженность гипогликемического эффекта соединения AZH-141 статистически незначимо превосходит аналогичный эффект метформина на 21-й день введения (табл. 7.5).

Таблица 7.5 – Влияние соединения AZH-141 (30 мг/кг в/ж) и метформина (450 мг/кг в/ж) на базальный уровень глюкозы в плазме крови (натошак) (ммоль/л; M±m) крыс-самцов со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом на фоне высокожировой диеты в течение 21-дневного введения.

Соединения	Базальный уровень глюкозы в плазме крови (ммоль/л)					
	Д0	Д1	Д5	Д10	Д15	Д21
AZH-141 (30 мг/кг в/ж)	21,9±0,9	21,7±0,8	21,2±2,2	20,4±1,1	16,1±1,2 <sup>*#</sup>	13,6±0,7 <sup>*#</sup>
Метформин (450 мг/кг в/ж)	23,7±2,8	16,6±1,2 <sup>*#</sup>	12,8±2,2 <sup>*#</sup>	16,6±1,5 <sup>*#</sup>	16,3±1,4 <sup>*#</sup>	16,4±2,6 <sup>*#</sup>
Отрицательный контроль (1% водный раствор КМЦ)	22,0±1,0	20,9±0,8	20,3±1,1	21,1±1,5	21,8±1,9	21,4±1,8

Примечание: Д0, Д1, Д5, Д10, Д15, Д21 – день 0 (исходно), день 1, день 5, день 10, день 15 и день 21, соответственно; КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза; отличия от значения в Д0 достоверны: \* – при  $p < 0,05$  (критерий Вилкоксона); различия с показателями отрицательного контроля (1% водный раствор КМЦ) достоверны: # – при  $p < 0,05$  (критерий Краскела-Уоллиса с постестом Данна).

Результаты глюкозотолерантного теста свидетельствуют о том, что для соединения AZH-141 характерен только краткосрочный антигипергликемический эффект на 15 мин после его в/ж введения (рис. 7.27). Так через 15 мин после в/ж введения AZH-141 регистрировалось значимое уменьшение уровня гликемии на 13,9% по сравнению с отрицательным контролем (1% водный раствор КМЦ) ( $p < 0,05$ ), а спустя 30 мин и далее уровень глюкозы в указанной группе не отличался от значений группы отрицательного контроля.

При этом в группе животных, получавшей препарат сравнения, через 15 мин после в/ж введения метформина было зафиксировано уменьшение уровня гликемии на 19,0% по сравнению с контролем, а спустя 30 мин после введения глюкозы ее уровень в плазме крови снизился на 22,0% по сравнению с контрольными значениями. При исследовании образцов крови первого часа было выявлено, что уровень глюкозы в крови крыс, получавших метформин, составил  $15,01 \pm 0,28$  ммоль/л, что ниже значений, полученных для группы отрицательного контроля. При этом гипогликемическая активность метформина превалировала над таковой AZH-141; так, на 30-й и 60-й мин наблюдения содержание глюкозы в плазме крови в группе животных, получавших метформин, понизилось на 19,8% и на 15,7%, соответственно, по сравнению с группой, получавшей вещество AZH-141 ( $p < 0,05$ ).

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

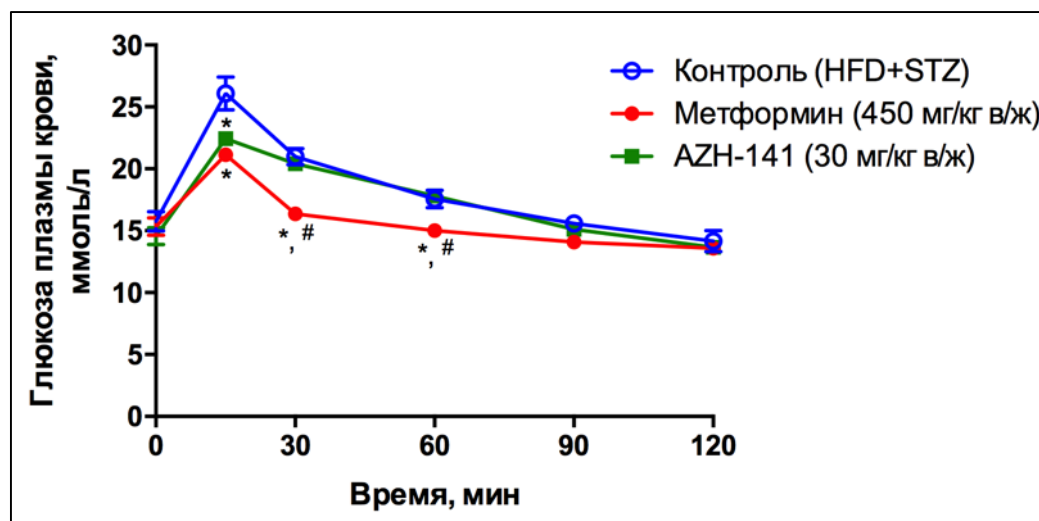


Рисунок 7.27. Влияние соединения AZH-141 (30 мг/кг в/ж) и метформина (450 мг/кг в/ж) после продолжительного курса введения (Д21; 21-е сутки) на уровень глюкозы в плазме крови (ммоль/л;  $M \pm m$ ) крыс-самцов со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом на фоне высокожировой диеты после пероральной нагрузки глюкозой (2 г/кг). Примечание: различия с показателями группы контроля достоверны: \* – при  $p < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ с посттестом Даннета); различия с показателями группы, получавшей AZH-141 (30 мг/кг в/ж), достоверны: # – при  $p < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ с посттестом Даннета).



### 7.3.3 Морфометрические параметры жировой ткани у крыс

Установлено, что среднее значение общей массы жировой ткани у животных, получавших препарат сравнения метформин, статистически достоверно в 1,9 раза было ниже значения группы отрицательного контроля (1% водный раствор КМЦ) (рис. 7.28).

Введение вещества AZH-141 хоть и приводило к снижению общей массы жировой ткани к концу эксперимента, но при этом значения не достигли уровня статистической значимости ни по сравнению с показателями отрицательного контроля, ни по сравнению со значениями группы, получавшей метформин (рис. 7.28).

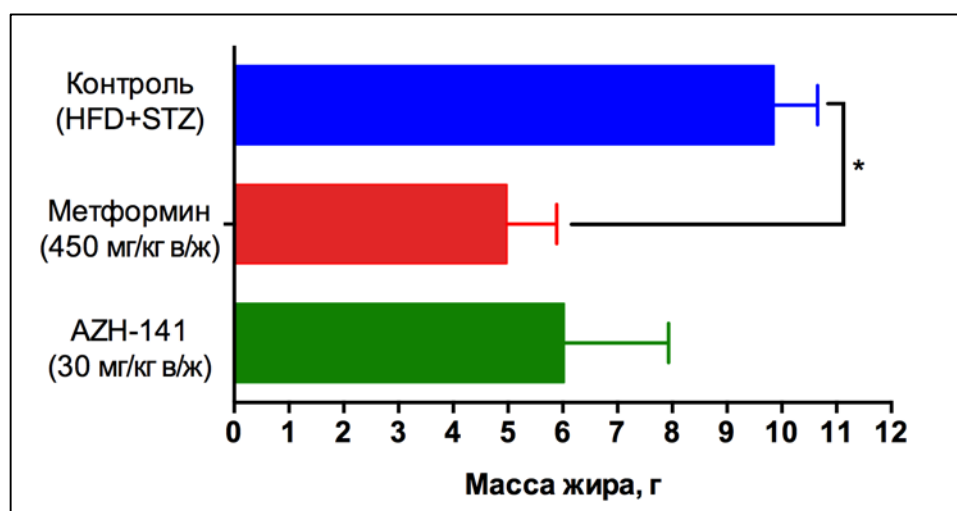


Рисунок 7.28. Влияние соединения AZH-141 (30 мг/кг в/ж) и метформина (450 мг/кг в/ж) после продолжительного курса введения (Д21; 21-е сутки) на общую массу жировой ткани (г;  $M \pm m$ ) крыс-самцов со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом на фоне высокожировой диеты. Примечание: различия с показателями группы контроля достоверны: \* – при  $p < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ с посттестом Даннета).

При рассмотрении вклада отдельных депо в общую массу жировой ткани было обнаружено, что в группе животных, которым вводили метформин, масса ретроперитонеальной жировой ткани достоверно снизилась в 2,7 раза ( $p < 0,05$ ), масса эпидидимальной жировой ткани достоверно снизилась в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ), масса мезентериальной жировой ткани статистически недостоверно снизилась в 1,9 раза, соответственно, по сравнению с группой крыс, получавших 1% водный раствор КМЦ (рис. 7.29).

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

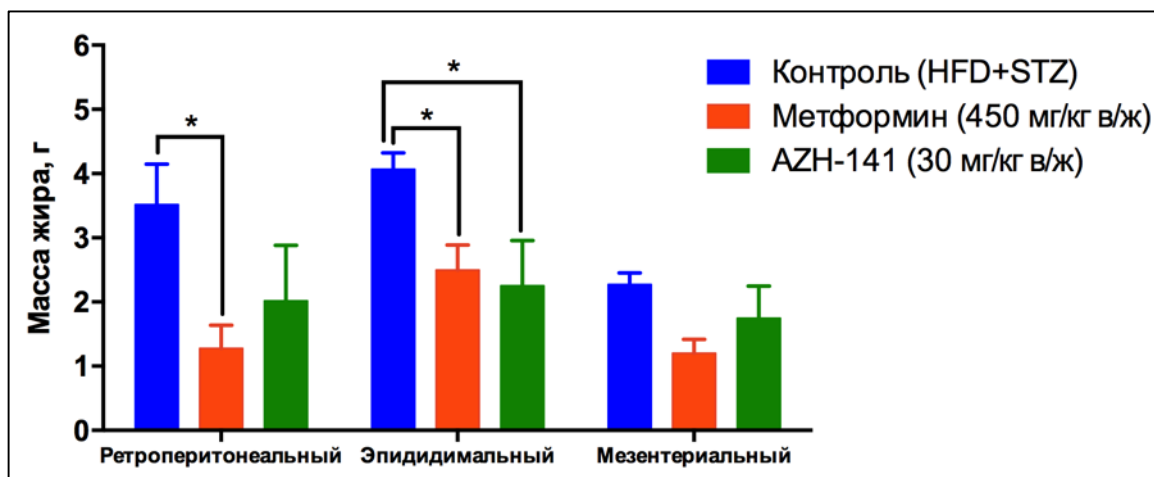


Рисунок 7.29. Влияние соединения AZH-141 (30 мг/кг в/ж) и метформина (450 мг/кг в/ж) после продолжительного курса введения (Д21; 21-е сутки) на массу ретроперитонеальной, эпидидимальной и мезентериальной жировой ткани (г;  $M \pm m$ ) крыс-самцов со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом на фоне высокожировой диеты. Примечание: различия с показателями группы контроля достоверны: \* – при  $p < 0,05$  (однофакторный дисперсионный анализ с посттестом Даннета).

#### 7.4 Заключение

Установлено, что исследуемое соединение DF-5 с выраженной способностью разрушать сшивки гликированных белков *in vitro* на модели СД типа 1 с диабетической нефропатией оказывает нефропротективное действие и уменьшает выраженность патологических изменений почечной ткани.

При введении экспериментальным животным соединения DF-5 курсом продолжительностью 30 дней отмечались положительные изменения в показателях массы тела животных и содержания  $HbA_{1c}$ . Исключение составил уровень глюкозы в плазме крови, для которого не было зафиксировано значимое снижение. На фоне введения вещества DF-5 у исследуемых животных с СД наблюдалась тенденция к улучшению экскреторной функции почек по сравнению с контрольной группой животных с выраженной наблюдаемой нефропатией к концу исследования. Данные полученные *in vivo* эффекты свидетельствуют, что активность данного 9-бензил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола под шифром DF-5 сопоставима с таковой у известного экспериментального соединения ALT-711 (алагебриум) с доказанным нефропротективным действием.

Второе изучаемое соединение, представляющее собой гидробромид 1-(2,2-диметиламиноэтил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин под шифром AZH-141 с высокой РТР1В-ингибирующей активностью и умеренной способностью активировать АМПК, при исследовании на модели экспериментального СД типа 2 также продемонстрировало свою эффективность. При 21-дневном введении экспериментальным

животным наблюдали выраженный антигипергликемический эффект соединения AZH-141, сопоставимый с действием референтного препарата метформина. Достоверный гипогликемический эффект соединения AZH-141 отмечался с 15-ого дня после начала введения ( $p < 0,05$ , по сравнению с показателями группы отрицательного контроля с СД, получавшей 1% водный раствор КМЦ). Также стоит отметить положительную динамику изменения массы тела животных, которая имела схожий характер в группе, получавшей AZH-141, и в группе препарата сравнения метформина, хотя эти изменения и не обладали статистической значимостью. При исследовании влияния терапии AZH-141 на массу жировой ткани крыс-самцов с СД на фоне высокожировой диеты было зафиксировано достоверное снижение массы эпидидимальной жировой ткани ( $p < 0,05$ ), в то же время масса жировой ткани из других источников, как и ее общая масса, также были меньше, чем в группе отрицательного контроля, хотя и не было показано достоверной разницы. Таким образом, показанный для AZH-141 антигипергликемический эффект оказался сопоставимым с соответствующим действием препарата сравнения метформина, поэтому перспективным является дальнейшее изучение его антидиабетических свойств.

## ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В современной медицинской химии и фармакологии востребованным направлением является получение новых химических соединений, обладающих эффективным терапевтическим действием, которое основано на подтвержденном влиянии на определенную биологическую мишень. Несмотря на внедрение и повсеместное использование технологии высокопроизводительного скрининга (*high throughput screening, HTS (англ.)*), позволяющего проводить тестирование более 100 тыс. образцов в день на различные виды фармакологической активности [Liu B., 2004]; количество лекарственных кандидатов, успешно прошедших доклинические и клинические исследования, уменьшается ежегодно [Ward D. J., 2013; Scannel J. W., 2012]. Для решения данной проблемы в медицинской химии разрабатываются и совершенствуются рациональные направления в дизайне потенциально активных низкомолекулярных терапевтических агентов, которые позволят на начальных этапах разработки соединений-лидеров снижать возможные риски и материальные затраты на последующих этапах внедрения кандидата в лекарственное средство. Среди таких направлений выделяются фрагментационные методы [Schreiber S. L., 2000], которые позволяют подобрать подходящий молекулярный каркас для потенциальной молекулы, и должным образом его модифицировать.

Одним из таких фрагментационных подходов, позволяющих еще на стадии планирования химического синтеза заложить более высокую вероятность получения целевой биологической активности по сравнению с эмпирическим скринингом, является *концепция привилегированных структур или подструктур (privileged structures (англ.))*. Концепция привилегированных подструктур была сформулирована в медицинской химии на основе того, что определённые минимальные структурные субъединицы, которые обнаруживались в нескольких лекарственных средствах или соединениях-лидерах, были способны обеспечивать взаимодействие лиганда с различными семействами биологических мишеней [Duarte C. D., 2007]. Привилегированные подструктуры иногда рассматриваются как «молекулярные отмычки» к определенным семействам мишеней (*target family-directed masterkeys (англ.)*), так, создаваемые на их основе соединения позволяют достичь значительного целевого разнообразия мишеней, с которыми будет способна взаимодействовать полученная молекула [Müller G., 2003]. С точки зрения медицинской химии интересным представляется фрагментировать молекулу, обладающую определенными полезными свойствами, на «каркас» (*framework (англ.)*) [Bemis G. W., 1996] и «периферию» (*side chains (англ.)*) [Bemis G. W., 1999] для того, чтобы наиболее формально представить структурный дизайн какого-либо органического соединения. В соответствии с этой гипотезой, анализ всех известных лекарственных препаратов в 1996 году показал, что они

содержали 1179 различных молекулярных «каркасов», однако, 32 (или 3%) из этих «каркасов» обнаруживались в структуре 50% всех препаратов [Vemis G. W., 1996].

Использование привилегированных структур при создании комбинаторных библиотек соединений вместе с информацией о структуре мишени или об известных лигандах может увеличить вероятность нахождения соединений-лидеров. Подразумевается, что привилегированная структура в составе лиганда обеспечивает сродство к мишени, в то время как избирательность может быть оптимизирована надлежащей структурной модификацией остальной части молекулы («периферии»). В конечном итоге, единая крупная комбинаторная библиотека привилегированных структур может стать источником лигандов для целого ряда мишеней, сокращая время поиска органических соединений с желаемыми биологическими свойствами.

В обзорах, в которых рассматривается понятие привилегированных структур [Horton D. A., 2003; Bondensgaard K., 2004; DeSimone R. W., 2004; Costantino L., 2006; Duarte C.D., 2007; Kamal A., 2006a; Kamal A., 2006b], данные многочисленные фрагменты, обозначенные как привилегированные структуры или подструктуры, включают бензодиазепины, дигидропиридины, хиназолины, хиноксалины, хромоны, бифенилы, дифенилметаны, индолы, N-арилпиперазины, бензимидазолы.

В нашем исследовании мы обратились к соединениям, содержащим только одну привилегированную подструктуру – бифенил, их биоизостерным аналогам [Зефирова О.Н., 2002; Meanwell N. A., 2011] – производным дифенилоксида, не обладающими свойствами привилегированности, а также соединениям, которые в своем составе содержат сразу две привилегированные подструктуры – бифенил и конденсированные азолы.

Бифенил является привилегированной структурой и имеет большое значение для медицинской химии [Costantino L., 2006; Severinsen R., 2008; Jain Z. J., 2013]. Среди его производных были найдены соединения, относящиеся к блокаторам АТ<sub>1</sub>-рецепторов [Ferrario C. M., 2006; Aulakh G. K., 2007; Chopra H. K., 2013; Chi Y. H., 2013], агонистам АТ<sub>2</sub>-рецепторов [Liu J., 2013], антагонистам ЕТ<sub>А</sub>-рецепторов [Murugesan N., 2003], ингибиторам РТР1В [Malamas M. S., 2000; Sachan N., 2009; Shim Y. S., 2003], активаторам АМПК [Cool B., 2006; Kim J., 2016], ингибиторам SGLT2 [Ding Y., 2015], аллостерическим модуляторам mGluR<sub>2</sub> [Galici R., 2006], агонистам D<sub>2</sub>-рецепторов [Bardin L., 2007; Wadenberg M.-L., 2007], ингибиторам агрегации тромбоцитов [Müller T. H., 1997; Akkerhuis K., 2001; Wong P. C., 2002; Pinto D. J., 2006; Lee T. Y., 2017]. Среди производных бифенила были найдены антагонисты Н<sub>3</sub>-гистаминовых рецепторов в ЦНС [Morini G., 2008; Bordi F., 2012; Nikolic K., 2014], соединения, обладающие сродством к 5-HT<sub>4</sub> [Brudeli B., 2013] и 5-HT<sub>7</sub> рецепторам [Kim Y., 2013; Kim Y., 2014; Canale V., 2016], ингибирующие бутирил- и ацетилхолинэстеразу в центральной нервной системе [Mutahir S.,

2016]. Среди бифенилов были обнаружены соединения, стимулирующие секрецию соматотропина [Smith R. G., 1993], действующие избирательно на изоформу XIV карбоангидразы человека [La Regina G., 2015], агонисты LXR<sub>s</sub> [Ullrich J. W., 2010], ингибиторы 17 $\beta$ -HSD2 [Gargano E. M., 2016] и ингибиторы MMPs – 2, 3, 9, 13 [Chollet A.-M., 2002].

На основе производных бифенила созданы такие антигипертензивные лекарственные препараты, как лозартан, кандесартан, телмисартан, ирбесартан, валсартан, азилсартан, олмесартан [Aulakh G. K., 2007; Naik P., 2010; Mavromoustakos T., 2013], нестероидный противовоспалительный препарат флурбипрофен [Brogden R. N., 1979].

Для производных бифенила, сопряженных с бензимидазолом, характерны AT<sub>1</sub>-антагонистическая активность [Kubo K., 1993; Balakumar P., 2011; Jain A., 2011; Oijma M., 2011], PPAR $\gamma$ -активирующее действие [Goebel M., 2009; Obermoser V., 2017], активирующая активность в отношении AMPK [Giordanetto F., 2012], ингибирующая SCD1 активность [Powell D. A., 2010], противовоспалительные свойства [Saavedra J. M., 2011; Silveira K. D., 2013], нейропротекторные свойства [Wright J. W., 2013; Wang J., 2014].

Многие производные дифенилоксида (дифениловый эфир, феноксибензол) представляют интерес как важные синтетические объекты и потенциальные биологически активные вещества, для которых характерен ряд фармакологических свойств: противовоспалительные [Attal V., 2003; Choi M. S., 2007], диуретические [Lykke K., 2015], антитромбогенные [Park E. S., 2011], ингибирующие в отношении SCD1 [Matter H., 2013]. Среди производных дифенилоксида выявлены соединения, ингибирующие активность  $\alpha$ -глюкозидазы [Zhang L.-H., 2016], антагонисты рецептора глюкагона [Kim R. M., 2008], агонисты LXR<sub>s</sub> [Travins J. M., 2010].

На основе производных феноксибензола созданы лекарственные препараты с противовоспалительной активностью, селективный ингибитор ЦОГ 2, нимесулид [Mareddy J., 2013] и диуретической активностью – буметанид [Ward A., 1984].

Таким образом, можно сделать вывод, что производные бифенила, а также производные бифенила, сопряженные с бензимидазольным гетероциклом, могут быть перспективными группами для поиска новых соединений с разнообразной биологической активностью. Для получения соединений с высокой биологической активностью и, возможно, эффективно взаимодействующих с более чем одним семейством биологических мишеней, комбинирование двух привилегированных структур является перспективным направлением в медицинской химии.

Так, для проявления разнообразных биологических эффектов производными бифенила желательным является наличие в молекуле адекватной азотсодержащей гетероциклической системы. Например, в структуре гипотензивных препаратов из группы блокаторов AT<sub>1</sub>-рецепторов в качестве гетероцикла могут выступать имидазол, бензимидазол или пиримидин

[Aulakh G. K., 2007; Grange R. L., 2008], что способствует их высокой эффективности, а, в случае некоторых препаратов (телмисартан), даже появления мультитаргетных свойств [Goyal S. N., 2011].

Поэтому перспективным является изучение не только производных с одной привилегированной структурой бифенила или его биоизостеров, но и сочетаний указанной структуры с иными привилегированными и непривилегированными каркасами.

Таким образом, в нашем исследовании предполагалось провести сравнение фармакологических свойств соединений, содержащих одну привилегированную подструктуру – бифенил, сопряженный с азотсодержащими гетероциклическими фрагментами, две привилегированные подструктуры – бифенил и конденсированные азолы, и соединений, являющихся биоизостерными аналогами бифенила, но не относящихся к привилегированным структурам, – дифенилоксидов.

Скрининговые исследования по 10 видам фармакологической активности нами были проведены для 35 веществ, из которых 6 относятся к производным бифенила, связанных с бензимидазолом через метиленовую/оксоэтильную группу, 8 соединений – к производным замещенного бифенила, связанного с 2,3-дигидро-9*H*-имидазо[1,2-*a*]бензимидазолом через метиленовую группу, и непосредственно связанного с гетероциклическим кольцом имидазо[1,2-*a*]бензимидазола, 7 соединений – к производным бифенила, связанным с имидазолом/тиазолом через оксоэтильную группу, и 14 соединений – к производным дифенилоксида.

На первом этапе проводили изучение АТ<sub>1</sub>-антагонистической активности на модели индуцированной введением ангиотензина II сократительной активности изолированной портальной вены крыс *in vitro*. В качестве препарата сравнения использовали телмисартан, его ингибирующий эффект составил 99,3%.

Показано, что гидробромид 1-(2,2-диметиламиноэтил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин (AZH-141) и 4'-(2,3-дигидро-9*H*-имидазо[1,2-*a*]бензимидазол-9-ил-метил)бифенил-2-карбонитрил (AZH-143) проявили низкий уровень АТ<sub>1</sub>-ингибирующей активности, 14,3% и 21,9%, соответственно, оказавшийся более чем в 4,5 раза ниже уровня аналогичной активности препарата сравнения телмисартана. В результате изучения *in vitro* было установлено, что для бромидов 4-метил- и 4,5-диметил-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазола и бромидов N<sup>1</sup>-замещенного-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]имидазолия, а также производных дифенилоксида не было характерно наличия статистически значимого АТ<sub>1</sub>-антагонистического эффекта.

Таким образом среди изученных веществ из ряда производных бифенила, сопряженных с бензимидазолом, не было обнаружено соединений с выраженными АТ<sub>1</sub>-ингибирующими свойствами. Это может свидетельствовать в пользу теории о том, что для проявления АТ<sub>1</sub>-

антагонистической активности привилегированными структурами в составе соединений являются бифенил-тетразольный или бифенил-карбоксильный фрагменты [Duarte C.D., 2007; Welsch M. E., 2010].

В результате изучения влияния соединений на АДФ (5 мкмоль/л) – индуцированную агрегацию тромбоцитов кролика было установлено, что для 60% изученных веществ было характерно статистически достоверное антиагрегантное действие. Антиагрегантный эффект препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты составил 27,8%. Для 12 из изученных соединений уровень активности соответствовал либо превосходил аналогичный показатель референтного препарата сравнения ацетилсалициловой кислоты. Так, вещество AZH-141 превосходило ацетилсалициловую кислоту по антиагрегантной активности в 3,2 раза, AZH-136 – в 2,8 раза, AZHT-9 – в 2,7 раза.

Для соединений с наибольшей активностью на данной методике были проведены расширенные исследования в диапазоне концентраций 1 мкмоль/л – 100 мкмоль/л и рассчитана  $EC_{50}$ .

В ходе экспериментального изучения дозозависимой антиагрегантной активности ацетилсалициловой кислоты было рассчитано значение  $EC_{50}$ , которое составило 1140 мкмоль/л.  $EC_{50}$  вещества AZH-141 составила 2,31 мкмоль/л, AZHT-9 – 3,25 мкмоль/л, а соединения AZH-136 – 8,09 мкмоль/л. Так, соединения AZH-141, AZHT-9 и AZH-136 по показателю  $EC_{50}$  превосходили препарат сравнения в 493,5, 350 и 140,9 раза, соответственно.

Среди изученных соединений был проведен детальный анализ влияния заместителей на их уровень антиагрегантной активности. В результате было выявлено, что в группе бромидов 4-метил- и 4,5-диметил-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазола вклад в наличие антиагрегантной активности могут вносить метильные заместители в  $C^4$ - и  $C^5$ -положениях тиазола, а также атом брома в 4-ом положении бифенила. Так, высокое антиагрегантное действие соединения AZHT-9 определяется метильными радикалами в  $C^4$ - и  $C^5$ -положениях тиазола, и атомом брома в 4-ом положении бифенила.

На основе анализа зависимости антиагрегантной активности от структуры в группе производных 2-иминобензимидазолина можно сделать вывод, что изменение силы антиагрегантного действия у высокоактивных веществ данной группы зависит от радикалов в  $N^1$ -положении. Так, выраженное антиагрегантное действие двух наиболее активных соединений AZH-141 и AZH-136 определяется диметиламиноэтильным и пирролидиноэтильным заместителями, соответственно, в положении  $N^1$  иминобензимидазолина.

В ранее проведенных исследованиях [Кузнецова В. А., 2014] было изучено антигликирующее действие известного ингибитора неферментативного гликозилирования аминогуанидина,  $IC_{50}$  которого на данной модели составила 459 мкмоль/л. Поэтому, все



изучаемые соединения на данном этапе тестировали в концентрации 1 ммоль/л. При исследовании способности соединений подавлять неферментативное гликозилирование белков было найдено 18 соединений, уровень антигликирующей активности которых достоверно отличался от показателей контрольных измерений. Уровень проявленной ими антигликирующей активности соответствовал среднему и низкому, и они уступали по своей эффективности веществу сравнения аминогуанидину, эффект которого составил 57,8%.

Исследование способности соединений регулировать гликированный БСА *in vitro* проводили по предварительно разработанному и валидированному методу [Спасов А. А., 2016г]. Активность вещества сравнения ALT-711 на данной модели составила 18,0%. При этом в результате изучения *in vitro* было установлено, что только для 17% веществ характерно наличие значимого регулирующего эффекта, достоверно отличающегося от показателей контроля. Только для двух из всех изученных соединений уровень активности был сопоставим с либо превосходил соответствующий показатель вещества сравнения ALT-711. Так, вещество DF-5 превосходило ALT-711 по регулирующей активности в 2,5 раза, а соединение DF-4 по уровню проявленного эффекта было сопоставимо с ALT-711.

Для соединения DF-5 с наибольшей активностью на данной методике были проведены расширенные исследования его регулирующего действия в диапазоне концентраций 100 мкмоль/л – 10 ммоль/л и рассчитана  $IC_{50}$ . По показателю  $IC_{50}$  соединение DF-5 (1,62 ммоль/л) превосходило ALT-711 (6,35 ммоль/л) в 3,9 раза.

На другой экспериментальной модели мы изучали способность соединения DF-5 разрывать поперечные сшивки гликированных белков *in vitro* с помощью метода твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) по разрушению AGE сшивок БСА-коллаген [Ли С., 2012].

В ходе проведенного эксперимента было показано дозозависимое действие вещества сравнения ALT-771 (алагебриум) разрывать поперечные сшивки гликированных белков *in vitro* при исследовании в диапазоне концентраций 100 мкмоль/л – 5 ммоль/л. Была рассчитана величина  $IC_{50}$ , которая составила 1,89 ммоль/л, что соответствует данным литературы [Kim J., 2015].  $IC_{50}$  вещества DF-5 составила 0,31 ммоль/л. Соединение DF-5 по показателю  $IC_{50}$  превосходило вещество сравнения в 6,1 раза.

На основе анализа зависимости регулирующего действия от структуры в ряду производных 2-дифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазола можно сделать вывод, что изменение силы регулирующей активности наиболее активных веществ данной группы зависит от заместителей в N<sup>9</sup>-положении. В положении N<sup>2</sup> у всех производных располагается незамещенный бифенильный заместитель. Так, выраженное регулирующее действие соединений DF-5 и DF-4 определяется бензильным и бутильным радикалами, соответственно, в положении N<sup>9</sup>.

При изучении антиоксидантных свойств соединений на методике аскорбат-индуцируемого перекисного окисления липидов (ПОЛ) установлено, что среди изученных имидазолиевых и тиазолиевых производных бифенила и производных дифенилоксида только у 6 веществ уровень антиоксидантной активности значимо отличался от показателей контрольных измерений и соответствовал низкому (относительно активности вещества сравнения дибунола). В ряду производных бифенила, сопряженных с неконденсированным бензимидазолом, у большинства веществ, 83% от общего числа изученных соединений данной группы, выявлен низкий и средний уровень активности, который также не превышал таковой дибунола; тогда как в группе производных бифенила, сопряженных с имидазо[1,2-*a*]бензимидазолом, оказалось наибольшее число высокоактивных соединений, – 87,5%. При этом показатели антиоксидантного эффекта соединений данной группы превосходили аналогичные показатели веществ сравнения – дибунола и тролокса. То есть присутствие имидазобензимидазола в структуре молекулы вещества обуславливало наличие более высоких антиоксидантных свойств для протонированных форм ряда 2-(4-бифенил)имидазобензимидазола.

Высокие антиоксидантные свойства данных структур объясняются тем, что конденсированные производные бензимидазола являются полиядерными ароматическими соединениями [Пожарский А. Ф., 1985], имеющими сложную  $\pi$ -электронную систему с неспаренными электронами, что придает данной конденсированной системе свойства «электронноизбыточности» и делает уязвимой для атаки электрофильными частицами [Грандберг И. И., 1980]. В структуре имидазо[1,2-*a*]бензимидазола имеются 14 $\pi$ -электронная система и две пары неспаренных электронов на орбиталях, перпендикулярных  $\pi$ -системе. Таким образом производные имидазобензимидазола обладают высокой  $\pi$ -избыточностью и могут быть донорами электронных пар, не являющихся частью ароматической  $\pi$ -системы [Авдюнина Н. И., 1979], а, следовательно, характеризуются высокой реакционной способностью и возможностью ингибировать процессы свободно-радикального окисления.

Для группы соединений из класса производных бифенила, сопряженных с имидазо[1,2-*a*]бензимидазолом, которые проявили наибольшую активность на модели аскорбат-зависимого ПОЛ, были проведены расширенные исследования в диапазоне концентраций 0,1 мкмоль/л – 10 мкмоль/л и рассчитаны их  $IC_{50}$ .

В ходе экспериментального изучения дозозависимого антиоксидантного действия веществ сравнения дибунола и тролокса были рассчитаны значения  $IC_{50}$ , которые составили 0,27 мкмоль/л и 18,1 мкмоль/л, соответственно. Наименьшие значения  $IC_{50}$  были выявлены у вещества DF-1 – 0,19 мкмоль/л и DF-6 – 0,36 мкмоль/л. Так, соединения DF-1 и DF-6 по показателю  $IC_{50}$  превосходили тролокс в 95,3 и 50,3 раза, соответственно. Вещество DF-1 по показателю  $IC_{50}$  превосходило дибунол в 1,4 раза, а вещество DF-6 незначительно уступало ему.

У двух данных высокоактивных соединений в положении N<sup>9</sup> имидазо[1,2-a]бензимидазола содержатся диметиламиноэтильный (DF-6) или метильный (DF-1) заместители.

По результатам проведенного скрининга, принимая во внимание их высокие показатели антиоксидантной активности, вещества DF-1 и DF-6 были отобраны для дальнейшего исследования.

При изучении механизмов их антиоксидантного действия было выявлено, что соединения оказывают различную антиоксидантную и антирадикальную активность на моделях с отличающимся генезом свободно-радикальных реакций. Так, соединение DF-1, содержащее метильный заместитель в положении N<sup>9</sup> имидазо[1,2-a]бензимидазола, оказалось более активным в методе окисления радикала ABTS•, тогда как в отношении радикалов люминола и супероксида в системе люминол-зависимой хемилюминесценции оба вещества оказались в равной степени высокоактивными (рис. 8.1).

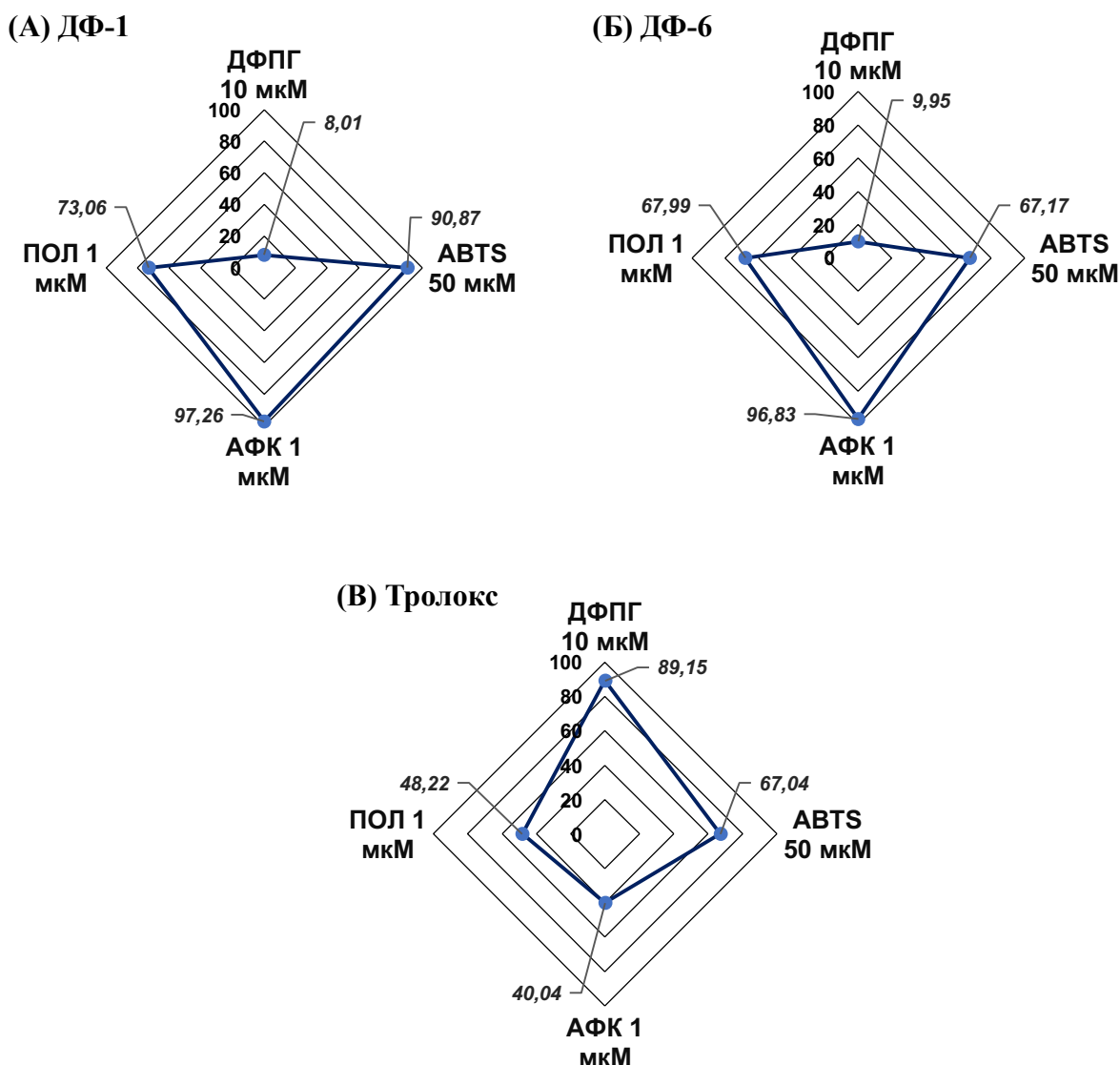


Рисунок 8.1. Активности соединений DF-1 (А), DF-6 (Б) и вещества сравнения тролокса (В) (% ингибирования) на моделях изучения антиоксидантных и антирадикальных свойств.

При этом показано, что активность обоих соединений в методе окисления ДФПГ• оказалась невысокой (рис. 8.1), что можно объяснить затрудненностью взаимодействия изучаемых соединений с данным радикалом из-за стерических характеристик строения молекулы вещества.

С учетом полученных данных экспериментальных исследований, сведений о водорастворимости и рассчитанном значении LD<sub>50</sub> при в/б введении соединения DF-6 (122 мг/кг), оно было рекомендовано к углубленному изучению его антиоксидантных свойств на моделях *in vivo*.

При изучении способности соединений влиять на активность фермента дипептидилпептидазы-4 (ДПП-4) было обнаружено, что только у 8-ми из всех изученных веществ уровень ингибирования ДПП-4 оказался статистически достоверным. Наиболее высокий уровень ДПП-4-ингибирующей активности, который тем не менее оказался в 1,4 раза ниже уровня аналогичной активности вилдаглиптина, был выявлен у двух производных 3-феноксифенила с диметиламиноэтильным (TONS-503) и морфолиноэтильным (TONS-504) заместителями.

В ходе изучения влияния соединений активность протеинтирозинфосфатазы 1В (РТР1В) было установлено, что для 54% изученных веществ характерно наличие значимого РТР1В-ингибирующего эффекта, достоверно отличающегося от контрольных показателей. Из них 4 вещества оказались способны значительно ингибировать активность РТР1В и превосходили по эффективности вещество сравнения NSC-87877, активность которого на данной модели составила 68,9%. Так, вещество AZH-137 превосходило NSC-87877 по РТР1В-ингибирующей активности в 1,5 раза, AZH-141 – в 1,2 раза. Для данных соединений проведено дозозависимое изучение ингибирующей активности в отношении РТР1В. Рассчитанное значение IC<sub>50</sub> для NSC-87877 составило 20,5 мкмоль/л. IC<sub>50</sub> вещества AZH-137 составила 29,3 мкмоль/л, AZH-141 – 97,2 мкмоль/л. Так, соединение AZH-137 по показателю IC<sub>50</sub> было сопоставимо с веществом сравнения. В то же время IC<sub>50</sub> AZH-141 превышала соответствующий показатель для соединения NSC-87877 в 4,8 раза.

Среди изученных соединений был проведен детальный анализ влияния заместителей на их уровень ингибирующей РТР1В активности. Соединение AZH-141 обладало максимальным ингибирующим эффектом в отношении РТР1В среди других гидробромидов 2-иминобензимидазолина, что мы связываем с наличием у него диметиламиноэтильного радикала в N<sup>1</sup>-положении. А у бромида 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия (AZH-137) была обнаружена самая высокая РТР1В-ингибирующая активность среди всех описанных в данной работе структур.

Среди аллостерических активаторов АМПК известно большое число бифенил-содержащих конденсированных гетероциклов [Giordanetto F., 2012]. По результатам исследований способности соединений изменять активность АМПК выявлено, что активирующий эффект вещества сравнения АICAR составил 178,1%. Показано, что для 16 соединений из всех изученных на данный вид активности веществ было характерно наличие статистически значимого активирующего АМПК эффекта.

При изучении имидазолиевых и тиазолиевых производных бифенила: бромидов 4-метил- и 4,5-диметил-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазола и бромидов N<sup>1</sup>-замещенного-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]имидазолия максимальный эффект был отмечен для 4-бромбифенилсодержащего производного имидазолия (LOSAZ-33) с метильной группой в N<sup>1</sup>-положении имидазола и соединения RUI-26, содержащего винильную группу в N<sup>1</sup>-положении и атом водорода вместо атома брома в 4-ом положении бифенила (146,2% и 140,0% активирование, соответственно). Из группы бифенилов, сопряженных с имидазо[1,2-*a*]бензимидазолом, наиболее активными оказались соединения AZH-143 и DF-4, которые в скрининговой концентрации активировали АМПК на уровне вещества сравнения АICAR (162,7% и 173,5% активирование, соответственно). Соединения TONS-281 и TONS-513 из группы производных 3-феноксibenзойной кислоты также проявили статистически значимую активность, но более чем в 1,8 раз меньшую, чем у вещества сравнения.

Также, стоит отметить, что у соединения AZH-141, у которого ранее уже был выявлен высокий РТР1В-ингибирующий эффект, также обнаружена способность активировать АМПК, однако в 2,4 раза меньшая, чем у вещества сравнения. С учетом описанного выше для AZH-141 высокого антиагрегантного действия и умеренного статистически достоверного гликогенфосфорилаза-ингибирующего эффекта (34,5% ингибирование), данное соединение можно отнести к полифункциональным. Оно является лидером в нашем исследовании по числу выявленных эффектов у одного соединения.

Таким образом, с учетом наиболее перспективных характеристик для AZH-141 по показателям изменения активности ферментов РТР1В и АМПК, а также показателю LD<sub>50</sub> вещество было выбрано для изучения его антидиабетического потенциала на экспериментальной модели сахарного диабета *in vivo*.

В отношении свойства изменять активность фермента гликогенфосфорилазы и глюкокиназы все изученные вещества оказались низко- и неактивными. При этом ингибирующая активность экспериментального ингибитора гликогенфосфорилазы CP-316819 составила 94,1%. Только для одного из всех протестированных веществ AZH-141 выявлена ингибирующая активность в отношении гликогенфосфорилазы. По результатам экспериментальных исследований только для одного из протестированных соединений, 2-метил-2-(3-

феноксibenзоат)пропионитрила 3-феноксibenзойной кислоты (TONS-281), процентное изменение активности фермента глюкокиназы статистически достоверно отличалось от контроля и составило 16,5%. При этом согласно данным литературы эффект известного экспериментального активатора глюкокиназы RO4389620 составил 171,0% [De Ceuninck F., 2013].

На следующем этапе был проведен анализ спектров фармакологической активности различных производных бифенила и дифенилоксида с использованием методов системной биологии и сетевой фармакологии. Использование ландшафтов биологических активностей (*bioassay activity landscape modeling (англ.)*) играло ключевую роль в восприятии и понимании отношений структура-активность изучаемых соединений. Построение выполнялось таким образом, чтобы на полученном изображении были видны основные закономерности, присущие исходному массиву данных: разделение на кластеры (виды активности) и уровень активности по шкале нормированных значений. Таким образом, задача анализа и описания данных решалась с помощью непосредственного зрительного восприятия изображения выраженности соответствующих видов активности.

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

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

В результате проведенного анализа медианных и супремальных оценок было показано, что из четырех представленных химических классов две гибридные линкерные структуры, полученные в результате соединения единичной связью двух привилегированных структур – бифенила и неконденсированного (конденсированного) бензимидазола, являются достаточно перспективными для поиска высокоактивных соединений: DP+BI в большей степени за счет

вклада базовой структуры, менее за счет вариабельности заместителей; DP+ImBI, наоборот, в большей степени за введения заместителей, повышающих активность, а менее – за счет базовой структуры.

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

Можно предполагать, что сочетание двух привилегированных фрагментов – бифенила и неконденсированного (конденсированного) бензимидазола – приводит к тому, что расширяются возможности связывания конечной базовой структуры с различными белками. Возможно, этот механизм осуществляется через связывание молекулы с каким-либо «особым» карманом сайта белка, например, ответственным за фиксацию так называемых «привилегированных» структур [Bywater R. P., 2006]. Взаимодействие производных бифенила, сопряженных с неконденсированным (конденсированным) бензимидазолом, с сайтом белка вероятно происходит в два этапа: связывание с «привилегированным» карманом сайта основной части молекулы (регулируется размерами лиганда) и связывание со «специфическим» карманом сайта (определяется введенными заместителями).

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

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

Согласно данным полученных расчетов нами отобраны для дальнейших экспериментальных исследований *in vivo* соединение AZH-141 с наиболее высоким значением антидиабетического функционала (табл. А.5 приложения А) и вещество DF-5 с аналогичным

высоким показателем и уникальным механизмом действия для изучения – способностью разрывать сшивки гликированных белков.

Доказано, что образование и накопление конечных продуктов гликирования (AGEs) развивается на фоне естественного процесса старения организма и ускоряется при СД. Неферментативное гликирование и сшивание белков не только приводит к снижению эластичности сосудов и миокарда, но и нарушает структурную целостность и физиологические функции внутренних органов. Кроме того, накоплены данные о том, что взаимодействие AGEs с их рецепторами (RAGE) способствует развитию оксидативного стресса [Nowotny K., 2015], а затем запуску иммуновоспалительных, тромбогенных и фиброзирующих реакций, тем самым вовлекаясь в формирование микрососудистых осложнений сахарного диабета, атеросклероза, эректильной дисфункции и апоптоза  $\beta$ -клеток поджелудочной железы [Schleicher E., 2007; Yamagishi S., 2012]. Но с открытием группы разрывателей поперечных сшивок гликированных белков удаление существующих AGEs с их помощью стало новым терапевтическим подходом к лечению заболеваний, ассоциированных с нейродегенеративными повреждениями, старением и таких опосредованных гипергликемией осложнений СД, как нефропатия, ретинопатия, васкулопатия и нейропатия [Vasan S., 2001].

Расщепление сформированных AGEs в почках с помощью известного экспериментального разрывателя сшивок ALT-711 (алагебриума) оказывает нефрозащитный эффект при СД [Forbes J. M., 2003]. Поэтому было проведено экспериментальное исследование вещества DF-5 на модели стрептозотоцин-индуцированного СД у крыс-самцов с целью оценить его антидиабетический потенциал *in vivo*, так ранее *in vitro* у него были обнаружены свойства разрывателей сшивок гликированных белков.

В первую очередь, продемонстрировано, что данная экспериментальная модель соответствовала изучаемой патологии – СД 1 типа. Спустя некоторое время после инъекции стрептозотоцина у животных наблюдалась хроническая гипергликемия, а также внешние признаки (полидипсия, полиурия) развития СД. На протяжении исследования животные с СД оказались менее склонны к набору массы тела, чем интактные; у них были зафиксированы повышенные значения гликемии крови и  $HbA_{1c}$  по сравнению с интактными животными ( $p < 0,05$ ). При этом изучаемые соединения DF-5 и ALT-711 при хроническом введении в течение 4-х недель в дозе 12,5 мг/кг (в/ж) способствовали увеличению массы тела крыс. К концу исследования у животных с СД, получавших ALT-711 или DF-5 уровень глюкозы в крови оказался снижен незначительно, но при этом содержание  $HbA_{1c}$  в обеих группах статистически значимо снизилось по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ), что характерно для механизма действия разрывателей сшивок гликированных белков.



Используемая экспериментальная модель сахарного диабета являлась адекватной и в отношении сформировавшейся диабетической нефропатии, так как по результатам исследования у контрольной группы животных были зафиксированы массивная протеинурия и повышенный диурез по сравнению с интактной. На гистологической картине почек отмечались очаговое утолщение базальной мембраны капилляров клубочков и расширение мезангия, нарушения микроциркуляции в виде полнокровия, явлений стаза и диапедеза эритроцитов, выраженные дистрофические и некротические изменения клубочкового аппарата и эпителия почечных канальцев; зафиксировано достоверное увеличение относительной площади соединительной ткани клубочков в 5,8 раз ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактным контролем. При проведении иммуногистохимического исследования материалов срезов почек животных контрольной группы выявлено достоверное увеличение относительной площади фибронектин-позитивного, AGEs-позитивного и RAGE-позитивного материала в 2,9-4,5 раза по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о наличии фиброзных изменений в ткани почек, опосредованных AGEs-модификацией компонентов внеклеточного матрикса.

Соединение DF-5 в дозе 12,5 мг/кг в/ж способствовало нормализации основных показателей, характеризующих снижение экскреторной функции почек при сахарном диабете. Изучаемое вещество достоверно снижало количество белка в моче и уровень суточной экскреции белка практически в 2-2,5 раза ( $p < 0,05$ ) в сравнении с группой контроля после 30-дневного введения веществ, не уступая при этом алагебриуму. Гистоморфологическая картина почек также свидетельствовала о эффективном нефрозащитном эффекте вещества DF-5. Была сохранена нормальная структура почечных клубочков, также выявлено количественное снижение признаков ранних изменений в стенках капилляров и мезангии клубочков. При проведении морфометрического иммуногистохимического исследования срезов почек животных, получавших DF-5, показано статистически достоверное снижение значений относительной площади фибронектин-позитивного, AGEs-позитивного и RAGE-позитивного материала в 1,6-1,7 раза по сравнению с контрольной группой животных с СД ( $p < 0,05$ ), что соответствовало нефрозащитному действию алагебриума. Разрывание сшивок AGEs с коллагеном и фибронектином при введении соединения DF-5 приводило к снижению количества данных продуктов в почечной ткани, а также уменьшению экспрессии RAGEs, что и было показано с помощью иммуногистохимического анализа.

В результате проведенных исследований были выявлены нефрозащитные свойства соединения DF-5 при курсовом введении в дозе 12,5 мг/кг у животных со стрептозотоцин-индуцированным СД и диабетической нефропатией. Изучаемое вещество способствовало не только улучшению функциональных параметров, таких как протеинурия и суточный диурез, но и маркеров структурных нарушений, включающих гломерулосклероз и тубулоинтерстициальное

повреждение. Все это свидетельствует о целесообразности проведения дальнейших доклинических исследований данного разрывателя сшивок гликированных белков на других экспериментальных моделях с развитием сердечно-сосудистых и нейротропных осложнений, ассоциированных со старением, гипертензией или сахарным диабетом.

В настоящее время существует много перспективных направлений поиска новых антидиабетических средств. Исследования в указанных областях стремительно развиваются с получением новых данных о генетическом базисе и молекулярных механизмах патогенеза СД.

Инсулиновые рецепторы (ИР) – представители семейства тирозинкиназных рецепторов – интенсивно изучаются на протяжении последних десятилетий, особое внимание уделяется строению ИР и функционированию сопряженных с ним сигнальных путей. Интенсивно накапливаются данные о новых лигандах-миметиках и сенситайзерах ИР, а также других молекулах способных влиять на различные компоненты сопряженных с ИР сигнальных путей, тем самым проявляя конкретный антидиабетический эффект. Действие данных соединений направлено на коррекцию основных метаболических нарушений, приводящих к гипергликемии и условно сводится к следующим эффектам: активации и потенцированию инсулиновой сигнализации, улучшению чувствительности периферических тканей к инсулину; восстановлению физиологических механизмов секреции инсулина; снижению повышенной продукции глюкозы печенью.

Так, главную роль из всех протеинфосфатаз в процессе дефосфорилирования рецептора инсулина и, соответственно, в модуляции инсулиновой сигнализации играет РТР1В. Ингибирование РТР1В является перспективным направлением поиска новых лекарственных средств для терапии СД 2 типа [Johnson T. O., 2002]. При активации АМПК, которая относится к серин-треониновым киназам и является главным регулятором клеточного энергетического гомеостаза, также выявляются инсулин-сенситизирующие эффекты, что делает ее потенциальной мишенью для терапии СД 2 типа [Coughlan K.A., 2014].

Опираясь на результаты предыдущих исследований *in vitro* соединения АЗН-141, с учетом выявленных у него ингибирующей РТР1В активности и способности активировать АМПК, а также на полученное для него самое высокое значение антидиабетического функционала в исследовании *in vivo* мы оценили его антидиабетогенное действие при однократном введении интактным животным и при курсовом (21 день) введении животным со стрептозотоцин-индуцированным СД, находящимся на высокожировой диете.

Комбинация высокожировой диеты с индукцией СД с помощью введения низкой дозы стрептозотоцина приводит к развитию глюкозотолерантности за счет нарушения рецепторного уровня утилизации глюкозы. Развитие висцерального ожирения у лабораторных животных, содержащихся на высокожировой диете, приводит к увеличению объема адипоцитов и

уменьшению числа инсулиновых рецепторов на единицу площади поверхности клетки. Высвобождение большого количества свободных жирных кислот, преимущественно в портальный кровоток и печень, вследствие интенсивного липолиза в висцеральных адипоцитах приводит к снижению связывания инсулина гепатоцитами и его деградации. Эти процессы обуславливают развитие инсулинорезистентности в печени, снижение экстракции инсулина печенью и формирование системной гиперинсулинемии, которая, в свою очередь, способствует возникновению периферической инсулинорезистентности [Бутрова С. А., 2004].

У животных с моделями СД и ожирения использование ингибиторов РТР1В приводит к стимулированию глюкозо-индуцированной секреции инсулина, увеличению поглощения глюкозы тканями и их чувствительности к инсулину, а также уменьшению продукции глюкозы печенью и снижению накопления липидов в печени, индуцированного высокими концентрациями свободных жирных кислот и инсулина [Ma Y. M., 2011]. Благодаря активации АМПК стимулируется захват глюкозы клетками скелетных мышц, окисление жирных кислот в жировой ткани и уменьшается продукция глюкозы в печени [Coughlan K.A., 2014].

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

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

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

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

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

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

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

\*\*\*

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

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

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

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

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

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

(AZH-143) с выраженным активирующим АМПК действием, гидробромид 1-(2,2-диметиламиноэтил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин (AZH-141) с высокой РТР1В-ингибирующей активностью и умеренной способностью активировать АМПК и бромид 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия (AZH-137) с наибольшим уровнем ингибирования активности РТР1В.

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

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

Полученные результаты позволяют считать целесообразным проведение дальнейшего поиска высокоактивных соединений со следующими фармакологическими эффектами: антиагрегантным, регулирующим, антиоксидантным, РТР1В-ингибирующим и АМПК-активирующим среди ряда производных, содержащих комбинацию бифенильной и неконденсированной (конденсированной) бензимидазольной структур, а также рекомендовать для дальнейших расширенных доклинических исследований антидиабетогенного потенциала соединений под лабораторными шифрами AZH-141 и DF-5.

## ВЫВОДЫ

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

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

- в случае антиагрегантной активности от наличия N<sup>1</sup>-диметиламиноэтила либо N<sup>1</sup>-пирролидиноэтила в структуре 1-диалкиламиноалкил-3-бифенил-2-иминобензимидазолина или метильного радикала в составе C<sup>4</sup>/C<sup>5</sup>-заместителя и атома в C<sup>4</sup>-положении бифенила в C<sup>4</sup>,C<sup>5</sup>-дизамещенной-3-[2-(бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1,3-тиазольной основе;

- в случае РТР1В-ингибирующего эффекта от наличия N<sup>1</sup>-диметиламиноэтила в структуре 1-диалкиламиноалкил-3-бифенил-2-иминобензимидазолина, или N<sup>9</sup>-диметиламиноэтила либо N<sup>9</sup>-диэтиламиноэтила в N<sup>9</sup>-замещенной 2-дифенилимидазо[1,2-а]бензимидазольной структуре, или структуры 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия;

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

- в случае регликирующей активности от наличия N<sup>9</sup>-бензила либо N<sup>9</sup>-бутила в N<sup>9</sup>-замещенной 2-дифенилимидазо[1,2-а]бензимидазольной структуре;

- в случае антиоксидантной активности от наличия N<sup>9</sup>-диметиламиноэтила либо N<sup>9</sup>-метила в структуре N<sup>9</sup>-замещенной 2-дифенилимидазо[1,2-а]бензимидазольной основы.

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

4. Наиболее активным соединением среди изученных, проявившим свойства разрывателей поперечных сшивок гликированных белков, является 9-бензил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол – DF-5 – с уровнем  $IC_{50}$  превосходящим эффект вещества сравнения ALT-711. Наиболее выраженные антиоксидантные и антирадикальные свойства выявлены для вещества DF-1 (9-метил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол) и соединения DF-6 (9-диметиламиноэтил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол), влияющих преимущественно на активность радикалов люминола, супероксида и ABTS•.

Максимальная антиагрегантная активность показана у вещества AZH-141 (1-(2,2-диметиламиноэтил)-3-бифенил-4-ил-метил-1,3-дигидробензимидазол-2-илиден-амин гидробромида) с величиной  $EC_{50}$  достоверно превосходящей ацетилсалициловую кислоту. Наиболее активным соединением среди изученных, проявившим РТР1В-ингибирующий эффект, является AZH-137 – 1-метил 3-[2-(4-бромбифенил-4-ил)-2-оксоэтил]бензимидазолия бромид с уровнем  $EC_{50}$  соответствующим веществу сравнения NSC-87877. Уровни активирующего действия в отношении АМПК наиболее активных соединений AZH-143 (4'-(2,3-дигидро-9*H*-имидазо[1,2-*a*]бензимидазол-9-ил-метил)бифенил-2-карбонитрил) и DF-4 (9-бутил-2-бифенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазол) соответствуют веществу сравнения AICAR.

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

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

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

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

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



**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- 2-ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота
- 5-НТ – 5-гидрокситриптамин (серотонин)
- 5-НТ<sub>1A/2A/2C/3/4/7</sub> – 1A/2A/2C/3/4/7 типы серотонинового рецептора
- 17 $\beta$ -HSD2 – 17 $\beta$ -гидроксистероид-дегидрогеназа типа II
- АДФ – натриевая соль аденозин-5-дифосфорной кислоты
- АОА – антиоксидантная активность
- АРА – антирадикальная активность
- АТ – ангиотензин
- АТ<sub>1/2</sub> – 1/2 типы ангиотензинового рецептора
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- в/б – внутрибрюшинно
- в/в – внутривенно
- в/ж – внутрижелудочно
- ГАМК<sub>A</sub> – ионотропный рецептор гамма-аминомасляной кислоты типа A
- ГК – глюкокиназа
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДОБ – 2,5-диметокси-4-бromoамфетамин
- ДПП-4 – дипептидилпептидаза-4
- ДТТ – 1,4-дителиотрептоил
- ДФПГ – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил
- ЕД – единица действия
- ИР – инсулиновый рецептор
- КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза
- ОП – оптическая плотность
- ПГТТ – пероральный глюкозотолерантный тест
- ПО – программное обеспечение
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- РАС – ренин-ангиотензиновая система
- СД – сахарный диабет
- ТХУ – трихлоруксусная кислота
- Фен – фенилаланин
- ХЛ – хемилюминесценция
- ЦОГ – циклооксигеназа

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота  
 ABTS – 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота)  
 AGE – конечные продукты гликирования  
 AICAR – 5-аминоимидазол-4-карбоксиамида 1- $\beta$ -D-рибофуранозид  
 AMPK – АМФ-активируемая протеинкиназа  
 AZL – азилсартан  
 BINA – бифенилинданон А  
 EC<sub>50</sub> – полумаксимальная эффективная концентрация  
 ED<sub>50</sub> – полуэффективная доза  
 ELISA – твердофазный иммуноферментный анализ  
 ET-1 – эндотелин-1  
 ET<sub>A/B</sub> – А/В типы эндотелинового рецептора  
 FDA – Управление США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств (*Food and Drug Administration*)  
 GPCR – G-protein-coupled receptor; рецептор, сопряженный с G-белком  
 GPVI – гликопротеин VI  
 HbA<sub>1c</sub> – гликированный гемоглобин  
 HFD – high fat diet  
 IC<sub>50</sub> – концентрация полумаксимального ингибирования  
 IUPAC – Международный союз теоретической и прикладной химии  
 LD<sub>50</sub> – доза, вызывающая гибель 50% животных  
 LXRs – печеночные X рецепторы  
 mGluRs – метаботропные глутаматные рецепторы  
 MMP – матриксные металлопротеиназы  
 NF- $\kappa$ B – транскрипционный фактор «каппа-би»  
 NKCC2 – Na-K-Cl-котранспортер изоформы 2  
 PLC $\gamma$ 2 – фосфолипаза C $\gamma$ 2  
 pNPP – *n*-нитрофенилфосфат  
 PPAR $\gamma$  – Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  
 PTP1B – протеинтирозинфосфатаза 1B  
 RAGE – рецепторы конечных продуктов гликирования  
 SAR – соотношение структура-активность (*Structure-Activity Relationship*)  
 SCD1 – стеароил-КоА десатураза 1  
 SGLT2 – Na<sup>+</sup>/глюкозный котранспортер 2-го типа  
 STZ – стрептозотозин

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдюнина, Н. И. Синтез и превращения 3-карбонилзамещенных имидазо[1,2-*a*]бензимидазола [Текст]: автореф... канд. хим. наук. / Н. И. Авдюнина. – Ростов-на-Дону, 1979. – 20 с.
2. Анисимова, В. А. Синтез и фармакологическая активность 10-алкиламиноэтил-2,3,4,10-тетрагидропиримидо-[1,2-*a*]бензимидазолов [Текст] / В. А. Анисимова, И. Е. Толпыгин, А. А. Спасов [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 2012. – Т. 46, № 6. – С. 54–59.
3. Анисимова, В. А. Синтез и фармакологическая активность 9-*R*-2-галогенфенилимидазо[1,2-*a*]бензимидазолов [Текст] / В. А. Анисимова, А. А. Спасов, И. Е. Толпыгин [и др.] // Хим.-фарм. журн. – 2010. – Т. 44, № 7. – С. 7–13.
4. Арзамасцев, Е.В. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств [Текст] / Е.В. Арзамасцев, И.В. Березовская [и др.] // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. – Ч.1. - М.: Гриф и К, 2012. – С. 13–24.
5. Бова, А. А. Место антагонистов рецепторов ангиотензина II в клинической практике [Текст] / А. А. Бова // Медицинские новости. – 2009. – № 6. – С. 11–15.
6. Бутрова, С. А. Висцеральное ожирение – ключевое звено метаболического синдрома [Текст] / С. А. Бутрова, Ф. Х. Дзгоева // Ожирение и метаболизм. – 2004. – № 1. – С. 10–16.
7. Габбасов, З. А. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов [Текст] / З.А. Габбасов, Б.Г. Попов, И.Ю. Гаврилов [и др.] // Лаб. дело. – 1989. – № 10. – С. 15–18.
8. Глотов, Н. В. Биометрия: Учеб. пособие [Текст] / Н. В. Глотов, Л. А. Животовский, Н. В. Хованов, Н. Н. Хромов-Борисов // Под ред. М. М. Тихомировой. - Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 264 с.
9. Голендер, В. Е. Вычислительные методы конструирования лекарств [Текст] / В. Е. Голендер, А. Б. Розенблит. – Рига: Зинатне, 1978. – 238 с.
10. Голиков, А. П. Свободнорадикальное окисление и сердечно-сосудистая патология [Текст] / А. П. Голиков, С. А. Бойцов, В. П. Михин, В. Ю. Полумисков // Лечащий врач. – 2003. – № 4. – С. 70–73.
11. ГОСТ 12.1.007-76. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности [Текст]. – Введ. 1977-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 2007.
12. ГОСТ Р 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики [Текст] – Введ. 2015-01-08 – М.: Стандартиформ, 2015.

13. ГОСТ Р 50258-92. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия [Текст]. – Введ. 1994-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 1992.
14. Грандберг, И. И. Органическая химия [Текст] / И. И. Грандберг. – М.: Химия, 1980. – 232 с.
15. Захарова, Н. В. Клиническая фармакология сартанов: класс-эффект и фармакодинамические особенности препаратов [Текст] / Н. В. Захарова, С. Р. Кузьмина-Крутецкая // Системные гипертензии. – 2011. – Т. 8, № 3. – С. 10–16.
16. Зефирова, О. Н. Об истории возникновения и развития концепции биоизостеризма [Текст] / О. Н. Зефирова, Н. С. Зефирова // Вестник Московского Университета. СЕР. 2. ХИМИЯ. – 2002. – Т. 43, № 4. – С. 251–256.
17. Зиновьев, А. Ю. Визуализация многомерных данных [Текст] / А. Ю. Зиновьев. – Красноярск: Изд-во КГТУ, 2000. – 320 с.
18. Колчанов, Н. А. Системная компьютерная биология [Текст] / отв. ред. Н. А. Колчанов, С. С. Гончаров, В. А. Лихошвай, В. А. Иванисенко; Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Ин-т цитологии и генетики [и др.]. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2008. – 769 с.
19. Кузнецова, В. А. Метод оценки антигликирующей активности *in vitro* новых веществ [Текст] / В. А. Кузнецова, О. А. Соловьева, А. И. Мацевич, А. А. Спасов // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2014. – № 3. – С. 50–51.
20. Ланкин, В. З. Изучение аскорбат-зависимого перекисного окисления липидов тканей при помощи теста с 2-тиобарбитуровой кислотой [Текст] / В. З. Ланкин, С. М. Гуревич, Е. Б. Бурлакова // Труды московского общества испытателей природы. – 1975. – Т. 52. – С. 73–78.
21. Ли, С. Новые соли замещенного 5-членного азацикла и их применение в лечении заболеваний, связанных со старением белков [Текст]: пат. RU 2444517 С2, МПК А61К / С. Ли, Х. Цуй, Ц. Сяо, В. Чжун, Л. Ван, Г. Чэн (Китай); заявители и патентообладатели Бейджинг Моликьюл Сайенс энд Текнолоджи Ко., ЛТД (СН) – № 2008134899/04; заявл. 29.01.2007; опубл. 10.03.2012, Бюл. № 7.
22. Миронов, А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая [Текст] / А. Н. Миронов. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
23. Пожарский, А. Ф. Теоретические основы химии гетероциклов [Текст] / А. Ф. Пожарский. – М.: Химия, 1985. – 278 с.
24. Поздняков, О. М. Коррекция синтетическими антиоксидантами нарушений в регуляторной и микроциркуляторной системах на ранних стадиях экспериментального атеросклероза [Текст] / О. М. Поздняков, Е. Д. Клименко, Л. П. Кобозева [и др.] // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1993. – № 3. – С. 242–244.

25. Прайор, У. Свободные радикалы [Текст] / У. Прайор. – М.: Атомиздат, 1970. – 156 с.
26. Сергиенко, В. И. Методические рекомендации по статистической обработке результатов доклинических исследований лекарственных средств [Текст] / В. И. Сергиенко, И. Б. Бондарева, Е. И. Маевский // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А. Н. Миронов. – Ч.1. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 889–940.
27. Спасов, А. А. 5-НТ<sub>3</sub>-рецепторы – мишень для воздействия биологически активных соединений (обзор) [Текст] / А. А. Спасов, Д. С. Яковлев // Хим.-фарм. журн. – 2013б. – Т. 47, № 8. – С. 3–8.
28. Спасов, А. А. Метод изучения ангиотензиновой активности химических соединений *in vitro* [Текст] / А. А. Спасов, Д. С. Яковлев, Т. М. Букатина, А. А. Бригадирова // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2014. – Т. 158, № 7. – С. 128–130.
29. Спасов, А. А. Механизмы подавления ангиотензин II-индуцированного сосудистого спазма изолированной портальной вены крыс *in vitro* [Текст] / А. А. Спасов, Д. С. Яковлев, А. А. Бригадирова // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. – 2016в. – Т. 102, № 2. – С. 167–175.
30. Спасов, А. А. Оптимизация методики для изучения регликирующей активности химических соединений *in vitro* [Текст] / А. А. Спасов, А. И. Ращенко, А. А. Бригадирова // Вестник ВолгГМУ. – 2016г. – Т. 57, № 1. – С. 30–32.
31. Спасов, А. А. Терапевтический потенциал разрывателей поперечных сшивок гликированных белков [Текст] / А. А. Спасов, А. И. Ращенко // Вестник ВолгГМУ. – 2016д. – Т. 57, № 1. – С. 12–15.
32. Спасов, А. А. Фундаментальные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа [Текст] / А. А. Спасов, В. И. Петров, Н. И. Чепляева, К. В. Ленская // Вестник РАМН. – 2013а. – Т. 68, № 2. – С. 43–49.
33. Теселкин, Ю. О. Ингибирование сывороточными антиоксидантами окисления люминола в присутствии гемоглобина и пероксида водорода [Текст] / Ю. О. Теселкин, И. В. Бабенкова, О. Б. Любицкий [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 1997. – Т. 43, № 2. – С. 87–93.
34. Тюренков, И. Н. Десять новых мишеней для разработки лекарственных средств для лечения СД2 и метаболического синдрома [Текст] / И. Н. Тюренков, Д. В. Куркин, Е. В. Волотова [и др.] // Сахарный диабет. – 2015. – Т. 18, № 1. – С. 101–109.
35. Фомин, В. В. От саралазина к сартанам: история фармакологической блокады ангиотензиновых рецепторов [Текст] / В. В. Фомин, М. М. Курашов // Клиническая нефрология. – 2009. – № 4. – С. 63–70.
36. Шилов, А. М. Селективные ингибиторы рецепторов ангиотензина II (Валсартан) в

- практике лечения ССЗ [Текст] / А. М. Шилов, И. В. Еремина // Трудный пациент. – 2011. – Т. 9, № 7. – С. 26–32.
37. Agapitov, A. Role of endothelin in cardiovascular disease [Text] / A. Agapitov, W. G. Haynes // JRAAS. – 2002. – Vol. 3, № 1. – P. 1–15.
38. Agelis, G. Facile and efficient syntheses of a series of *N*-benzyl and *N*-biphenylmethyl substituted imidazole derivatives based on (*E*)-urocanic acid, as angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor blockers [Text] / G. Agelis, K. Kelaidonis, A. Resvani [et al.] // Molecules. – 2013. – Vol. 18, № 7. – P. 7510–7532.
39. Akkerhuis, K. M. Pharmacodynamics and safety of lefradafiban, an oral platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist, in patients with stable coronary artery disease undergoing elective angioplasty [Text] / K. M. Akkerhuis, M. J. van Den Brand, C. van Der Zwaan [et al.] // Heart. – 2001. – Vol. 85, № 4. – P. 444–450.
40. Alam, M. N. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity [Text] / M. N. Alam, N. J. Bristi, M. Rafiquzzaman // Saudi Pharm. J. – 2013. – Vol. 21, № 2. – P. 143–152.
41. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2014 [Text] // Diabetes Care. – 2014. – Vol. 37, Suppl. 1. – P. S14–S80.
42. Atlas, S. A. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition [Text] / S. A. Atlas // J. Manag. Care. Pharm. – 2007. – Vol. 13, № 8, Suppl. B. – P. 9–20.
43. Attal, V. Synthesis and anti-inflammatory activity of aryl sulphonanilides structurally related to nimesulide [Text] / V. Attal, D. P. Belsare // Indian J. Pharm. Sci. – 2003. – Vol. 65, № 2. – P. 135–138.
44. Aulakh, G. K. An update on non-peptide angiotensin receptor antagonists and related RAAS modulators [Text] / G. K. Aulakh, R. K. Sodhi, M. Singh // Life. Sci. – 2007. – Vol. 81, № 8. – P. 615–639.
45. Balakumar, P. Azilsartan: a novel angiotensin-II type 1 receptor blocker for treating hypertension [Text] / P. Balakumar, N. Mahadevan // Int. J. Rec. Adv. Pharm. Res. – 2011. – Vol. 2. – P. 11–13.
46. Bansal, Y. The therapeutic journey of benzimidazoles: a review [Text] / Y. Bansal, O. Silakari // Bioorg. Med. Chem. – 2012. – Vol. 20, № 21. – P. 6208–6236.
47. Bardin, L. Pharmacological profiles in rats of novel antipsychotics with combined dopamine D<sub>2</sub>/serotonin 5-HT<sub>1A</sub> activity: comparison with typical and atypical conventional antipsychotics [Text] / L. Bardin, A. Auclair, M. S. Kleven [et al.] // Behavioral Pharmacology. – 2007. – Vol. 18, № 2. – P. 103–118.

48. Barelier, S. Ligand specificity, privileged substructures and protein druggability from fragment-based screening [Text] / S. Barelier, I. Krimm // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2011. – Vol. 15, № 4. – P. 469–474.
49. Baskin, I. I. A neural device for searching direct correlations between structures and properties of chemical compounds [Text] / I. I. Baskin, V. A. Palyulin, N. S. Zefirov // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 1997. – Vol. 37, № 4. – P. 715–721.
50. Beghetti, M. Endothelin-1 in congenital heart disease [Text] / M. Beghetti, S. M. Black, J. R. Fineman // *Pediatric Research*. – 2005. – Vol. 57, № 5, Pt 2. – P. 16R–20R.
51. Bemis, G. W. The properties of known drugs. 1. Molecular frameworks [Text] / G. W. Bemis, M. A. Murcko // *J. Med. Chem.* – 1996. – Vol. 39, № 15. – P. 2887–2893.
52. Bemis, G. W. The properties of known drugs. 2. Side chains [Text] / G. W. Bemis, M. A. Murcko // *J. Med. Chem.* – 1999. – Vol. 42, № 25. – P. 5095–5099.
53. Benneyworth, M. A. A selective positive allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor subtype 2 blocks a hallucinogenic drug model of psychosis [Text] / M. A. Benneyworth, Z. Xiang, R. L. Smith [et al.] // *Molecular Pharmacology*. – 2007. – Vol. 72, № 2. – P. 477–484.
54. Benson, S. C. Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR $\gamma$ -modulating activity [Text] / S. C. Benson, H. A. Pershadsingh, C. I. Ho [et al.] // *Hypertension*. – 2004 – Vol. 43, № 5. – P. 993–1002.
55. Bohm, F. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease [Text] / F. Bohm, J. Pernow // *Cardiovasc. Res.* – 2007. – Vol. 76, № 1. – P. 8–18.
56. Bondensgaard, K. Recognition of privileged structures by G-protein coupled receptors [Text] / K. Bondensgaard, M. Ankersen, H. Thøgersen [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 47, № 4. – P. 888–899.
57. Bordi, F. Dibasic biphenyl H<sub>3</sub> receptor antagonists: steric tolerance for a lipophilic side chain [Text] / F. Bordi, S. Rivara, E. Dallaturca [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 48. – P. 214–230.
58. Born, G. V. R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal [Text] / G.V.R. Born // *Nature*. – 1962. – Vol. 194. – P. 927–929.
59. Brogden, R. N. Flurbiprofen: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases [Text] / R. N. Brogden, R. C. Heel, T. M. Speight, G. S. Avery // *Drugs*. – 1979. – Vol. 18, № 6. – P. 417–438.
60. Brownlee, M. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications [Text] / M. Brownlee, A. Cerami, H. Vlassara // *N. Engl. J. Med.* – 1988. – Vol. 318, № 20. – P. 1315–1321.
61. Brudeli, B. Acidic biphenyl derivatives: synthesis and biological activity of a new series of potent

- 5-HT<sub>4</sub> receptor antagonists [Text] / B. Brudeli, K. W. Andressen, L. R. Moltzau [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 21, № 22. – P. 7134–7145.
62. Brüning, C. A. Protective effect of diphenyl diselenide on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury: involvement of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines [Text] / C. A. Brüning, M. Prigol, C. Luchese [et al.] // *Neurochem. Res.* – 2012. – Vol. 37, № 10. – P. 2249–2258.
63. Buckle, D. R. Glossary of terms used in medicinal chemistry. Part II (IUPAC Recommendations 2013) [Text] / D. R. Buckle, P. W. Erhardt, C. R. Ganellin [et al.] // *Pure Appl. Chem.* – 2013. – Vol. 85, № 8. – P. 1725–1758.
64. Bywater, R. P. Privileged Structures in GPCRs [Text] / R.P. Bywater // *Ernst Schering Found Symp Proc.* – 2006. – № 2. – P. 75–91.
65. Canale, V. N-Alkylated arylsulfonamides of (aryloxy)ethyl piperidines: 5-HT<sub>7</sub> receptor selectivity versus multireceptor profile [Text] / V. Canale, R. Kurczab, A. Partyka [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 24, № 2. – P. 130–139.
66. Challa, N. R. Synthesis and pharmacological evaluation of 5-[2'-(1H-tetrazol-5-yl)-biphenyl-4-ylmethyl]-4,5,6,7-tetrahydro-thieno[3,2-c]pyridine derivatives as platelet aggregation inhibitors [Text] / N. R. Challa, B. Mamidisetty, M. R. Ghanta, P. R. Padi // *Journal of Saudi Chemical Society.* – 2014. – Vol. 18, № 5. – P. 513–519.
67. Chattopadhyay, A. Bifeprunox versus placebo for schizophrenia [Text] / A. Chattopadhyay, S. Frey, G. Green // *Cochrane Database of Systematic Reviews.* – 2016. – № 10. – Art. No.: CD012029.
68. Chen, S. Drug target identification using network analysis: Taking active components in Sini decoction as an example [Text] / S. Chen, H. Jiang, Y. Cao [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – Art. No.: 24245.
69. Cheng, G. Beneficial effects of C36, a novel breaker of advanced glycation endproducts cross-links, on the cardiovascular system of diabetic rats [Text] / G. Cheng, L.-L. Wang, L. Long [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 152, № 8. – P. 1196–1206.
70. Cheng, G. C16, a novel advanced glycation endproduct breaker, restores cardiovascular dysfunction in experimental diabetic rats [Text] / G. Cheng, L.-L. Wang, W.-S. Qu [et al.] // *Acta Pharmacologica Sinica.* – 2005. – Vol. 26, № 12. – P. 1460–1466.
71. Chester, A. H. The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension [Text] / A. H. Chester, M. H. Yacoub // *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* – 2014. – Vol. 29, № 2. – P. 62–78.
72. Chi, Y. H. Pharmacological characterization of BR-A-657, a highly potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonist [Text] / Y. H. Chi, H. J. Lee, J. H. Kim [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 2013. – Vol. 36, № 7. – P. 1208–1215.



73. Choi, M. S. Inhibitory effect of obovatol on nitric oxide production and activation of NF- $\kappa$ B/MAP kinases in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells [Text] / M. S. Choi, S. H. Lee, H. S. Cho [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 556, № 1–3. – P. 181–189.
74. Chollet, A.-M. Solid-phase synthesis of  $\alpha$ -substituted 3-bisarylthio N-hydroxy propionamides as specific MMP Inhibitors [Text] / A.-M. Chollet, T. Le Diguarher, N. Kucharczyk [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2002. – Vol. 10, № 3. – P. 531–544.
75. Chopra, H. K. Textbook of cardiology (a clinical and historical perspective) [Text] / H. K. Chopra, N. C. Nanda. – JP Medical Ltd, New Delhi, 2013. – P. 65.
76. Cool, B. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome [Text] / B. Cool, B. Zinker, W. Chiou [et al.] // *Cell Metab.* – 2006. – Vol. 3, № 6. – P. 403–416.
77. Corton, J. M. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? [Text] / J. M. Corton, J. G. Gillespie, S. A. Hawley, D. G. Hardie // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – Vol. 229, № 2. – P. 558–565.
78. Costantino, L. Privileged structures as leads in medicinal chemistry [Text] / L. Costantino, D. Barlocco // *Curr. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 13, № 1. – P. 65–85.
79. Coughlan, K. A. AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? [Text] / K. A. Coughlan, R. J. Valentine, N. B. Ruderman, A. K. Saha // *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* – 2014. – Vol. 7. – P. 241–253.
80. Dasgupta, C. Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease [Text] / C. Dasgupta, L. Zhang // *Drug. Discov. Today.* – 2011. – Vol. 16, № 1–2. – P. 22–34.
81. De Caterina, A. R. Critical evaluation of the efficacy and tolerability of azilsartan [Text] / A. R. De Caterina, A. R. Harper, F. Cuculi // *Vasc. Health. Risk. Manag.* – 2012. – Vol. 8. – P. 299–305.
82. De Ceuninck, F. Small molecule glucokinase activators disturb lipid homeostasis and induce fatty liver in rodents: a warning for therapeutic applications in humans [Text] / F. De Ceuninck, C. Kargar, C. Ilic [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 168, № 2. – P. 339–353.
83. De Gasparo, M. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors [Text] / M. De Gasparo, K. J. Catt, T. Inagami [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2000. – Vol. 52, № 3. – P. 415–472.
84. Deep, A. Synthesis and anti-inflammatory activity of some novel biphenyl-4-carboxylic acid 5-(arylidene)-2-(aryl)-4-oxothiazolidin-3-yl amides [Text] / A. Deep, S. Jain, P. C. Sharma // *Acta. Pol. Pharm.* – 2010. – Vol. 67, № 1. – P. 63–67.
85. DeSimone, R. W. Privileged structures: applications in drug discovery [Text] / R. W. DeSimone, K. S. Currie, S. A. Mitchell [et al.] // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* – 2004. – Vol. 7,

- № 5. – P. 473–494.
86. Dihn, D. T. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function [Text] / D. T. Dihn, A. G. Frauman, C. I. Jonston, M. E. Fabiani // *Clin. Sci.* – 2001. – Vol. 100, № 5. – P. 481–492.
87. Ding, Y. C-Aryl glucoside SGLT2 inhibitors containing a biphenyl motif as potential anti-diabetic agents [Text] / Y. Ding, L. Mao, D. Xu [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2015. – Vol. 25, № 14. – P. 2744–2748.
88. Donath, M. Y. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start [Text] / M. Y. Donath // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2014. – Vol. 13, № 6. – P. 465–476.
89. Duarte, C. D. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates [Text] / C. D. Duarte, E. J. Barreiro, C. A. Fraga // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 7, № 11. – P. 1108–1119.
90. Evans, B. E. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists [Text] / B. E. Evans, K. E. Rittle, M. G. Bock [et al.] // *J. Med. Chem.* – 1988. – Vol. 31, № 12. – P. 2235–2246.
91. Ferrario, C. M. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research [Text] / C. M. Ferrario // *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst.* – 2006. – Vol. 7, № 1. – P. 3–14.
92. Finney, D. J. Probit analysis [Text] / D. J. Finney. – Cambridge: Cambridge University Press, 1971. – 338 p.
93. Forbes, J. M. The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes [Text] / J. M. Forbes, V. Thallas, M. C. Thomas [et al.] // *FASEB J.* – 2003. – Vol. 17, № 12. – P. 1762–1764.
94. Galici, R. Biphenyl-indanone A, a positive allosteric modulator of the metabotropic glutamate receptor subtype 2, has antipsychotic- and anxiolytic-like effects in mice [Text] / R. Galici, C. K. Jones, K. Hemstapat [et al.] // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 2006. – Vol. 318, № 1. – P. 173–185.
95. Gargano, E. M. Addressing cytotoxicity of 1,4-biphenyl amide derivatives: discovery of new potent and selective 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 inhibitors [Text] / E. M. Gargano, E. Perspicace, A. Carotti [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2016. – Vol. 26, № 1. – P. 21–24.
96. Georgetti, S. R. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method [Text] / S. R. Georgetti, R. Casagrande, V. M. Di Mambro [et al.] // *AAPS PharmSci.* – 2003. – Vol. 5, № 2. – P. 111–115.
97. Giordanetto, F. Direct AMP-activated protein kinase activators: a review of evidence from the patent literature [Text] / F. Giordanetto, D. Karis // *Expert. Opin. Ther. Pat.* – 2012. – Vol. 22, № 12. – P. 1467–1477.

98. Glavind, J. Antioxidants in animal tissue [Text] / J. Glavind // *Acta chemica scand.* – 1963. – Vol. 17, № 6. – P. 1635–1640.
99. Goebel, M. Characterization of new PPAR $\gamma$  agonists: benzimidazole derivatives – the importance of position 2 [Text] / M. Goebel, B. Staels, T. Unger [et al.] // *ChemMedChem*, – 2009. – Vol. 4, № 7 – P. 1136–1142.
100. Goyal, S. N. Telmisartan, a dual ARB/partial PPAR- $\gamma$  agonist, protects myocardium from ischaemic reperfusion injury in experimental diabetes [Text] / S. N. Goyal, S. Bharti, J. Bhatia [et al.] // *Diabetes Obes. Metab.* – 2011. – Vol. 13, № 6. – P. 533–541.
101. Grange, R. L. Selenosartans: novel selenophene analogues of milfasartan and eprosartan [Text] / R. L. Grange, J. Ziogas, A. J. North [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2008. – Vol. 18, № 3. – P. 1241–1244.
102. Greenwood, P. E. A guide to chi-squared testing [Text] / P. E. Greenwood, M. S. Nikulin. – New York: Wiley, 1996. – 280 p.
103. Griebel, G. The mGluR2 positive allosteric modulator, SAR218645, improves memory and attention deficits in translational models of cognitive symptoms associated with schizophrenia [Text] / G. Griebel, P. Pichat, D. Boulay [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – Art. No.: 35320.
104. Gross, J. L. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment [Text] / J. L. Gross, M. J. De Azevedo, S. P. Silveiro [et al.] // *Diabetes Care*. – 2005. – Vol. 28, № 1. – P. 164–176.
105. Guha, R. Exploring structure–activity data using the landscape paradigm [Text] / R. Guha // *WIREs Comput. Mol. Sci.* – 2012. – Vol. 2, № 6. – P. 829–841.
106. Guidi, I. Oxidative imbalance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease [Text] / I. Guidi, D. Galimberti, S. Lonati [et al.] // *Neurobiol. Aging*. – 2006. – Vol. 27, № 2. – P. 262–269.
107. Hakim, A. Functional comparison of the antagonistic properties of some angiotensin II type 1 receptor blockers on the contraction elicited by angiotensin II and thromboxane A2 on human saphenous veins [Text] / A. Hakim, F. Stanke-Labesque, P. Hoffmann [et al.] // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2003 – Vol. 42, № 1. – P. 42–47.
108. Halstenson, C. E. Bumetanide: a new loop diuretic (Bumex, Roche Laboratories) [Text] / C. E. Halstenson, G. R. Matzke // *Drug Intell. Clin. Pharm.* – 1983. – Vol. 17, № 11. – P. 786–797.
109. Hess, H. H. Assay of inorganic and organic phosphorus in the 0.1–5 nanomole range [Text] / H. H. Hess, J. E. Derr // *Analytical biochemistry*. – 1975. – Vol. 63, № 2. – P. 607–613.
110. Holland, G. F. Hypoglycemic activity in a series of 1-aryl-3-arylsulphonylureas [Text] /

- G. F. Holland, D. A. Jaeger, R. L. Wagner [et al.] // *J. Med. Pharm. Chem.* – 1961. – Vol. 3, № 1. – P. 99–110.
111. Horton, D. A. The combinatorial synthesis of bicyclic privileged structures or privileged substructures [Text] / D. A. Horton, G. T. Bourne, M. L. Smythe // *Chem. Rev.* – 2003. – Vol. 103, № 3. – P. 893–930.
112. Hsiao, K. AMPK (A1/B1/G1) Kinase Assay [Электронный ресурс] / K. Hsiao, H. Zegzouti, J. Vidugiriene, S.A. Goueli // Promega Corp., 2015. – Режим доступа: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/kinase-enzyme-appnotes/ampk-a2b1g1-kinase-assay.pdf?la=en>.
113. Hunyady, L. Pleiotropic AT<sub>1</sub> receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II [Text] / L. Hunyady, K. J. Catt // *Molecular Endocrinology.* – 2006. – Vol. 20, № 5. – P. 953–970.
114. Jain, A. Structural insight for benzimidazole as angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor antagonist by using molecular property and biological activity correlation: QSAR approach [Text] / A. Jain, S. C. Chaturverdi, R. Sharma // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2011. – Vol. 3, Suppl. 5. – P. 541–546.
115. Jain, S. Type 2 diabetes mellitus – Its global prevalence and therapeutic strategies [Text] / S. Jain, S. Saraf // *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews.* – 2010. – Vol. 4, № 1. – P. 48–56.
116. Jain, Z. J. Biphenyls and their derivatives as synthetically and pharmacologically important aromatic structural moieties [Text] / Z. J. Jain, P. S. Gide, R. S. Kankate // *Arab. J. Chem.* – 2017. – Vol. 10, Suppl. 2. – P. S2051–S2066.
117. Jedsadayamata, A. In vitro antiglycation activity of Arbutin [Text] / A. Jedsadayamata // *Naresuan University Journal.* – 2005. – Vol. 13, № 2. – P. 35–41.
118. Ježko, P. The pharmacophore model development of AT<sub>1</sub> angiotensin II receptor antagonists in program phase [Text] / P. Ježko, M. Remko // *Abstrs. of 2nd Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network, Slovenia.* – 2012. – Abstr. O-6. – P. 28.
119. Johnson, T. O. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes [Text] / T. O. Johnson, J. Ermolieff, M. R. Jirousek // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2002. – Vol. 1, № 9. – P. 696–709.
120. Kamal, A. Recent advances in the solid-phase combinatorial synthetic strategies for the benzodiazepine based privileged structures [Text] / A. Kamal, K. L. Reddy, V. Devaiah [et al.] // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2006a. – Vol. 6, № 1. – P. 53–69.
121. Kamal, A. Recent Advances in the Solid-Phase Combinatorial Synthetic Strategies for the Quinoxaline, Quinazoline and Benzimidazole Based Privileged Structures [Text] / A. Kamal, K. L. Reddy, V. Devaiah [et al.] // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2006b. – Vol. 6, № 1. – P. 71–89.

122. Katsila, T. Computational approaches in target identification and drug discovery [Text] / T. Katsila, G. A. Spyroulias, G. P. Patrinos, M-T. Matsoukas // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* – 2016. – Vol. 14. – P. 177–184.
123. Keri, R. S. Comprehensive Review in Current Developments of Benzimidazole – Based Medicinal Chemistry [Text] / R. S. Keri, A. Hiremathad, S. Budagumpi, B. M. Nagaraja // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2015. – Vol. 86, № 1. – P. 19–65.
124. Kim, J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities [Text] / J. Kim, G. Yang, Y. Kim [et al.] // *Experimental & Molecular Medicine.* – 2016. – Vol. 48, № 4. – Art. No.: e224.
125. Kim, J. Epicatechin breaks preformed glycated serum albumin and reverses the retinal accumulation of advanced glycation end products [Text] / J. Kim, C. S. Kim, M. K. Moon, J. S. Kim // *Eur. J. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 748. – P. 108–114.
126. Kim, J. Privileged structures: efficient chemical "navigators" toward unexplored biologically relevant chemical spaces [Text] / J. Kim, H. Kim, S. B. Park // *J. Am. Chem. Soc.* – 2014. – Vol. 136, № 42. – P. 14629–14638.
127. Kim, R. M. Discovery of potent, orally active benzimidazole glucagon receptor antagonists [Text] / R. M. Kim, J. Chang, A. R. Lins [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2008. – Vol. 18, № 13. – P. 3701–3705.
128. Kim, Y. Discovery of aryl-biphenyl-2-ylmethylpiperazines as novel scaffolds for 5-HT<sub>7</sub> ligands and role of the aromatic substituents in binding to the target receptor [Text] / Y. Kim, J. Kim, J. Tae [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 21, № 9. – P. 2568–2576.
129. Kim, Y. Novel N-biphenyl-2-ylmethyl 2-methoxyphenylpiperazinylalkanamides as 5-HT<sub>7</sub>R antagonists for the treatment of depression [Text] / Y. Kim, J. Tae, K. Lee [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 22, № 17. – P. 4587–4596.
130. Klekota, J. Chemical substructures that enrich for biological activity [Text] / J. Klekota, F. P. Roth // *Bioinformatics.* – 2008. – Vol. 24, № 21. – P. 2518–2525.
131. Kobayashi, H. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay [Text] / H. Kobayashi, E. Gil-Guzman, A. M. Mahran [et al.] // *J Androl.* – 2001. – Vol. 22, № 4. – P. 568–574.
132. Kubo, K. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. Synthesis and biological activity of potential prodrugs of benzimidazole-7-carboxylic acids [Text] / K. Kubo, Y. Kohara, Y. Yoshimura [et al.] // *J. Med. Chem.* – 1993. – Vol. 36, № 16. – P. 2343–2349.
133. Kurtz, T. W. Differential pharmacology and benefit/risk of azilsartan compared to other sartans [Text] / T. W. Kurtz, T. Kajiya // *Vasc. Health. Risk. Manag.* – 2012. – Vol. 8. – P. 133–143.

134. La Regina, G. Discovery of 1,1'-biphenyl-4-sulfonamides as a new class of potent and selective carbonic anhydrase XIV inhibitors [Text] / G. La Regina, A. Coluccia, V. Famiglini [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 58, № 21. – P. 8564–8572.
135. Lanz, T. V. Angiotensin II sustains brain inflammation in mice via TGF- $\beta$  [Text] / T. V. Lanz, Z. Ding, P. P. Ho [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2010. – Vol. 120, № 8. – P. 2782–2794.
136. Larsen, J. S. Benzimidazole derivatives and their use for modulating the GABAA receptor complex [Text] / J. S. Larsen, L. Teuber, P. K. Ahring [et al.] // Patent: US20110118259, 2011.
137. Lee, T. Y. Honokiol as a specific collagen receptor glycoprotein VI antagonist on human platelets: functional ex vivo and in vivo studies [Text] / T. Y. Lee, C. C. Chang, W.-J. Lu [et al.] // *Scientific Reports.* – 2017. – Vol. 7. – Art. No.: 40002.
138. Li, P. Novel angiotensin II AT (1) receptor antagonist irbesartan prevents thromboxane A(2)-induced vasoconstriction in canine coronary arteries and human platelet aggregation [Text] / P. Li, M. Fukuhara, D. I. Diz [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2000. – Vol. 292, № 1. – P. 238–246.
139. Liu, B. Technological advances in high-throughput screening [Text] / B. Liu, S. Li, J. Hu // *Am. J. Pharmacogenomics.* – 2004. – Vol. 4, № 4. – P. 263–276.
140. Liu, J. Design, synthesis, and biological evaluation of 1,2,4-triazole bearing 5-substituted biphenyl-2-sulfonamide derivatives as potential antihypertensive candidates [Text] / J. Liu, Q. Liu, X. Yang [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 21, № 24. – P. 7742–7751.
141. Lu, M. Characterization of a novel glucokinase activator in rat and mouse models [Text] / M. Lu, P. Li, G. Bandyopadhyay [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 2. – Art. No.: e88431.
142. Lubben, T. In vitro enzymatic assays of protein tyrosine phosphatase 1B [Text] / T. Lubben, J. Clampit, M. Stashko [et al.] // *Curr. Protoc. Pharmacol.* – 2001. – Chapter 3, Unit 3.8. – P. 3.8.1–3.8.18.
143. Lykke, K. Structure–activity relationships of bumetanide derivatives: correlation between diuretic activity in dogs and inhibition of the human NKCC2A transporter [Text] / K. Lykke, K. Töllner, K. Römermann [et al.] // *Br. J. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 172, № 18. – P. 4469–4480.
144. Ma, Y. M. PTP1B inhibitor improves both insulin resistance and lipid abnormalities in vivo and in vitro [Text] / Y. M. Ma, R. Y. Tao, Q. Liu [et al.] // *Mol. Cell. Biochem.* – 2011. – Vol. 357, № 1–2. – P. 65–72.
145. Maddila, S. Synthesis and biological studies of novel biphenyl-3,5-dihydro-2H-thiazolo-pyrimidines derivatives [Text] / S. Maddila, G. L. V. Damu, E. O. Oseghe [et al.] // *J. Korean Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 56, № 3. – P. 334–340.
146. Malamas, M. S. Novel benzofuran and benzothiophene biphenyls as inhibitors of protein

- tyrosine phosphatase 1B with antihyperglycemic properties [Text] / M. S. Malamas, J. Sredy, C. Moxham [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2000. – Vol. 43, № 7. – P. 1293–1310.
147. Mareddy, J. Synthesis and biological evaluation of nimesulide based new class of triazole derivatives as potential PDE4B inhibitors against cancer cells [Text] / J. Mareddy, S. B. Nallapati, J. Anireddy [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – Vol. 23, № 24. – P. 6721–6727.
148. Matheussen, V. Method comparison of dipeptidyl peptidase IV activity assays and their application in biological samples containing reversible inhibitors [Text] / V. Matheussen, A.-M. Lambeir, W. Jungraithmayr [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2012. – Vol. 413, № 3–4. – P. 456–462.
149. Matter, H. Benzimidazole-carboxamides as potent and bioavailable stearyl-CoA desaturase (SCD1) inhibitors from ligand-based virtual screening and chemical optimization [Text] / H. Matter, G. Zoller, A. W. Herling [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2013. – Vol. 23, № 6. – P. 1817–1822.
150. Mavromoustakos, T. AT<sub>1</sub> antagonists: a patent review (2008–2012) [Text] / T. Mavromoustakos, G. Agelis, S. Durdagi // *Expert Opin. Ther. Pat.* – 2013. – Vol. 23, № 11. – P. 1483–1494.
151. McDonald, J. H. Handbook of biological statistics, 3<sup>rd</sup> ed. [Text] / J. H. McDonald. – Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland, 2014. – 299 p.
152. Meanwell, N. A. Synopsis of some recent tactical application of bioisosteres in drug design [Text] / N. A. Meanwell // *J. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 54, № 8. – P. 2529–2591.
153. Medina-Franco, J. L. Towards the Bioassay Activity Landscape Modeling in Compound Databases [Text] / J. L. Medina-Franco, J. Waddell // *J. Mex. Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 56, № 2. – P. 163–168.
154. Mehta, P. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system [Text] / P. K. Mehta, K. K. Griendling // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2007. – Vol. 292, № 1. – P. C82–C97.
155. Menezes, C. Effects of diphenyl diselenide on growth, oxidative damage, and antioxidant response in silver catfish [Text] / C. Menezes, A. Marins, C. Murussi [et al.] // *Sci. Total Environ.* – 2016. – Vol. 542, Part A. – P. 231–237.
156. Montezano, A. C. Angiotensin II and vascular injury [Text] / A. C. Montezano, A. Nguyen Dinh Cat, F. J. Rios, R. M. Touyz // *Curr. Hypertens. Rep.* – 2014. – Vol. 16, № 6. – Art. No.: 431.
157. Moreno, D. A769662, a novel activator of AMP-activated protein kinase, inhibits non-proteolytic components of the 26S proteasome by an AMPK-independent mechanism [Text] / D.

- Moreno, E. Knecht, B. Viollet, P. Sanz // *FEBS Lett.* – 2008. – Vol. 582, № 17. – P. 2650–2654.
158. Morini, G. Synthesis and structure-activity relationships for biphenyl H<sub>3</sub> receptor antagonists with moderate anti-cholinesterase activity [Text] / G. Morini, M. Comini, M. Rivara [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 16, № 23. – P. 9911–9924.
159. Muguruza, C. Group II metabotropic glutamate receptors as targets for novel antipsychotic drugs [Text] / C. Muguruza, J. J. Meana, L. F. Callado // *Front. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 7. – Art. No.: 130.
160. Müller, G. Medicinal chemistry of target family-directed masterkeys [Text] / G. Müller // *Drug Discov. Today.* – 2003. – Vol. 8, № 15. – P. 681–691.
161. Müller, T. H. Profound and sustained inhibition of platelet aggregation by Fradafiban, a nonpeptide platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist, and its orally active prodrug, Lefradafiban, in men [Text] / T. H. Müller, H. Weisenberger, R. Brickl [et al.] // *Circulation.* – 1997. – Vol. 96, № 4. – P. 1130–1138.
162. Murugesan, N. Biphenylsulfonamide endothelin receptor antagonists. Discovery of N-[[2'-[[[(4,5-Dimethyl-3-isoxazolyl)amino]sulfonyl]-4-(2-oxazolyl)[1,1'-biphenyl]-2-yl]methyl]-N,3,3-trimethylbutanamide (BMS-207940), a highly potent and orally active ET<sub>A</sub> selective antagonist [Text] / N. Murugesan, Z. Gu, S. Spergel [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2003. – Vol. 46, № 1. – P. 125–137.
163. Mutahir, S. Novel biphenyl bis-sulfonamides as acetyl and butyrylcholinesterase inhibitors: synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies [Text] / S. Mutahir, J. Jończyk, M. Bajda [et al.] // *Bioorg. Chem.* – 2016. – Vol. 64. – P. 13–20.
164. Naik, P. Angiotensin II receptor type 1 (AT<sub>1</sub>) selective nonpeptidic antagonists – a perspective [Text] / P. Naik, P. Murumkar, R. Giridhar, M. R. Yadav // *Bioorg. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 18, № 24. – P. 8418–8456.
165. Narasimhan, B. Benzimidazole: a medicinally important heterocyclic moiety [Text] / B. Narasimhan, D. Sharma, P. Kumar // *Med. Chem. Res.* – 2012. – Vol. 21, № 3. – P. 269–283.
166. Nikolic, K. Procognitive properties of drugs with single and multitargeting H<sub>3</sub> receptor antagonist activities [Text] / K. Nikolic, S. Filipic, D. Agbaba, H. Stark // *CNS Neurosci. Ther.* – 2014. – Vol. 20, № 7. – P. 613–623.
167. Nowotny, K. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus [Text] / K. Nowotny, T. Jung, A. Höhn [et al.] // *Biomolecules.* – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 194–222.
168. Obermoser, V. Importance of 5/6-aryl substitution on the pharmacological profile of 4'-((2-propyl-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)methyl)-[1,1'-biphenyl]-2-carboxylic acid derived PPAR<sub>γ</sub> agonists [Text] / V. Obermoser, R. Mauersberger, D. Schuster [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* –



2017. – Vol. 126. – P. 590–603.
169. Oijma, M. In vitro antagonistic properties of a new angiotensin type 1 receptor blocker, azilsartan, in receptor binding and function studies [Text] / M. Oijma, H. Igata, M. Tanaka [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2011. – Vol. 336, № 3. – P. 801–808.
170. Olefsky, J. M. Mechanisms of insulin resistance in obesity and noninsulin-dependent (type II) diabetes [Text] / J. M. Olefsky, O. G. Kolterman // *Am. J. Med.* – 1981. – Vol. 70, № 1. – P. 151–168.
171. Ong C. K. S. An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs [Text] / C. K. S. Ong, P. Lirk, C. H. Tan, R. A. Seymour // *Clin. Med. Res.* – 2007. – Vol. 5, № 1. – P. 19–34.
172. Overington, J. P. How many drug targets are there? [Text] / J. P. Overington, B. Al-Lazikani, A. L. Hopkins // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2006. – Vol. 5, № 12. – P. 993–996.
173. Park, E. S. Antiplatelet activity of obovatol, a biphenolic component of *Magnolia Obovata*, in rat arterial thrombosis and rabbit platelet aggregation [Text] / E. S. Park, Y. Lim, S. H. Lee [et al.] // *J. Atheroscler. Thromb.* – 2011. – Vol. 18, № 8. – P. 659–669.
174. Patchett, A. A. Privileged structures – an update [Text] / A. A. Patchett, R. P. Nargund // *Annu. Rep. Med. Chem.* – 2000. – Vol. 35. – P. 289–298.
175. Peltason, L. Rationalizing three-dimensional activity landscapes and the influence of molecular representations on landscape topology and the formation of activity cliffs [Text] / L. Peltason, P. Iyer, J. Bajorath // *J. Chem. Inf. Model.* – 2010. – Vol. 50, № 6. – P. 1021–1033.
176. Pernow, J. New perspectives on endothelin-1 in atherosclerosis and diabetes mellitus [Text] / J. Pernow, A. Shemyakin, F. Bohm // *Life Sciences.* – 2012. – Vol. 19, № 13–14. – P. 507–516.
177. Peterlik, D. The emerging role of metabotropic glutamate receptors in the pathophysiology of chronic stress-related disorders [Text] / D. Peterlik, P. J. Flor, N. Uschold-Schmidt // *Current Neuropharmacology.* – 2016. – Vol. 14, № 5. – P. 514–539.
178. Phillips, M. I. Brain renin angiotensin in disease [Text] / M. I. Phillips, E. M. de Oliveira // *J. Mol. Med.* – 2008. – Vol. 86, № 6. – P. 715–722.
179. Pi-Sunyer, F. X. Efficacy and tolerability of vildagliptin monotherapy in drug-naive patients with type 2 diabetes [Text] / F. X. Pi-Sunyer, A. Schweizer, D. Mills [et al.] // *Diabetes Res. Clin. Pract.* – 2007. – Vol. 76, № 1. – P. 132–138.
180. Pinto, D. J. 1-[3-Aminobenzisoxazol-5'-yl]-3-trifluoromethyl-6-[2'-(3-(R)-hydroxy-N-pyrrolidinyl)methyl-[1,1']-biphen-4-yl]-1,4,5,6-tetrahydropyrazolo-[3,4-c]-pyridin-7-one (BMS-740808) a highly potent, selective, efficacious, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa [Text] / D. J. Pinto, M. J. Orwat, M. L. Quan [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.*

- Lett. – 2006. – Vol. 16, № 15. – P. 4141–4147.
181. Polanski, J. Privileged structures - dream or reality: preferential organization of azanaphthalene scaffold [Text] / J. Polanski, A. Kurczyk, A. Bak, R. Musiol // *Curr. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 19, № 13. – P. 1921–1945.
182. Powell, D. A. 2-Aryl benzimidazoles: human SCD1-specific stearyl coenzyme-A desaturase inhibitors [Text] / D. A. Powell, Y. Ramtohul, M. E Lebrun [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 20, № 22. – P. 6366–6369.
183. Ratnasooriya, W. D. In vitro Antiglycation and Cross-Link Breaking Activities of Sri Lankan Low-Grown Orthodox Orange Pekoe Grade Black Tea (*Camellia sinensis* L) [Text] / W. D. Ratnasooriya, W. K. S. M. Abeysekera, T. B. S. Muthunayake, C. D. T. Ratnasooriya // *Trop. J. Pharm. Res.* – 2014. – Vol. 13, № 4. – P. 567–571.
184. Rice-Evans, C. Total antioxidant status in plasma and body fluids [Text] / C. Rice-Evans, N. J. Miller // *Methods Enzymol.* – 1994. – Vol. 234, Part D. – P. 278–293.
185. Rikhi, M. In vitro antioxidant activity of biphenyl-2,6-diethanone derivatives [Text] / M. Rikhi, D. K. Bharadwaj, S. Bhatnagar // *Int. J. ChemTech. Res.* – 2015. – Vol. 8, № 12. – P. 552–558.
186. Saavedra, J. M. Angiotensin II AT (1) receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders [Text] / J. M. Saavedra // *Clin. Sci (Lond.)* – 2012. – Vol. 123, № 10. – P. 567–590.
187. Saavedra, J. M. Blockade of brain angiotensin II AT<sub>1</sub> receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: therapeutic implications [Text] / J. M. Saavedra, E. Sanchez-Lemus, J. Benicky // *Psychoneuroendocrinology.* – 2011. – Vol. 36, № 1. – P. 1–18.
188. Sachan, N. Substituted biphenyl ethanones as antidiabetic agents: synthesis and in-vivo screening [Text] / N. Sachan, S. Thareja, R. Agarwal [et al.] // *Int. J. ChemTech Res.* – 2009. – Vol. 1, № 4. – P. 1625–1631.
189. Sakamoto, T. Antithrombotic effects of losartan in patients with hypertension complicated by atrial fibrillation: 4A (Angiotensin II Antagonist of platelet Aggregation in patients with Atrial fibrillation), a pilot study [Text] / T. Sakamoto, T. Kudoh, K. Sakamoto [et al.] // *Hypertens. Res.* – 2014. – Vol. 37, № 6. – P. 513–518.
190. Savoia, C. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions [Text] / C. Savoia, E. L. Schiffrin // *Clin. Sci.* – 2007. – Vol. 112, № 7. – P. 375–384.
191. Scannell, J. W. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency [Text] / J. W. Scannell, A. Blanckley, H. Boldon, B. Warrington // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2012. – Vol. 11, № 3. – P. 191–200.

192. Schleicher, E. Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis [Text] / E. Schleicher, U. Friess // *Kidney Int. Suppl.* – 2007. – Vol. 106. – P. S17–S26.
193. Schreiber, S. L. Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery [Text] / S. L. Schreiber // *Science.* – 2000. – Vol. 287, № 5460. – P. 1964–1969.
194. Serebruany, V. L. Effects of valsartan and valeryl 4-hydroxy valsartan on human platelets: a possible additional mechanism for clinical benefits [Text] / V. L. Serebruany, A. I. Malinin, D. R. Lowry [et al.] // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 43, № 5. – P. 677–684.
195. Serebruany, V. L. Valsartan inhibits platelet activity at different doses in mild to moderate hypertensives: Valsartan Inhibits Platelets (VIP) trial [Text] / V. L. Serebruany, A. N. Pokov, A. I. Malinin [et al.] // *Am. Heart J.* – 2006. – Vol. 151, № 1. – P. 92–99.
196. Severinsen, R. Library of biphenyl privileged substructures using a safety-catch linker approach [Text] / R. Severinsen, G. T. Bourne, T. T. Tran [et al.] // *J. Comb. Chem.* – 2008. – Vol. 10, № 4. – P. 557–566.
197. Shim, Y. S. Formylchromone derivatives as a novel class of protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors [Text] / Y. S. Shim, K. C. Kim, D. Y. Chi // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2003. – Vol. 13, № 15. – P. 2561–2563.
198. Siegel, S. Nonparametric statistics for the behavioral sciences, 2<sup>nd</sup> ed. [Text] / S. Siegel, N. J. Castellan. – New York: McGraw-Hill, 1988 – 399 p.
199. Silveira, K. D. Mechanisms of the anti-inflammatory actions of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in experimental models of arthritis [Text] / K. D. Silveira, F. M. Coelho, A. T. Vieira [et al.] // *Peptides.* – 2013. – Vol. 46. – P. 53–63.
200. Sindhi, V. Potential applications of antioxidants – a review [Text] / V. Sindhi, V. Gupta, K. Sharma [et al.] // *J. Pharm. Res.* – 2013. – Vol. 7, № 9. – P. 828–835.
201. Singh, U. Oxidative stress and atherosclerosis [Text] / U. Singh, I. Jialal // *Pathophysiology.* – 2006. – Vol. 13, № 3. – P. 129–142.
202. Smith, M. A. Oxidative stress in Alzheimer's disease [Text] / M. A. Smith, C. A. Rottkamp, A. Nunomura [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1502, № 1. – P. 139–144.
203. Smith, R. G. A nonpeptidyl growth hormone secretagogue [Text] / R. G. Smith, K. Cheng, W. R. Schoen [et al.] // *Science.* – 1993. – Vol. 260, № 5114. – P. 1640–1643.
204. Song, M. NSC-87877, inhibitor of SHP-1/2 PTPs, inhibits dual-specificity phosphatase 26 (DUSP26) [Text] / M. Song, J. E. Park, S. G. Park [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – Vol. 381, № 4. – P. 491–495.
205. Srinivasan, K. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening [Text] / K. Srinivasan, B. Viswanad,

- L. Asrat [et al.] // *Pharmacol. Res.* – 2005. – Vol. 52, № 4. – P. 313–320.
206. Steckelings, U. M. AT<sub>2</sub> receptors agonists: hypertension and beyond [Text] / U. M. Steckelings, L. Paulis, P. Namsolleck, T. Unger // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* – 2012. – Vol. 21, № 2. – P. 142–146.
207. Suh, S. W. Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316,819 ([R-R\*,S\*]-5-Chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide) [Text] / S. W. Suh, J. P. Bergher, C. M. Anderson [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2007. – Vol. 321, № 1. – P. 45–50.
208. Taguchi, I. Irbesartan, an angiotensin receptor blocker, exhibits metabolic, anti-inflammatory and antioxidative effects in patients with high-risk hypertension [Text] / I. Taguchi, S. Toyoda, K. Takano [et al.] // *Hypertens. Res.* – 2013. – Vol. 36, № 7. – P. 608–613.
209. Thareja, S. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors: a molecular level legitimate approach for the management of diabetes mellitus [Text] / S. Thareja, S. Aggarwal, T. R. Bhardwaj, M. Kumar // *Med. Res. Rev.* – 2012. – Vol. 32, № 3. – P. 459–517.
210. Thornalley, P. J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts [Text] / P. J. Thornalley // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2003. – Vol. 419, № 1. – P. 31–40.
211. Tiganis, T. PTP1B and TCPTP – nonredundant phosphatases in insulin signaling and glucose homeostasis [Text] / T. Tiganis // *FEBS J.* – 2013. – Vol. 280, № 2. – P. 445–458.
212. Touyz, R. M. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells: implications in cardiovascular disease [Text] / R. M. Touyz // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2004. – Vol. 37, № 8. – P. 1263–1273.
213. Travins, J. M. 1-(3-Aryloxyaryl)benzimidazole sulfones are liver X receptor agonists [Text] / J. M. Travins, R. C. Bernotas, D. H. Kaufman [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 20, № 2. – P. 526–530.
214. Ullrich, J. W. Synthesis of 4-(3-biaryl)quinoline sulfones as potent liver X receptor agonists [Text] / J. W. Ullrich, R. Morris, R. C. Bernotas [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2010. – Vol. 20, № 9. – P. 2903–2907.
215. Upston, J. M. The role of vitamin E in atherosclerosis [Text] / J. M. Upston, L. Kritharides, R. Stocker // *Prog. Lipid Res.* – 2003. – Vol. 42, № 5. – P. 405–422.
216. Van Zwieten, P. A. Angiotensin II receptor antagonists (AT<sub>1</sub>-blockers, ARBs, sartans): similarities and differences [Text] / P. A. van Zwieten // *Neth. Heart J.* – 2006. – Vol. 14, № 11. – P. 381–387.
217. Vasan, S. Therapeutic potential of AGE inhibitors and breakers of AGE protein cross-

- links [Text] / S. Vasani, P. G. Foiles, H. W. Founds // *Expert. Opin. Investig. Drugs.* – 2001. – Vol. 10, № 11. – P. 1977–1987.
218. Vasani, S. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks [Text] / S. Vasani, P. Foiles, H. Founds // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2003. – Vol. 419, № 1. – P. 89–96.
219. Wadenberg, M.-L. Bifeprunox: a novel antipsychotic agent with partial agonist properties at dopamine D<sub>2</sub> and serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors [Text] / M.-L. Wadenberg // *Future Neurol.* – 2007. – Vol. 2, № 2. – P. 153–165.
220. Wang, J. Telmisartan ameliorates glutamate-induced neurotoxicity: roles of AT (1) receptor blockade and PPAR $\gamma$  activation [Text] / J. Wang, T. Pang, R. Hafko [et al.] // *Neuropharmacology.* – 2014. – Vol. 79. – P. 249–261.
221. Ward, A. Bumetanide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use [Text] / A. Ward, R. C. Heel // *Drugs.* – 1984. – Vol. 28, № 5. – P. 426–464.
222. Ward, D. J. Decline in new drug launches: myth or reality? Retrospective observational study using 30 years of data from the UK [Text] / D. J. Ward, O. I. Martino, S. Simpson, A. J. Stevens // *BMJ Open.* – 2013. – Vol. 3, № 2. – P. e002088.
223. Wei, M. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes [Text] / M. Wei, L. Ong, M. T. Smith [et al.] // *Heart, Lung and Circulation.* – 2003. – Vol. 12. – P. 44–50.
224. Welsch, M. E. Privileged scaffolds for library design and drug discovery [Text] / M. E. Welsch, S. A. Snyder, B. R. Stockwell // *Current opinion in chemical biology.* – 2010. – Vol. 14, № 3. – P. 347–361.
225. Wong, P. C. Nonpeptide factor Xa inhibitors: DPC423, a highly potent and orally bioavailable pyrazole antithrombotic agent [Text] / P. C. Wong, D. J. Pinto, R. M. Knabb // *Cardiovasc. Drug. Rev.* – 2002. – Vol. 20, № 2. – P. 137–152.
226. Wright, J. W. The brain renin-angiotensin system: a diversity of functions and implications for CNS diseases [Text] / J. W. Wright, J. W. Harding // *Pflugers. Arch.* – 2013. – Vol. 465, № 1. – P. 133–151.
227. Yamagishi, S. Potential clinical utility of advanced glycation end product cross-link breakers in age- and diabetes-associated disorders [Text] / S. Yamagishi // *Rejuvenation Res.* – 2012. – Vol. 15, № 6. – P. 564–572.
228. Yar, M. S. Synthesis and in vivo diuretic activity of biphenyl benzothiazole-2-carboxamide derivatives [Text] / M. S. Yar, Z. H. Ansari // *Acta. Pol. Pharm.* – 2009. – Vol. 66, № 4. – P. 387–392.

229. Young, I. S. Antioxidants in health and disease [Text] / I. S. Young, J. V. Woodside // *J. Clin. Pathol.* – 2001. – Vol. 54, № 3. – P. 176–186.
230. Zefirov, N. S. Fragmental approach in QSPR [Text] / N. S. Zefirov, V. A. Palyulin // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 2002. – Vol. 42, № 5. – P. 1112–1122.
231. Zhang, B. Alagebrium (ALT-711) improves the anti-hypertensive efficacy of nifedipine in diabetic-hypertensive rats [Text] / B. Zhang, K. He, W. Chen [et al.] // *Hypertens. Res.* – 2014. – Vol. 37, № 10. – P. 901–907.
232. Zhang, L.-H. Polyketide butenolide, diphenyl ether, and benzophenone derivatives from the fungus *Aspergillus flavipes* PJ03-11 [Text] / L.-H. Zhang, B.-M. Feng, Y.-Q. Zhao [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2016. – Vol. 26, № 2. – P. 346–350.
233. Zhang, W. J. Network pharmacology: a further description [Text] / W. J. Zhang // *Network Pharmacology.* – 2016. – Vol. 1, № 1. – P. 1–14.
234. Zhou, G. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action [Text] / G. Zhou, R. Myers, Y. Li [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 108, № 8. – P. 1167–1174.
235. Zidek, V. Tissue-specific peroxisome proliferator activated receptor gamma expression and metabolic effects of telmisartan [Text] / V. Zidek, P. Mlejnek, M. Simakova [et al.] // *Am. J. Hypertens.* – 2013. – Vol. 26, № 6. – P. 829–835.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

(информационное)

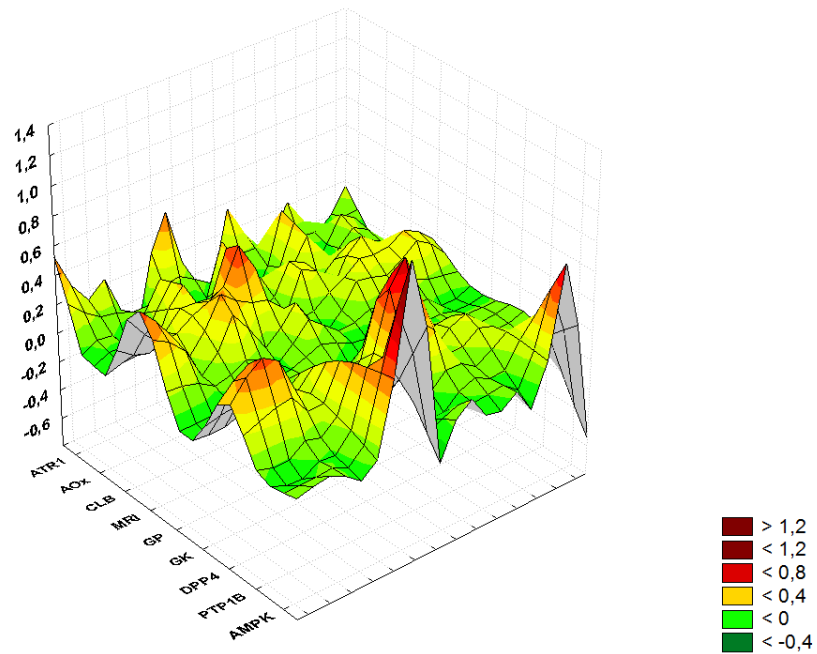
Дополнения и уточнения к анализу *in silico* результатов скрининговых исследований

Рисунок А.1 Ландшафт данных биологической активности для производных дифенилоксида.

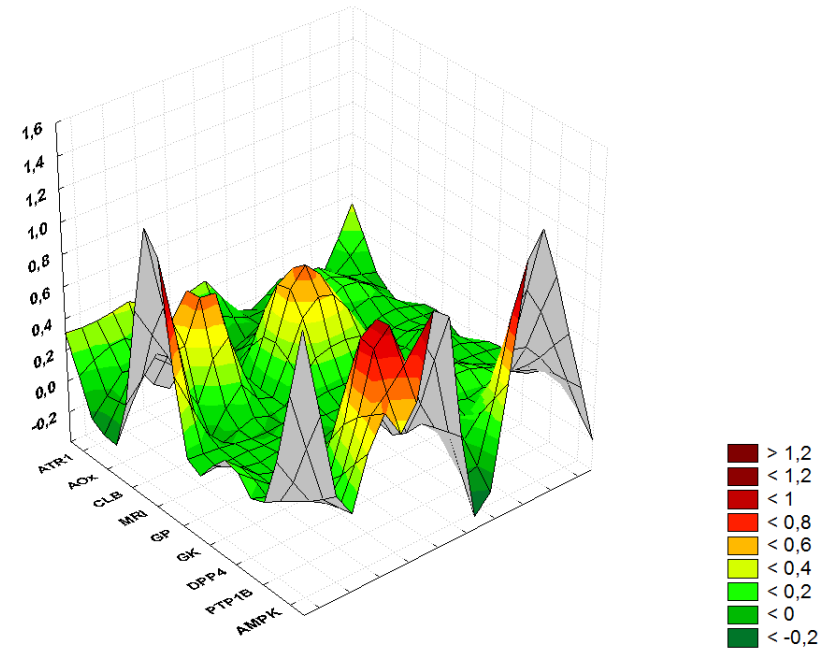


Рисунок А.2 Ландшафт данных биологической активности для производных дифенила.

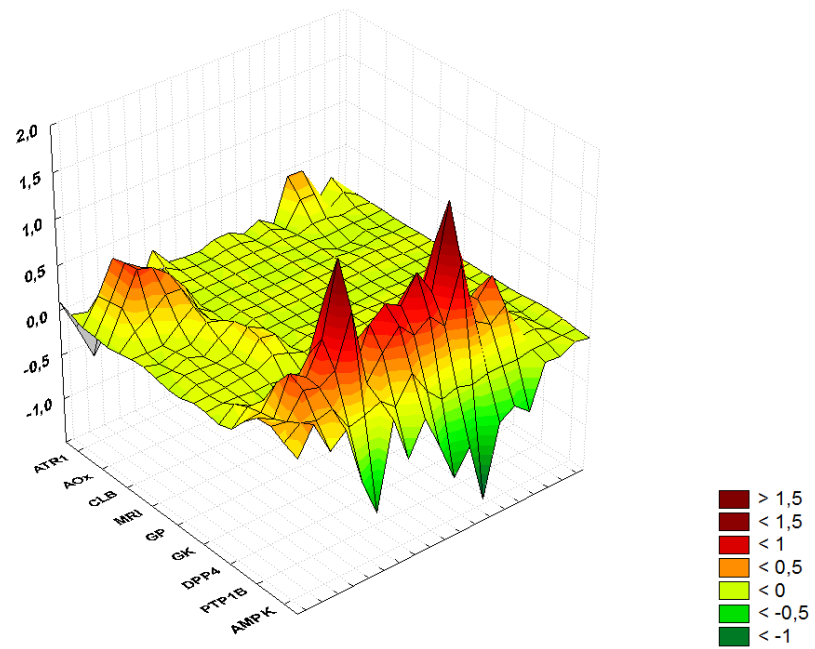


Рисунок А.3 Ландшафт данных биологической активности для производных дифенила, сопряженных с бензимидазолом.

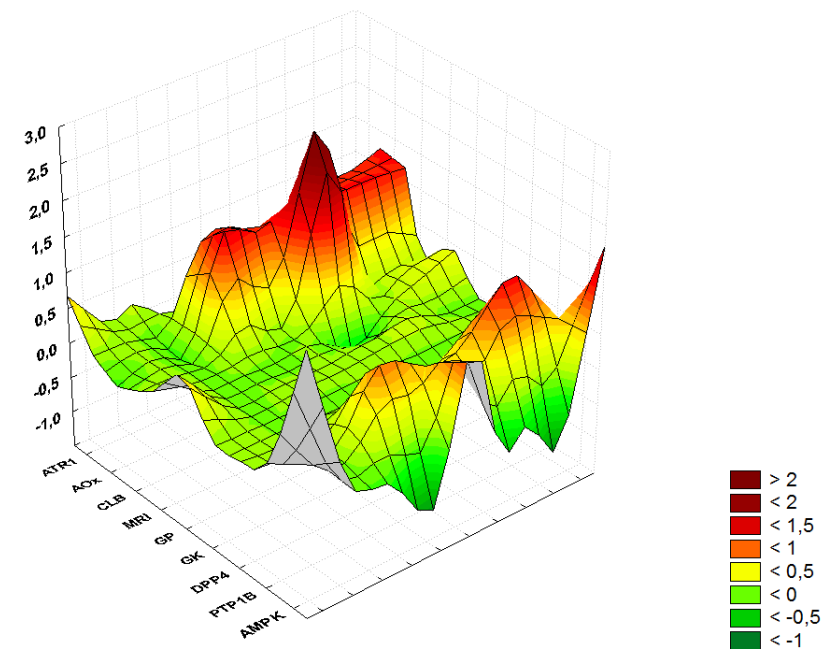


Рисунок А.4 Ландшафт данных биологической активности для производных дифенила, сопряженных с имидазобензимидазолом.



Таблица А.1. – Оценка вклада базовых химических структур в активность изучаемых соединений четырех классов с использованием медианных оценок  $M(X)$ .

Химический класс	Число соединений	Виды биологической активности									
		АМПК	РТР1В	DPP4	GK	GP	MRI	CLB	AOx	ATR1	ADP
DPO	14	0,53	0,09	0,18	0,00	0,00	0,23	0,20	0,01	0,04	0,16
DP	7	0,53	0,15	0,11	0,02	0,12	0,32	0,33	0,05	0,07	0,90
DP+BI	6	0,34	0,58	0,08	0,02	0,06	0,00	0,16	0,00	0,02	1,80
DP+ImBI	8	0,47	0,57	0,05	0,03	0,00	0,00	0,51	0,99	0,00	0,28

Примечание: DPO – производные дифенилоксида; DP – производные дифенила; DP+BI – производные дифенила, сопряженные с бензимидазолом; DP+ImBI – производные дифенила, сопряженные с имидазобензимидазолом; АМПК – изменение активности АМПК; РТР1В – изменение активности РТР1В; DPP4 – изменение активности ДПП-4; GK – изменение активности глюкокиназы; GP – изменение активности гликогенфосфорилазы; MRI – изменение неферментативного гликозилирования белков; CLB – регликирующая активность; AOx – антиоксидантная активность; ATR1 – антиангиотензиновая (AT<sub>1</sub>) активность; ADP – влияние на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

Таблица А.2. – Оценка лабильности базовых химических структур изучаемых соединений четырех классов на введение заместителей, увеличивающих активность, с использованием разницы между супремальной и медианной оценками уровня биологической активности  $\Delta(X)$ .

Химический класс	Число соединений	Виды биологической активности									
		АМПК	РТР1В	DPP4	GK	GP	MRI	CLB	AOx	ATR1	ADP
DPO	14	0,27	0,35	0,52	0,10	0,12	0,24	0,46	0,27	0,14	1,10
DP	7	0,29	0,80	0,07	0,03	0,03	0,50	0,38	0,20	0,12	1,75
DP+BI	6	0,08	0,87	0,11	0,03	0,30	0,31	0,26	0,59	0,36	1,41
DP+ImBI	8	0,50	0,67	0,09	0,02	0,42	0,38	2,03	0,03	0,22	1,77

Примечание: DPO – производные дифенилоксида; DP – производные дифенила; DP+BI – производные дифенила, сопряженные с бензимидазолом; DP+ImBI – производные дифенила, сопряженные с имидазобензимидазолом; АМПК – изменение активности АМПК; РТР1В – изменение активности РТР1В; DPP4 – изменение активности ДПП-4; GK – изменение активности глюкокиназы; GP – изменение активности гликогенфосфорилазы; MRI – изменение неферментативного гликозилирования белков; CLB – регликирующая активность; AOx – антиоксидантная активность; ATR1 – антиангиотензиновая (AT<sub>1</sub>) активность; ADP – влияние на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

Таблица А.3. – Значимость сравнений медиан 4-х химических классов изучаемых соединений по совокупности 10 видов фармакологической активности по критерию Манна-Уитни.

Активность	DPO/DP	DPO/(DP+BI)	DPO/(DP+ImBI)	DP/(DP+BI)	DP/(DP+ImBI)	(DP+BI)/(DP+ImBI)	∑Ind	Ранг
АМРК		1		1			2	<b>10</b>
РТР1В	1	5	4	4	2		16	<b>1</b>
DPР4	1	2	3		3		9	<b>5</b>
GK	3	3	3				9	<b>5</b>
GP	4	2					6	<b>8</b>
MRI		3	3	2	2		10	<b>3</b>
CLB			3			3	6	<b>8</b>
АОх			3	1	2	4	10	<b>3</b>
АТР1		1	4	1	2		8	<b>7</b>
ADP	3	4		2	3	3	15	<b>2</b>
<b>Привилегированность</b>	<b>12</b>	<b>21</b>	<b>23</b>	11	14	10		
АМРК	0,8774	0,1481	0,8291	0,1489	0,9061	0,6973		
РТР1В	0,1598	0,0002	0,0026	0,0057	0,0588	0,5974		
DPР4	0,1172	0,0696	0,0169	0,2531	0,0491	0,2453		
GK	0,0126	0,0168	0,0168	0,9292	0,5049	0,2480		
GP	0,0081	0,0999	0,3612	0,3848	0,2460	0,4081		
MRI	0,4944	0,0307	0,0420	0,0807	0,0794	0,7635		
CLB	0,3386	0,6795	0,0201	0,4009	0,3181	0,0452		
АОх	0,4741	0,4418	0,0157	0,1382	0,0686	0,0016		
АТР1	0,5578	0,1093	0,0083	0,1604	0,0692	0,2948		
ADP	0,0169	0,0030	0,7329	0,0933	0,0460	0,0282		

Примечание: сумма индексов значимости Ind, отражающих достоверность влияния: 0 баллов – отсутствие влияния; 1 балл – тенденция; 2 балла – слабое; 3 балла – выраженное статистически достоверное; 4 балла – сильное; 5 баллов – очень сильное.

Таблица А.4. – Значимость сравнений медиан 4-х химических классов изучаемых соединений по совокупности 10 видов фармакологической активности по медианному тесту.

Активность	DPO/DP	DPO/(DP+BI)	DPO/(DP+ImBI)	DP/(DP+BI)	DP/(DP+ImBI)	(DP+BI)/(DP+ImBI)	∑Ind	Ранг
АМРК							0	9
РТР1В		5	3	2			10	1
ДРР4			3				3	5
GK	1		3				4	3
GP	1						1	7
MRI							0	9
CLB			1				1	7
АОх			1			3	4	3
АТР1			1		1		2	6
ADP		3				3	6	2
<b>Привилегированность</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>6</b>		
АМРК	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		
РТР1В	1,0000	0,0004	0,0145	0,0696	0,3990	1,0000		
ДРР4	1,0000	0,4178	0,0220	1,0000	0,7333	1,0000		
GK	0,1304	0,2116	0,0291	1,0000	1,0000	1,0000		
GP	0,1352	0,9648	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000		
MRI	1,0000	0,2990	0,3769	0,2377	0,3016	1,0000		
CLB	1,0000	1,0000	0,1516	1,0000	1,0000	0,2213		
АОх	1,0000	1,0000	0,1028	1,0000	0,6577	0,0110		
АТР1	1,0000	0,7739	0,1423	0,8318	0,1718	1,0000		
ADP	0,2106	0,0134	1,0000	1,0000	0,3101	0,0276		

Примечание: сумма индексов значимости Ind, отражающих достоверность влияния: 0 баллов – отсутствие влияния; 1 балл – тенденция; 2 балла – слабое; 3 балла – выраженное статистически достоверное; 4 балла – сильное; 5 баллов – очень сильное.

Таблица А.5. – Значения антидиабетического функционала сетевого профиля для 35 изученных соединений.

Шифр	Значение функционала	Группа
AZH-0141	1,042	3
AZH-0136	0,923	3
TONS-0462	0,856	1
LOSAZ-0033	0,682	2
AZH-0133	0,488	3
DF-0005	0,482	4
AZHT-0007	0,352	2
RUI-0027	0,306	2
LOSAZ-0034	0,276	2
AZH-0134	0,253	3
TONS-0281	0,077	1
TONS-0514	0,043	1
DF-0004	0,008	4
RUI-0026	0,002	2
TONS-0513	-0,007	1
RUS-0221	-0,008	2
TONS-0495	-0,008	1
RUI-0025	-0,074	2
TONS-0512	-0,080	1
AZH-0137	-0,091	3
TONS-0508	-0,143	1
TONS-0511	-0,242	1
TONS-0232	-0,352	1
TONS-0241	-0,438	1
AZH-0135	-0,458	3
DF-0001	-0,617	4
DF-0006	-0,618	4
TONS-0226	-0,700	1
DF-0008	-0,765	4
TONS-0504	-0,770	1
TONS-0227	-0,813	1
TONS-0503	-0,864	1
DF-0002	-1,004	4
DF-0007	-1,059	4

Примечание: номер группы соответствует принадлежности соединения к: 1 – производным дифенилоксида; 2 – производным бифенила; 3 – производным бифенила, сопряженным с бензимидазолом; 4 – производным бифенила, сопряженным с имидазобензимидазолом.