

Говорова Юлия Александровна

**Антигликирующие свойства
производных пиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазина и их влияние на отдаленные нарушения
структуры и функции глаза при экспериментальном сахарном диабете**

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена на кафедре фармакологии и биоинформатики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

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

Спасов Александр Алексеевич

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент

Науменко Людмила Владимировна

Официальные оппоненты:

Соколов Алексей Юрьевич, доктор медицинских наук, доцент, Институт фармакологии им. А.В. Вальдмана, отдел нейрофармакологии, заведующий отделом, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакологии, профессор кафедры

Пересыпкина Анна Александровна, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», кафедра фармакологии и клинической фармакологии, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «__» _____ 2023 г. в ____ ч. на заседании диссертационного совета 21.2.005.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, Волгоград, пл. Павших борцов, 1, и с авторефератом на сайтах: www.volgmed.ru, www.vak2.ed.gov.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.005.02,
доктор медицинских наук

Шаталова Ольга Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В 2020 г. в России было зарегистрировано 265,4 тыс. человек с сахарным диабетом 1 типа (СД) и 4,43 млн с сахарным диабетом 2 типа (Дедов И. И. [и др.], 2021). Осложнения сахарного диабета являются основными причинами смерти в популяции больных сахарным диабетом 1 и 2 типов, в первую очередь из-за высокого сердечно-сосудистого риска (Петров В. И. [и др.], 2013; Стаценко М. Е., Деревянченко М. В., 2019). Глазные заболевания, которые также относятся к поздним осложнениям СД, не летальны, однако приводят к прогрессирующему снижению зрения вплоть до слепоты, и, следовательно, к ухудшению общего качества жизни пациентов с диабетом (Липатов Д. В. [и др.], 2014; Малугин Б. Э. [и др.], 2014; Нероев В. В. [и др.], 2016; Нероев В. В. [и др.], 2018).

Одним из основных патогенетических путей развития поздних осложнений сахарного диабета выступает неферментативное гликирование (или реакция Майяра), интенсивность которого нарастает при хронической гипергликемии; гликирование приводит к избыточному образованию его конечных продуктов (КПГ) (Спасов А. А., Соловьева О. А., Кузнецова В. А., 2017). Неферментативное гликирование и процессы, непосредственно связанные с ним, вызывают нарушения структуры и функции органа зрения при сахарном диабете (Yamagishi S., 2011). Активация оси КПГ/рецепторы КПГ влечет за собой генерацию активных кислородных метаболитов, образование молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1) (лейкостаз, тромбообразование), провоспалительных цитокинов, хемокинов и проапоптотических белков ИЛ-6, ИЛ-1 β , ФНО- α , Вах, iNOS (апоптоз нейронов сетчатки, клеток Мюллера, клеток ретинального пигментного эпителия, перицитов и эндотелиальных клеток сетчатки, эпителиальных клеток хрусталика), продукцию эндотелиального фактора роста (VEGF) (неоангиогенез), активацию протеинкиназы C (уменьшение белков плотных контактов эндотелиальных клеток сетчатки ZO-1, ZO-2 – патологическая проницаемость гематоофтальмического барьера, уменьшение коннексонов в хрусталике – катарактогенез) (Joussen A. M. [et al.], 2004; Kaji Y. [et al.], 2007; Yamagishi S., Matsui T., Nakamura K. [et al.], 2008; Warboys C. M., Hong-Boon Toh H.-B., Fraser P. A., 2009; Kim J. H. [et al.], 2010; Yamagishi S., 2011; Romeo G. [et al.], 2002; Kim J. [et al.], 2016; Fan L., Yan H., 2016; Capitão M., Soares R., 2016). Гликирование мембран эритроцитов и гемоглобина приводит к снижению их деформируемости, к нарушению гемоперфузии сетчатки и тканевой гипоксии (Емельянов В. В., 2016; Iwata H. [et al.], 2004; Brown C. D. [et al.], 2001). Гликирование коллагена базальной мембраны сосудов сетчатки приводит к увеличению ее толщины и снижению эластичности (McNulty M., Mahmud A., Feely J., 2007; Zhang W.-J. [et al.], 2017). Гликирование кристаллинов, накопление КПГ в хрусталиках приводит к снижению их прозрачности (Su S. [et al.], 2014; Reddy V. S., Reddy G. B., 2016; Bahmani F. [et al.], 2016; Fan X., Monnier V. M., 2021).

Накопление КПП приводит к повышению уровня внутриглазного давления (ВГД) (Endo M. [et al.], 2001; Tezel G. [et al.], 2007; Sandra M. F. [et al.], 2004).

Селективное ингибирование реакции неферментативного гликирования представляется перспективной стратегией профилактики и лечения поздних осложнений сахарного диабета. Используемые в клинической практике ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, блокаторы рецепторов ангиотензина II (сартаны), антиоксиданты (липоевая кислота), статины проявляют несущественную антигликирующую активность и не применяются для фармакологической коррекции глазных осложнений сахарного диабета (Prasad K. [et al.], 2017; Нероев В. В. [и др.], 2020). Современные подходы к лечению диабетических ретинопатии, катаракты и глаукомы, признанные эффективными, остаются в то же время радикальными, имеют ряд серьезных ограничений и осложнений, их успешность часто временная, учитывая хронический характер сахарного диабета (McNulty R. [et al.], 2004; Falavarjani K. G. [et al.], 2013; С. Ю. Копаев [et al.], 2017; Hanna Ramy M. [et al.], 2019; Rezzola S. [et al.], 2021).

Таким образом, одной из актуальных проблем офтальмофармакологического направления является поиск новых соединений, обладающих антигликирующим действием, которые перспективны для профилактики и лечения глазных осложнений сахарного диабета.

Тема утверждена на заседании ученого совета ВолгГМУ (протокол № 6 от 13.02.2019).

Степень разработанности. Наиболее изученное антигликирующее соединение – аминугуанидин – в настоящее время используется только как препарат сравнения при изучении новых ингибиторов реакции Майяра из-за вызываемых им побочных эффектов. В первом рандомизированном клиническом исследовании аминугуанидина (пимагедина) была выявлена его способность тормозить прогрессирование диабетической ретинопатии у пациентов с СД 1 типа (Thornalley P. J., 2003; Bolton W. K. [et al.], 2004). Опубликованы данные об ингибирующем влиянии аминугуанидина на катарактогенез и развитие ретинопатии у лабораторных животных с экспериментальным сахарным диабетом (Swamy-Mruthinti S. [et al.], 1996; Hong Yan [et al.], 2008; Luo D. [et al.], 2012; Kern T. S. [et al.], 2001; Mishra A. [et al.], 2012). За последние пять лет были опубликованы экспериментальные данные об эффективности соединений растительного происхождения, обладающих антигликирующей активностью, против прогрессирования диабетической ретинопатии (Li R.-L.[et al.], 2020; Bautista-Pérez R. [et al.], 2021; Kim Y. S. [et al.], 2020; Qian S. [et al.], 2019; Hwang S. H. [et al.], 2019; Jinjuan Lv. [et al.], 2020), есть данные об эффективности флавоноидов, апокаротиноидов, карнозина, L-лизина, цинка и других веществ, которые ингибируют образование КПП, против диабетического катарактогенеза (Patil K. K. [et al.], 2019; Kianpour M. [et al.], 2019; Matsuda S. [et al.], 2017; Barman S. [et al.], 2019; Bahmani F. [et al.], 2019).

Производные азоло[5,1-с]-[1,2,4]-триазины обладают широким спектром активности: антидиабетическим, противовирусным, антибактериальным, антиоксидантным, диуретическим и противоопухолевым действием (Русинов В. Л., 2008; Rusinov V. L. [et al.], 2017; Saad H. A. [et al.], 2011; Al-Adiwish W. M. [et al.], 2013). Таким образом, перспективен поиск среди них новых соединений, имеющих антигликирующие свойства.

Целью настоящего исследования является поиск соединений, обладающих антигликирующей активностью среди производных азоло[5,1-С]-1,2,4-триазины, а также изучение влияния соединения-лидера на отдаленные нарушения структуры и функции глаза при экспериментальном сахарном диабете.

Задачи исследования:

1. Проведение поиска новых антигликирующих соединений среди производных азоло[5,1-с]-1,2,4-триазины.
2. Анализ зависимости между структурой и антигликирующей активностью производных азоло[5,1-С]-1,2,4-триазины.
3. Исследование влияния наиболее активного антигликирующего соединения на изменение прозрачности хрусталика глаза при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете у крыс.
4. Оценка влияния самого активного антигликирующего соединения на уровень внутриглазного давления при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете у крыс.
5. Изучение влияния наиболее активного антигликирующего соединения на уровень микроциркуляции и электрофизиологические показатели сетчатки глаза при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете.
6. Выявление патоморфологических изменений хрусталика и сетчатки глаза при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете и определение содержания в хрусталике конечных продуктов гликирования и карбоксиметиллизина.
7. Изучение влияния самого активного антигликирующего соединения на реологические свойства крови лабораторных животных.
8. Изучение местнораздражающего действия наиболее активного соединения.
9. Изучение нейротоксикологического профиля соединения-лидера по антигликирующей активности.

Научная новизна исследования. Впервые проведено исследование антигликирующей активности производных азоло[5,1-С]-1,2,4-триазины (пиразоло[5,1-С]-1,2,4-триазины и триазоло[5,1-С]-1,2,4-триазины). Наиболее активными из исследованных соединений оказались производные пиразоло[5,1-С]-1,2,4-триазины. При этом установлено, что наличие этоксикарбонильной группы в С³ гарантирует проявление антигликирующей активности как

для производных пиразоло[5,1-С]-1,2,4-триазина, так и для производных триазоло[5,1-С]-1,2,4-триазина. Впервые получены данные о способности соединения АВ-19 препятствовать возникновению патологических изменений структуры и функции глаз при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете. Впервые установлено офтальмогипотензивное влияние соединения АВ-19 на уровень внутриглазного давления. Показано, что соединение АВ-19 способно влиять на гемореологические свойства крови. Определены отсутствие местнораздражающего действия для данного соединения и его низкое токсическое действие в отношении поведения животных.

Теоретическая и практическая значимость работы. В ходе проведенного исследования были получены данные, подтверждающие целесообразность поиска антигликирующих соединений среди производных азоло[5,1-с]-1,2,4-триазина. Получены результаты о специфическом фармакологическом действии нового соединения – натриевой соли диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропирозололо[5,1с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрата. Установлена способность данного соединения препятствовать развитию нарушений структуры и функции глаз при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете.

Связь с планом научно-исследовательских работ университета и отраслевыми программами. Исследование выполнено в рамках Договора от 01.02.2018 № 1/Н687.210.021/17 с ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» по государственному контракту № 14.N08.11.0204 «Доклинические исследования лекарственного средства, действующего на конечные продукты гликирования коллагена (AGE) и рецепторы к ним (RAGE), для профилактики и лечения осложнений сахарного диабета».

Методология и методы исследования. Методология и методы исследования выбраны исходя из поставленных задач исследования, проведенного на базе ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и Научного центра инновационных лекарственных средств ВолгГМУ.

Экспериментальные исследования выполнены с использованием достаточного количества лабораторных животных (нелинейных половозрелых мышей, крыс, кроликов породы шиншилла и морских свинок) и в соответствии с требованиями действующего «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [Миронов А.Н., 2012], со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2010, № 16, ст. 1815; № 31, ст. 4161), согласно Приказу Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и в соответствии с Решением Совета Евразийской экономической комиссии № 81 от 03.11.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического

союза в сфере обращения лекарственных средств». Использовались валидированные методы тестирования активности соединений *in vivo* и *in vitro*, а также рекомендованные для проведения доклинических исследований методы статистического анализа полученных результатов (Сергиенко В. И. [и др.], 2012). Все исследования были одобрены Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, протокол № 2093-2019 от 18.01.2019.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Новый ряд химических производных пиразоло[5,1-*C*]-1,2,4-триазина является перспективной группой соединений для поиска веществ, ингибирующих образование конечных продуктов гликирования белков.

2. Соединение АВ-19 (натриевая соль диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-*C*]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты) оказывает высокую антигликирующую активность, превышающую вещество сравнения амингуанидин, *in vitro* и *in vivo*.

3. Соединение АВ-19 тормозит развитие катарактогенеза, ретинопатии и офтальмогипертензии, ассоциированных с сахарным диабетом.

Личный вклад автора. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования фармакологической активности и токсикологических свойств соединения АВ-19. Автору принадлежит ведущая роль в проведении исследования на всех его этапах. При написании диссертационной работы автором выполнены анализ отечественной и зарубежной литературы, сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, оформление рукописи.

Внедрение результатов исследования в практику. Экспериментальные данные по способности новых соединений ингибировать образование конечных продуктов гликирования, а также анализ влияния различных заместителей на уровень антигликирующей активности в ряду новых производных пиразоло[5,1-*c*]-1,2,4-триазина используются при синтезе новых соединений в ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина». Новый комплексный подход к изучению антигликирующей активности веществ применяется в работе Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством ВолгГМУ. Результаты работы внедрены в лекционный курс на кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ.

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 на V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (Ярославль, 2018); на XXIII региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области «Актуальные проблемы экспериментальной медицины» (Волгоград, 2018); на Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А. А. Никулина «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2018); на 77-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2019); на XLVI Международной научно-практической конференции «Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования» (Москва, 2021); на XV Международной научно-практической конференции молодых ученых (Курск, 2021); на Республиканской научно-практической конференции «Новые технологии в офтальмологии 2021» (Казань, 2021).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 186 страницах, машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 5 глав собственных результатов исследований, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Библиографический список включает 432 источника: 366 иностранных и 66 отечественных. Диссертация иллюстрирована 7 рисунками, 15 таблицами.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 4 в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, ученой степени доктора наук, получен 1 патент на изобретение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическое и практическое значение научной работы.

В первой главе (обзор литературы) представлен анализ отечественных и зарубежных исследований, посвященных изучению патобиохимических механизмов развития глазных осложнений сахарного диабета, ведущей роли в их патогенезе неферментативного гликирования белков, описаны современные подходы к лечению диабетической ретинопатии, катаракты и глаукомы, изложены экспериментальные данные об эффективности соединений, обладающих антигликирующей активностью, для профилактики и лечения глазных осложнений сахарного диабета, чем и объясняется актуальность настоящего исследования.

Во второй главе диссертации представлены материалы и методы исследований, предложены лабораторные критерии и модели, позволяющие определить фармакологические эффекты исследуемых соединений и оценить риск развития нежелательных реакций.

В качестве потенциальных антигликирующих соединений были изучены 12 новых производных азоло[5,1-С]-1,2,4-триазина под лабораторными шифрами АВ (производные пиразоло[5,1-С]-1,2,4-триазина) и IS (производные триазоло[5,1-С]-1,2,4-триазина) (Рисунок 1), синтезированных в ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина» (г. Екатеринбург). В качестве вещества сравнения использовался аминокуганидин (Sigma-Aldrich, США).

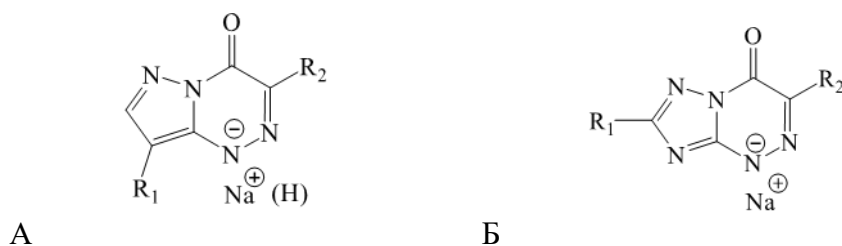


Рисунок 1 – Общая схема строения изучаемых соединений: А – соединения под лабораторным шифром АВ (производные пиразоло[5,1-С]-1,2,4-триазина); Б – соединения под лабораторным шифром IS (производные триазоло[5,1-С]-1,2,4-триазина)

Скрининг среди новых производных азоло[5,1-С]-1,2,4-триазина в концентрации 10^{-3} М проводили по методу А. Jedsadayanmata (2005). Спектрофлуориметрически оценивалась способность веществ снижать флуоресценцию гликированного бычьего сывороточного альбумина. Для наиболее перспективного соединения были исследованы концентрационная зависимость антигликирующей активности и рассчитан показатель IC_{50} . Изучена взаимосвязь химической структуры и антигликирующей активности для исследуемых производных

азоло[5,1-С]-1,2,4-триазина. В качестве показателя широты терапевтического действия использовали условный терапевтический индекс (УТИ), который рассчитывался как отношение величины LD_{50} (показателя острой токсичности, или средней летальной дозы) к IC_{50} (ингибирующей концентрации, или концентрации полумаксимального ингибирования).

Изучение нейротоксикологического профиля соединения АВ-19 проводилось по модифицированной методике S. Irwin (Ковалев Д. Г., Бугаева Л. И., Озеров А. А., 2010).

Специфическую фармакологическую активность соединения АВ-19 и его влияние на измененные структуры и функции глаза изучали на модели экспериментального сахарного диабета 1 типа (Wei M., Ong L., Smith M.T. [et al.], 2003). Экспериментальный СД вызывали внутривенным введением стрептозотоцина крысам в дозе 45 мг/кг. В экспериментальные группы с СД, индуцированным стрептозотоцином, включали животных с уровнем глюкозы в крови >15 ммоль/л. Соединение АВ-19 изучалось в эффективной дозе 20 мг/кг, аминогуанидин вводили в дозе 50 мг/кг. У лабораторных животных по ходу эксперимента измерялись уровни глюкозы и гликированного гемоглобина (HbA1c) в крови. Измерение внутриглазного давления (ВГД) проводили с помощью офтальмологического ветеринарного тонометра Tonovet (Icare, Финляндия). Для прижизненного исследования хрусталиков лабораторных животных проводили осмотр глаз крыс, биомикроскопию на портативной щелевой лампе Digital hand-held slit lamp (США). С целью оценки степени помутнения хрусталиков использовали модифицированную классификацию Suryanarayana et al. (2005). Измерение уровня глазной микроциркуляции с помощью лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) и исследование биоэлектрической активности сетчатки методом электроретинографии (ЭРГ) осуществляли с использованием программно-аппаратного комплекса Biopac-systems MP-150 (США). Для оценки степени развития функциональных повреждений сетчатки высчитывали соотношение амплитуд b- и a-волн электроретинограммы – интегральный индекс b/a. После эвтаназии лабораторных животных проводилось патоморфологическое исследование хрусталиков. В целях оценки степени катаракты использовали самостоятельно разработанную балльную систему. Для определения морфометрического показателя ретинальных структурных изменений рассчитывалась линейная клеточная плотность (ЛКП) ганглиозного слоя сетчатки крыс как количество ядер клеток ганглиозного слоя сетчатки на 100 мкм (ядер/100 мкм) в поле зрения. Определение общего содержания конечных продуктов гликирования (КПГ) и карбоксиметиллизина (КМЛ) в хрусталиках проводили в соответствии с методом Nakayama H., Mitsuhashi T., Kuwajima S. et al. Количество КПГ и КМЛ в супернатантах измеряли иммуноферментным методом с помощью коммерческого набора ELISA Kit for Advanced glycation endproducts (Cloud Clone, Китай). Деформируемость эритроцитов крови оценивали по индексу элонгации при фиксированном напряжении сдвига в проточной микрокамере.

Изображение эритроцитов анализировали в программе Photoshop, где определяли длину и ширину деформированных клеток (около 100) и рассчитывали индекс удлинения как показатель деформации: $IYЭ = (L-W)/(L+W)$, где L – длина деформированной клетки, W – ее ширина (Муравьев А. В., 2003). Местнораздражающее действие соединения АВ-19 оценивали в дозах, эквивалентных поступающим в организм животного при ЭД₅₀ или 10-кратной ЭД₅₀ (соответственно, 0,2 % и 2 % суспензий) с помощью конъюнктивной пробы при однократном введении на морских свинках. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием табличного редактора Microsoft Excel 2013 и программы GraphPad Prism 5,0 (США). Соответствие полученной выборки нормальному распределению данных осуществляли с применением теста Колмогорова – Смирнова. Сравнение двух независимых выборок проводили с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрического U-критерия Манна – Уитни с поправкой Бонферрони. Гипотезу о существовании различий между выборками принимали при уровне $p < 0,05$.

В третьей главе представлены результаты скрининга, проведенного среди производных азоло[5,1-С]-1,2,4-триазина. Наибольшую антигликирующую способность проявило соединение с лабораторным шифром АВ-19 (натриевая соль диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропирозололо[5,1с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрат) (Рисунок 2). Было получено снижение уровня флуоресценции гликированного бычьего сывороточного

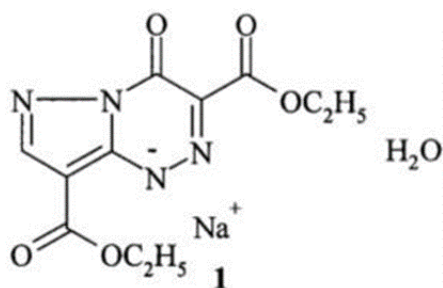


Рисунок 2 – Химическое строение соединения АВ-19

альбумина на 88,76 % у соединения АВ-19 против 57,83 % у аминокуанидина при концентрации антигликирующих соединений 10^{-3} М. Для соединения АВ-19 и препарата сравнения были исследованы концентрационные зависимости антигликирующей активности, также вычислены показатели IC₅₀ (Таблица 1). Таким образом, соединение АВ-19 по величине IC₅₀ в 14 раз превосходит аминокуанидин.

Соединение АВ-19 оказалось менее токсичным в сравнении с аминокуанидином и имеет LD₅₀ в 3,3 раза меньше, чем препарат сравнения. Кроме того, по широте терапевтического действия соединение АВ-19 в 4,27 раза превосходит препарат аминокуанидин, клинические испытания которого были остановлены из-за ряда побочных эффектов (Таблица 1).

Подструктурный анализ влияния типа ядра показал, что более выраженными антигликирующими свойствами обладает ряд пиразолотриазинов. Наличие этокарбоксильного заместителя в положениях С³ и С⁸ в структуре соединения АВ-19 делает его лидером по антигликирующей активности среди изучаемых производных. Замена этокарбоксильного

радикала на иной заместитель в любом из названных положений атома углерода в гетероцикле приводит к снижению антигликирующей активности соединения.

Таблица 1 – Показатели острой токсичности (LD_{50}), ингибирующей концентрации (IC_{50}) и условного терапевтического индекса (УТИ) соединения АВ-19 и аминогуанидина

Шифр	IC_{50} , mM	LD_{50} , mM	LD_{50} , мг/кг	УТИ
АВ-19	0,05396	1,534	518,412	28,42
Аминогуанидин	0,765	5,089	562,566	6,65

В четвертой главе представлены данные по изучению влияния соединения АВ-19 на измененные структуры и функции глаз при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете.

Уровень гликемии у лабораторных животных из контрольной группы СД уже на третий день после введения стрептозотоцина превышал 20 ммоль/л и оставался достоверно высоким, превосходя аналогичный показатель у интактных крыс (Таблица 2). В группах животных, получавших аминогуанидин и соединение АВ-19, уровень глюкозы на протяжении эксперимента также сохранялся достоверно высоким по сравнению с группой интактного контроля. У животных с СД из группы контроля к концу 3 мес. исследования уровень HbA1c в крови оказался повышен и статистически значимо ($p < 0,05$) превышал соответствующий уровень HbA1c у крыс из группы интактного контроля в 2,38 раза (Таблица 3). Соединение АВ-19 приводило к достоверному снижению данного показателя.

Таблица 2 – Влияние соединения АВ-19 и аминогуанидина на содержание глюкозы крови у крыс через 1, 2 и 3 мес. после развития экспериментального сахарного диабета ($M \pm m$, $n=15$)

Группа	1 мес.	2 мес.	3 мес.
Контрольная группа № 1 (интактные)	$5,55 \pm 0,15$	$5,02 \pm 0,28$	$3,90 \pm 0,08$
Контрольная группа № 2 (сахарный диабет)	$24,35 \pm 1,33^*$	$23,15 \pm 2,10^*$	$18,15 \pm 0,53^*$
Опытная группа № 1 (сахарный диабет + АВ-19 в дозе 20 мг/кг)	$27,25 \pm 1,98^*$	$19,36 \pm 2,22^*$	$18,77 \pm 0,84$
Опытная группа № 2 (сахарный диабет + аминогуанидин в дозе 50 мг/кг)	$22,26 \pm 2,66^*$	$19,13 \pm 1,57^*$	$18,24 \pm 0,79^*$

Примечания: $M \pm m$ – среднее арифметическое значение и стандартная ошибка среднего арифметического; * – $p < 0,05$ по сравнению с результатами, полученными у животных из группы интактного контроля (U-критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони).

Согласно биомикроофтальмоскопическому исследованию к моменту завершения эксперимента (90 день) у крыс из контрольной группы сахарного диабета (контрольная группа № 2) появились помутнения как в кортикальных, так и в ядерных слоях хрусталиков,

соответствующие 2,3 балла по используемой шкале, что достоверно отличалось от показателей контрольной группы № 1 (интактные животные).

Таблица 3 – Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на содержание гликированного гемоглобина у крыс через 3 мес. после развития экспериментального сахарного диабета ($M \pm m$, $n=15$)

Группа	HbA1c, %
Контрольная группа № 1 (интактные)	$6,35 \pm 0,32$
Контрольная группа № 2 (сахарный диабет)	$15,11 \pm 0,93^*$
Опытная группа № 1 (сахарный диабет + АВ-19 в дозе 20 мг/кг)	$12,56 \pm 1,25^*$
Опытная группа № 2 (сахарный диабет + амингуанидин в дозе 50 мг/кг)	$12,92 \pm 1,47^*$

Примечания: HbA1c – гликированный гемоглобин; $M \pm m$ – среднее арифметическое значение и стандартная ошибка среднего арифметического; * – $p < 0,05$ по сравнению с результатами, полученными у лабораторных животных из группы интактного контроля (U-критерий Манна – Уитни с поправкой Бонферрони).

В то же время и амингуанидин, и соединение АВ-19 явно замедляли диабетический катарактогенез у лабораторных животных (помутнения в хрусталиках достигали лишь 0,7 и 0,6 балла соответственно), что статистически значимо отличается от степени развития катаракты у крыс из контрольной группы сахарного диабета ($p \leq 0,05$).

Данные биомикроскопии хрусталиков соответствовали патогистологической картине у лабораторных животных в рамках эксперимента: у интактных крыс отсутствовали какие-либо изменения структуры хрусталика (0 баллов по используемой шкале), у диабетических животных из контрольной группы № 2 присутствовали прогрессирующие патоморфологические признаки дегенерации, главным образом эпителиальных клеток передней капсулы хрусталика (ЭКХ), а также хрусталиковых волокон (Рисунок 3). Данные изменения вещества хрусталика оценивались в 2 балла по разработанной шкале оценки степени развития катаракты. Ингибирующее влияние амингуанидина и соединения АВ-19 (1,4 и 1,75 балла соответственно) на формирование диабетической катаракты также было выявлено в ходе патоморфологического исследования, однако, в отличие от данных биомикроофтальмоскопии, разница не была статистически значима в сравнении с группой контроля сахарного диабета.

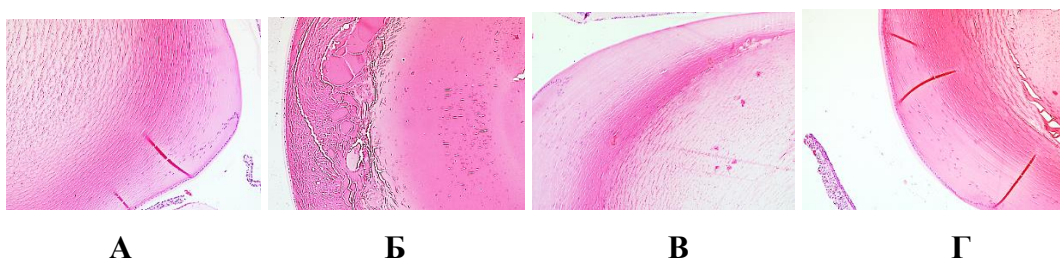


Рисунок 3 – Гистологическое строение хрусталиков лабораторных животных: Окраска гематоксилином-эозином-флоксином. Увеличение $\times 100$.

А. Хрусталик intactной крысы. Нормальное гистологическое строение.

Б. Хрусталик крысы с стрептозотозин-индуцированным сахарным диабетом.

В. Хрусталик крысы со стрептозотозин-индуцированным сахарным диабетом, которой вводился амингуанидин в дозе 50 мг/кг 3 мес.

Г. Хрусталик крысы со стрептозотозин-индуцированным сахарным диабетом, которой вводилось соединение АВ-19 в дозе 20 мг/кг 3 мес. Нормальное строение хрусталиковых волокон.

По результатам иммуноферментного анализа у крыс из группы сахарного диабета было обнаружено достоверное повышение содержания КПП в хрусталиках в сравнении с intactными животными (546,22 мкг/кг против 280 мкг/кг соответственно) (Таблица 4). Отдельно исследовалось содержание карбоксиметиллизина (КМЛ) в хрусталиках, как одного из основных КПП, накапливающихся в хрусталиках при формировании диабетической катаракты. Результаты также показывают избыточное накопление КМЛ в хрусталиках при стрептозотозин-индуцированном диабете (2,56 мкг/кг в контрольной группе № 2 против 1,62 мкг/кг в контрольной группе № 1). Амингуанидин приводил к снижению накопления в хрусталиках диабетических крыс, как КПП на 39 %, так и КМЛ на 31,3 % по сравнению с животными из контрольной группы № 2 (сахарный диабет). Однако влияние соединения АВ-19 было более выраженным: содержание КПП в хрусталиках было ниже на 47,9 %, а КМЛ – на 47,7 % по сравнению с крысами из группы контроля сахарного диабета.

Таблица 4 – Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на содержание конечных продуктов гликирования (КПП) и карбоксиметиллизина (КМЛ) в хрусталиках животных при стрептозотозин-индуцированном сахарным диабетом ($M \pm m$, $n=15$)

Группы	КПП, мкг/мг белка	КМЛ, мкг/мг белка
Контрольная группа № 1 (intactные)	280,32 \pm 43,4	1,92 \pm 0,11
Контрольная группа № 2 (контроль сахарный диабет)	546,22 \pm 20,23 [#]	2,56 \pm 0,20 [#]
Опытная группа № 1 (сахарный диабет + АВ-19 в дозе 20 мг/кг)	284,42 \pm 31,84*	1,34 \pm 0,12*
Опытная группа № 2 (сахарный диабет + амингуанидин в дозе 50 мг/кг)	333,32 \pm 60,99*	1,76 \pm 0,27*

Примечание: # – значения статистически значимо отличаются от показателей контрольной группы № 1 при $p < 0,05$; t-критерий Стьюдента; * – значения статистически значимо отличаются от показателей контрольной группы № 2 при $p < 0,05$; t-критерий Стьюдента.

Причем ингибирующее влияние обоих антигликирующих соединений на повышение образования КПП и КМЛ в хрусталиках было статистически значимым (при $p < 0,05$). Таким образом, объективные экспериментальные данные, полученные с помощью как клинического метода диагностики, так и лабораторных методов исследования хрусталика, продемонстрировали антикатарактальный эффект изучаемого производного пиразолотриазина и препарата сравнения. Соединение АВ-19 в эксперименте *in vitro* показало более высокую антигликирующую активность, чем аминогуанидин.

Параллельно с исследованием хрусталика изучалось влияние соединения АВ-19 на изменения структуры и функции сетчатки в условиях экспериментального диабета. Функциональные методы исследования и патоморфологическое изучение микропрепаратов сетчатки позволили многосторонне проанализировать влияние соединения АВ-19 и препарата сравнения на развитие диабетической ретинопатии (ДР). Проведенная в рамках экспериментальной части лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ) дает возможность исследовать микрогемоперфузию зондируемого отрезка конъюнктивы, склеры, периферических отделов сетчатки и хориоидеи. У крыс из контрольной группы сахарного диабета было выявлено снижение на 40,5 % уровня глазной микроциркуляции по сравнению с интактными животными (при $p < 0,05$) (Таблица 5). Оба антигликирующих соединения положительно влияли на уровень перфузии ишемизированных тканей у диабетических животных: наблюдалось повышение уровня глазной микроциркуляции на 20,4 % у крыс, получавших аминогуанидин, и на 26,9 % у крыс, получавших соединение АВ-19, по сравнению с животными из контрольной группы сахарного диабета.

Таблица 5 – Влияние соединения АВ-19 и аминогуанидина на уровень глазной микроциркуляции при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете ($M \pm m$; $n=15$), п.е.

Экспериментальные группы	Уровень микроциркуляции, п.е.
Контрольная группа № 1 (интактные)	2478,0 \pm 154,9
Контрольная группа № 2 (сахарный диабет)	1473,4 \pm 141,6 [#]
Опытная группа № 1 (сахарный диабет + АВ-19 в дозе 20 мг/кг)	1870,0 \pm 72,9 [*]
Опытная группа № 2 (сахарный диабет + аминогуанидин в дозе 50мг/кг)	1774,4 \pm 136,8

Примечание: # – значения статистически значимо отличаются от показателей контрольной группы № 1 при $p < 0,05$; t-критерий Стьюдента; * – значения статистически значимо отличаются от показателей контрольной группы № 2 при $p < 0,05$; t-критерий Стьюдента.

Нейродегенерация фоторецепторов является неотъемлемым компонентом патогенеза ДР и проявляется снижением амплитуды а-волны электроретинограммы. Поражение глиальных элементов сетчатки и нейродегенерация биполярных клеток приводят к снижению амплитуды b-волны электроретинограммы. В итоге ЭРГ-индекс b/a служит результирующим показателем, отражающим электрогенез сетчатки в целом. По результатам проведенной скотопической электроретинографии (ЭРГ) было выявлено снижение значения индекса b/a у лабораторных животных из контрольной группы № 2 (сахарный диабет) более чем в 2 раза относительно данного показателя у интактных крыс (0,27 против 0,57 соответственно при $p < 0,05$), что показывает снижение биоэлектрической активности сетчатки при сахарном диабете согласно опубликованным данным. Однако у диабетических крыс, получавших аминоксантидин, наблюдалось повышение индекса b/a на 74 % по сравнению с крысами из группы контроля сахарного диабета. В то же время у животных, получавших соединение АВ-19, повышение индекса b/a составило 100 % (при $p < 0,05$) по сравнению с контрольными животными из группы сахарного диабета, фактически достигая значения индекса b/a у интактных животных. Следовательно, оба антигликирующие соединения, позитивно влияя на функциональные изменения при гипергликемии – показатели электрофизиологического ответа сетчатки и глазной гемомикроперфузии, продемонстрировали нейроретинопротективные свойства при некомпенсированном сахарном диабете.

В настоящей работе были изучены и морфологические аспекты нейродегенерации сетчатки, а именно линейная клеточная плотность ядер ганглиозного слоя сетчатки (ЛКП). Так, у крыс из контрольной группы № 2 отмечалось достоверное снижение ЛКП ганглиозного слоя на 22,2% (при $p < 0,05$) по сравнению с интактными животными, аналогичные изменения наблюдались и у диабетических животных, получавших препарат сравнения (Таблица 6).

Таблица 6 – Линейная клеточная плотность ганглиозного слоя сетчатки крыс при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете и его фармакологической коррекции, Ме (Q1-Q3)

Параметр	Контрольная группа № 1 (интактные)	Контрольная группа № 2 (сахарный диабет)	Опытная группа № 1 (сахарный диабет+АВ-19 в дозе 50 мг/кг)	Опытная группа № 2 (сахарный диабет+аминоксантидин в дозе 50 мг/кг)
ЛКП, ядер/100 мкм	9,0 (8,0–10,0)	7,0 (6,0–8,0)*	9,0 (8,0–11,0) [#]	7,0 (6,0-7,0)*
%, по сравнению с контрольной группой № 1		-22,2 %	0 %	-22,2 %

% , по сравнению с контрольной группой № 2			+28,6 %	0 %
--	--	--	---------	-----

Примечания: ЛКП – линейная клеточная плотность ганглиозных клеток сетчатки; * – различия достоверны по сравнению с контрольной группой № 1 при $p < 0,05$, U-критерий Манна – Уитни; # – различия достоверны по сравнению контрольной группой № 2 с СД при $p < 0,05$, U-критерий Манна – Уитни.

Соединение АВ-19 способствовало сохранению количества ганглиозных клеток на уровне контрольной группы № 1 (интактные), минимизируя обусловленные апоптозом изменения в сетчатке при сахарном диабете.

В данном эксперименте у крыс из контрольной группы сахарного диабета наблюдалось достоверное повышение ВГД в среднем на 4,3 мм рт. ст. (при $p < 0,05$) по сравнению с интактными животными (Таблица 7). У животных, получавших амингуанидин, уровень ВГД не отличался от показателей животных из контрольной группы № 2. Однако соединение АВ-19 проявило офтальмогипотензивный эффект, возвращая уровень ВГД у диабетических крыс до показателей контрольной группы № 1 (интактные). Предположительно, данный результат связан с более выраженными антигликирующими свойствами соединения АВ-19 по сравнению с амингуанидином, выявленными *in vitro*.

Таблица 7 – Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на уровень внутриглазного давления (ВГД) при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете ($M \pm m$, $n=15$)

Группы	ВГД, мм рт. ст.
Контрольная группа № 1 (интактные)	11,6 \pm 0,87
Контрольная группа № 2 (сахарный диабет)	15,9 \pm 0,85*
Опытная группа № 1 (сахарный диабет + АВ-19 в дозе 20 мг/кг)	11,1 \pm 0,94#
Опытная группа № 2 (сахарный диабет + амингуанидин в дозе 50 мг/кг)	13,8 \pm 1,19

Примечание: * – показатели статистически значимо отличаются от контрольной группы № 1 при $p < 0,05$; t-критерий Стьюдента; # – показатели статистически значимо отличаются от контрольной группы № 2 при $p < 0,05$; t-критерий Стьюдента.

В пятой главе было изучено влияние производного пиразолотриазина на деформируемость эритроцитов при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете и эритроцитов, обработанных активным гликирующим интермедиатом – глиоксалем для моделирования реакции Майяра *in vitro*. У крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом наблюдалось снижение индекса удлинения эритроцитов (ИУЭ) на 18 % (при $p < 0,05$) (Таблица 8). Соединение АВ-19 в дозе 20 мг/кг статистически значимо ($p < 0,05$) увеличивало

степень деформируемости эритроцитов на 8 % по сравнению с результатами, полученными у крыс с СД из группы контроля, в то же время величина аналогичного эффекта амингуанидина составила 11 %.

В эксперименте *in vitro* при инкубации эритроцитов с глиоксалем гемореологический эффект обоих соединений был еще более выражен и носил дозозависимый характер (Рисунок 4). Таким образом, соединения, обладающие доказанной антигликирующей активностью, проявили способность улучшать деформируемость эритроцитов в условиях интенсифицированной реакции неферментативного гликирования.

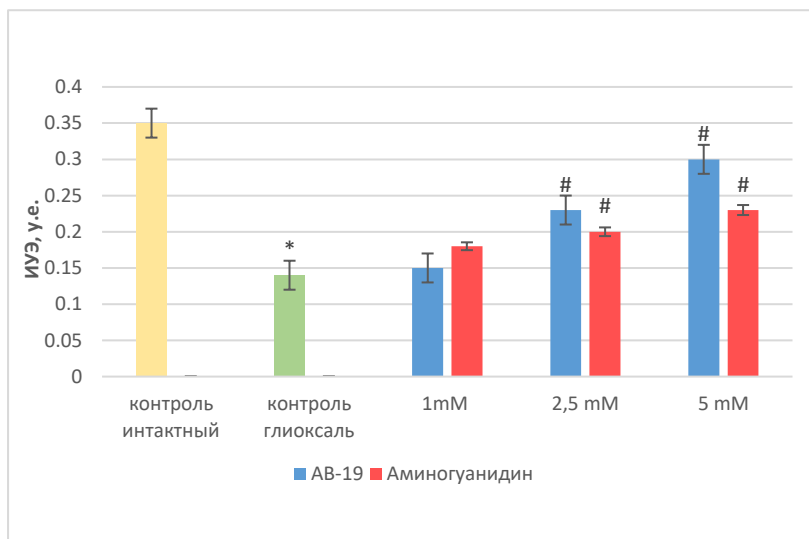


Рисунок 4 – Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина в концентрациях 1, 2,5 или 5 мМ на деформируемость эритроцитов, обработанных глиоксалем *in vitro*.

Примечания: ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; у.е. – условные единицы; * – $p < 0,05$ по сравнению с результатами, полученными в контроле (U-критерий Манна – Уитни); # – $p < 0,05$ по сравнению с результатами, полученными в контроле с глиоксалем (критерий Манна – Уитни).

Таблица 8 – Влияние соединения АВ-19 и амингуанидина на деформируемость эритроцитов крыс со стрептозотоцин-индуцированным СД ($M \pm m$), у.е.

Группа	ИУЭ, у.е.
Интakтный контроль	$0,33 \pm 0,01$
СД контроль	$0,27 \pm 0,01^*$
СД + АВ-19 в дозе 20 мг/кг	$0,29 \pm 0,02^*$
СД + амингуанидин в дозе 50 мг/кг	$0,30 \pm 0,04$

Примечания: СД – сахарный диабет; ИУЭ – индекс удлинения эритроцитов; у.е. – условные единицы; $M \pm m$ – среднее арифметическое значение и стандартная ошибка среднего арифметического; * – $p < 0,05$ по сравнению с результатами, полученными у животных из группы интактного контроля (непараметрический критерий Манна – Уитни); * – $p < 0,05$ по сравнению с результатами, полученными у животных из группы контроля СД (U-критерий Манна – Уитни).

В шестой главе представлены данные, которые доказывают отсутствие у соединения АВ-19 местнораздражающего действия при проведении высокочувствительной конъюнктивальной пробы как при использовании 0,2 %, так и 2 % суспензии. Однако требуется дальнейшее изучение местной фармакокинетики соединения АВ-19, его способности проникать через роговицу и склеру для достижения терапевтической концентрации во внутриглазной жидкости и витреальной полости. В седьмой главе показано, что для нейротоксикологических свойств соединения АВ-19 характерна дозозависимая активность, и для изучаемого соединения обозначена минимальная токсическая доза $400 \text{ мг/кг} \leq \text{ТД}_{\text{мин}} \leq 1000 \text{ мг/кг}$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате эксперимента было определено, что соединение АВ-19 проявило наибольшую антигликирующую активность в ряду родственных производных пиразолотриазина, что объясняется наличием этокарбоксильного заместителя в положениях С³ и С⁸. Получено снижение уровня флуоресценции гликированного БСА (бычьего сывороточного альбумина) на 88,76 % у соединения АВ-19 против 57,83 % у аминогуанидина при концентрации антигликирующих соединений 10^{-3} М. По данным биомикроофтальмоскопии, соединение АВ-19 статистически значимо замедляет катарактогенез в сравнении с крысами из контрольной группы сахарного диабета. Ингибирующее влияние соединения АВ-19 на формирование диабетической катаракты было выявлено в ходе патоморфологического исследования. По данным ИФА, соединение АВ-19 приводит к снижению образования КПП в хрусталиках диабетических животных: содержание КПП в хрусталиках было ниже на 47,9 %, а КМЛ – на 47,7 % по сравнению с крысами из группы контроля сахарного диабета (при $p < 0,05$). Уровень глазной микрогемоперфузии возрастал на 26,9 % у крыс, получавших соединение АВ-19, по сравнению с животными из контрольной группы сахарного диабета. По данным ЭРГ, у животных, получавших соединение АВ-19, наблюдается нормализация биоэлектрической активности сетчатки. Нейроморфометрический анализ показал, что соединение АВ-19 способствует сохранению количества ганглиозных клеток сетчатки у диабетических крыс на уровне интактных животных. Данное соединение снижает повышенный уровень ВГД у диабетических до показателей нормы, оказалось гемореологически активным и повышает ИУЭ в эксперименте как *in vivo*, так *in vitro*. В результате изучения нейротоксикологического профиля соединения АВ-19 выявлено, что для него характерно низкое токсическое действие в отношении поведения животных. При проведении конъюнктивальной пробы было определено отсутствие местнораздражающего действия для изучаемого соединения.

ВЫВОДЫ

1. Производные азоло[5,*I*-с]-1,2,4-триазины являются перспективным классом для поиска антигликирующих соединений (пиразоло[5,*I*-с]-1,2,4-триазины и триазоло[5,*I*-с]-1,2,4-триазины). Наибольшей антигликирующей активностью обладают производные пиразоло[5,*I*-с]-1,2,4-триазины.

2. Большой вклад в проявление антигликирующей активности вносит наличие этоксикарбонильного заместителя в положениях С³ и С⁸. Замена этокарбонильной группы в положениях С³ и С⁸ на карбонильную, или в положении С³ на нитрогруппу, или в положении С⁸ на цианогруппу либо этинильный радикал приводит к снижению антигликирующей активности. При этом аминогруппа в положении С³ приводит к инверсии антигликирующего эффекта.

3. По антигликирующей активности натриевая соль диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,*l*-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрата (соединение АВ-19) в 14 раз превосходит аминогуанидин, также соединение АВ-19 в 3,31 раза менее токсично, чем аминогуанидин, и превосходит последний по величине условного терапевтического индекса в 4,27 раза.

4. Соединение АВ-19 после внутрижелудочного введения в течение трех месяцев в дозе 20 мг/кг крысам со стрептозотоцин-индуцированным СД продемонстрировало тенденцию к задержке образования помутнения в хрусталиках и снизило внутриглазное давление на 70 % ($p < 0,05$) по сравнению с диабетическими животными без лечения.

5. Соединение АВ-19 уменьшало содержание в хрусталиках конечных продуктов гликирования и карбоксиметиллизина на 52 % ($p \leq 0,05$) и демонстрировало тенденцию к снижению выраженности морфологических признаков патологии хрусталика у крыс с экспериментальным сахарным диабетом по сравнению с диабетическими животными без лечения.

6. Соединение АВ-19 способствовало повышению уровня глазной гемомикроциркуляции на 20,4 % ($p < 0,05$), а также нормализовало биоэлектрическую активность сетчатки по сравнению с лабораторными животными из контрольной группы сахарного диабета, повышая значения результирующего ЭРГ-индекса b/a в 2 раза ($p < 0,05$).

7. Соединение АВ-19 достоверно способствовало сохранению количества ганглиозных клеток сетчатки у диабетических крыс на уровне интактных животных ($p < 0,05$), минимизируя морфологические проявления нейродегенерации при диабетической ретинопатии.

8. Соединение АВ-19 повышало индекс деформируемости эритроцитов *in vivo* на 8 % ($p < 0,05$) у животных со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом; также

увеличивало индекс деформируемости эритроцитов, обработанных глиоксалем на 53,3 % ($p < 0,05$) *in vitro*, при исследуемой концентрации соединения 5mM.

9. Соединение АВ-19 не обладает местнораздражающим действием на конъюнктиву глаза крысы в концентрациях 0,2 % и 2 % ($p < 0,05$).

10. Для соединения АВ-19 характерно низкое токсическое действие в отношении поведения животных при многотестовом наблюдении по S. Irwin. Минимальная токсическая доза (ТД_{мин}) для АВ-19 при внутрижелудочном введении составляет $400 \text{ мг/кг} < \text{ТД}_{\text{мин}} \leq 1000 \text{ мг/кг}$.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Целесообразным является проведение дальнейшего синтеза соединений на основе производных пиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазина, имеющих этоксикарбонильный заместитель в положениях С³ и С⁸, для оптимизации химических структур и разработки на их основе новых высокоэффективных антигликирующих средств.

2. Созданная методология изучения офтальмофармакологических эффектов соединений с антигликирующей активностью может быть использована при направленном поиске и доклиническом исследовании новых антигликирующих веществ.

3. Соединение АВ-19 (натриевая соль диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрата) проявляет высокую антигликирующую активность и является перспективной субстанцией для дальнейшего расширенного доклинического изучения ее специфических фармакологических эффектов для коррекции глазных осложнений сахарного диабета.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВГД – внутриглазное давление
 ДР – диабетическая ретинопатия
 КМЛ – карбоксиметиллизин
 КППГ – конечные продукты гликирования
 ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия
 ЛКП – линейная клеточная плотность
 рКППГ – рецепторы конечных продуктов гликирования
 СД – сахарный диабет
 ЭРГ – электроретинография
 HbA1c – гликированный гемоглобин

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации

1. **Говорова Ю. А.** Влияние аминогуанидина на катарактогенез в условиях экспериментального сахарного диабета / А. А. Спасов, Ю. А. Говорова, Л. В. Наumenко [и др.] // **Российский медицинский журнал**. – 2019. – Т. 25. – № 5–6. – С. 303–308. – DOI 10.18821/0869-2106-2019-25-5-6-303-308. [Scopus].
2. **Говорова Ю. А.** Влияние производного пиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазинана катарактогенез при экспериментальном сахарном диабете / А. А. Спасов, Л. В. Наumenко, Ю. А. Говорова [и др.] // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. – 2021. – Т. 84. – № 5. – С. 27–31. – DOI 10.30906/0869-2092-2021-84-5-27-31. [Scopus].
3. **Говорова Ю. А.** Основы диабетического катарактогенеза и перспективные пути его фармакологической коррекции / А. А. Спасов, Л. В. Наumenко, Ю. А. Говорова // **Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal)**. – 2021. – Т. 6. – № 2. – С. 114–125. – DOI 10.29413/ABS.2021-6.2.13. [Scopus].
4. **Говорова Ю. А.** Влияние производных хиназолина – блокаторов Na⁺/H⁺ обменника на внутриглазное давление / Л. В. Наumenко, А. С. Таран, Е. В. Соколова, Ю. А. Говорова, А. А. Озеров // **Бюллетень медицинской науки**. – 2021. – № 3 (23). – С. 79–82. – DOI 10.31684/25418475_2021_3_79.

Патент

5. Патент № 2765117 С2 Российская Федерация, МПК А61К 31/53, А61Р 9/10, А61Р 13/12. Применение натриевой соли диэтилового эфира 4-оксо-1,4-дигидропиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-3,8-дикарбоновой кислоты, моногидрата в качестве средства лечения и профилактики поздних осложнений сахарного диабета: № 2019130147: заявл. 24.09.2019: опубл. 25.01.2022 / В. А. Бабкова, Ю. А. Говорова, Н. А. Гурова [и др.]; заявитель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций

6. **Говорова Ю. А.** Влияние антигликирующих соединений на внутриглазное давление и изменение прозрачности хрусталика глаза у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом / Л. В. Наumenко, Ю. А. Говорова, В. А. Кузнецова, Е. В. Соколова,

Ю. Г. Штырлин, А. Д. Стрельник. – V съезд фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств». – М.: Фолиум, 2018. – С. 172.

7. **Говорова Ю. А.** Влияние лекарственной формы соединения АВ-19 на уровень внутриглазного давления и изменение прозрачности хрусталика при курсовом введении при экспериментальном сахарном диабете / Ю. А. Говорова, Е. В. Андреева // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: материалы 77-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов. – 2019. – С. 364–365.

8. **Говорова Ю. А.** Оценка антигликирующего действия пиридиновых производных бензойной кислоты / Ю. А. Говорова, А. Е. Батычёр, Д. Д. Шамшина // XXIII региональная конференция молодых исследователей Волгоградской области. Направления: 18. Актуальные проблемы экспериментальной медицины, 19. Клинические аспекты медицины, 20. Фармакология и фармация. – 2018. – С. 134–136.

9. **Говорова Ю. А.** Влияние соединения АВ-19 на внутриглазное давление и изменение прозрачности хрусталика глаза у крыс со стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом / М. В. Буняков, Ю. А. Говорова // Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А. А. Никулина «Достижения современной фармакологической науки»; под ред. Е. Н. Якушевой. – 2018. – С. 24–25.

10. **Говорова Ю. А.** Влияние нового антигликирующего производного пиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазина на деформируемость эритроцитов в условиях экспериментального сахарного диабета / Ю. А. Говорова, Л. В. Наumenко, А. С. Таран // Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования: сб. ст. по материалам XLV Международной научно-практической конференции «Современная медицина: новые подходы и актуальные исследования». – № 2 (41). – М.: Интернаука, 2021. – С. 76–79.

11. **Говорова Ю. А.** Влияние производного пиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазина на деформируемость эритроцитов, обработанных глиоксалем / Ю. А. Говорова, А. С. Таран, К. А. Гайдукова // СОБА-2021: материалы XV Международной научно-практической конференции молодых ученых (26 марта 2021 г.). – Курск: Изд-во КГМУ, 2021. – 1 электрон. опт. диск (CD-ROM). – 3,1 Мб.

12. **Говорова Ю. А.** Влияние липоевой кислоты на уровень внутриглазного давления при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете / Ю. А. Говорова, Р. А. Литвинов, А. С. Таран // Новые технологии в офтальмологии 2021: материалы Республиканской научно-практической конференции, 16–17 апреля 2021 г.; под ред. Д. К. Хусаиновой, Э. А. Абдулаевой. – Казань: Медицина, 2021. – С. 46–50.

ГОВОРОВА ЮЛИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**Антигликирующие свойства
производных пиразоло[5,1-с]-1,2,4-триазина и их влияние
на отдаленные нарушения структуры и функции глаза
при экспериментальном сахарном диабете**

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук