



(51) МПК  
*G09B 23/28* (2006.01)  
*A61K 31/40* (2006.01)  
*A61K 31/4164* (2006.01)  
*A61P 3/10* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*G09B 23/28* (2013.01); *A61K 31/40* (2013.01); *A61K 31/4164* (2013.01)

(21)(22) Заявка: 2018109513, 19.03.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 19.03.2018

Дата регистрации:  
 17.05.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.03.2018

(45) Опубликовано: 17.05.2019 Бюл. № 14

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.  
 Победы, 85, НИУ "БелГУ, Цуриковой Н.Д.

(72) Автор(ы):

Корокин Михаил Викторович (RU),  
 Покровский Михаил Владимирович (RU),  
 Покровская Татьяна Григорьевна (RU),  
 Корокина Лилия Викторовна (RU),  
 Пересыпкина Анна Александровна (RU),  
 Гудырев Олег Сергеевич (RU),  
 Кочкарова Индира Султановна (RU),  
 Победа Анна Сергеевна (RU),  
 Автина Татьяна Валерьевна (RU),  
 Куликов Александр Леонидович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное  
 образовательное учреждение высшего  
 образования "Белгородский государственный  
 национальный исследовательский  
 университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: RU 2412714 C1, 27.02.2011. RU  
 2205826 C2, 10.06.2003. US 6057317 A,  
 02.05.2000. МАЯКОВ А.И. Исследование  
 эндотелиопротективных эффектов  
 метформина и пиоглитазона при  
 моделировании фруктоз- и стрептозотоцин-  
 индуцированного сахарного диабета на фоне  
 овариэктомии, автореферат диссертации на  
 соискание учёной степени кандидата  
 медицинских наук, Курск, (см. прод.)

(54) Способ коррекции стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс с использованием лекарственного средства на основе амида гетероциклических кислот

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и предназначено для коррекции сахарного диабета 2 типа в эксперименте. Проводят моделирование экспериментального сахарного диабета типа 2 путем внутрибрюшинного однократного введения стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг с предварительным, за 15 мин, однократным внутрибрюшинным введением никотинамида в

дозе 230 мг/кг, затем проводят коррекцию патологии путем внутрижелудочного введения амида 4-(4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)-1-метил-5-фенилпирролидин-2-карбоновой кислоты в дозе 8,6 мг/кг, начиная с 7 дня по 21 день включительно после введения стрептозотоцина. Способ позволяет значительно снижать концентрацию глюкозы в крови крыс и

уменьшать признаки повреждения диакамфом. 8 табл., 1 ил., 1 пр.  
поджелудочной железы по сравнению с терапией

(56) (продолжение):

2011, с. 2-13. **POKROVSKIJ M.V.** Study of Endothelial Protective Activity of Phenol-Derived Thrombin and Arginase-2 Inhibitors KUD-259 and KUD-974, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, August 2017, Volume 163, Issue 4, с. 436-438.

R U 2 6 8 7 9 7 9 C 1

R U 2 6 8 7 9 7 9 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*G09B 23/28* (2006.01)  
*A61K 31/40* (2006.01)  
*A61K 31/4164* (2006.01)  
*A61P 3/10* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*G09B 23/28 (2013.01); A61K 31/40 (2013.01); A61K 31/4164 (2013.01)*(21)(22) Application: **2018109513, 19.03.2018**(24) Effective date for property rights:  
**19.03.2018**Registration date:  
**17.05.2019**

Priority:

(22) Date of filing: **19.03.2018**(45) Date of publication: **17.05.2019** Bull. № 14

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.  
Pobedy, 85, NIU "BelGU, Tsurikovej N.D.**

(72) Inventor(s):

**Korokin Mikhail Viktorovich (RU),  
Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),  
Pokrovskaya Tatyana Grigorevna (RU),  
Korokina Liliya Viktorovna (RU),  
PeresyPKina Anna Aleksandrovna (RU),  
Gudyrev Oleg Sergeevich (RU),  
Kochkarova Indira Sultanovna (RU),  
Pobeda Anna Sergeevna (RU),  
Avtina Tatyana Valerevna (RU),  
Kulikov Aleksandr Leonidovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj  
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU  
"BelGU") (RU)**(54) **METHOD OF CORRECTION OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS IN RATS USING A HETEROCYCLIC AMIDE-BASED DRUG**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine and aims at correction of type 2 diabetes mellitus experimentally. Method includes simulating experimental type 2 diabetes mellitus by intraperitoneal single administration of streptozotocin in dose of 65 mg/kg with preliminary, within 15 minutes, single intraperitoneal introduction of nicotinamide in dose of 230 mg/kg, then pathology is corrected by intragastric

administration of 4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)-1-methyl-5-phenylpyrrolidine-2-carboxylic acid amide in dose of 8.6 mg/kg starting from 7<sup>th</sup> day to 21<sup>st</sup> day after introduction of streptozotocin.

EFFECT: method enables considerably reducing blood glucose concentration in rats and reducing the signs of pancreatic injury as compared to diacamp therapy.

1 cl, 8 tbl, 1 dwg, 1 ex

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии.

По известным литературным источникам – сахарный диабет (СД) является одной из актуальных медико-социальных проблем современного общества. Рост заболеваемости позволил говорить о глобальной эпидемии СД [Javeed N, Matveyenko AV. Circadian Etiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Physiology* (Bethesda). 2018;33(2):138-150. DOI: 10.1152/physiol.00003.2018; Schmidt AM. Highlighting Diabetes Mellitus: The Epidemic Continues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(1):e1-e8. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.310221]. Широкая распространенность СД и многообразие патогенетических вариантов данного заболевания обуславливают актуальность поиска и разработки новых пероральных противодиабетических препаратов.

Известны химические вещества органической природы, потенцирующие имидазолиновые рецепторы и повышающие чувствительность к инсулину [Su CH, Liu IM, Chung HH, Cheng JT. Activation of I2-imidazoline receptors by agmatine improved insulin sensitivity through two mechanisms in type-2 diabetic rats. *Neurosci Lett.* 2009;457(3):125-128] и восстанавливающие инсулинпродуцирующую функцию [Efendic S, Efanov AM, Berggren PO, Zaitsev SV. Two generations of insulinotropic imidazoline compounds. *Diabetes.* 2002;51 Suppl 3:S448-454].

В патенте AU 2004/200272 раскрываются соединения общей формулы 1, 2 и 3 с бис-арильным молекулярным каркасом, к которому ковалентно присоединены амидиновые функциональные группы, для которых постулируется способность связываться с имидазолиновыми рецепторами I и II типов *in vitro* и *in vivo*. Указанные соединения, в частности с общей структурной формулой 1, являются структурными аналогами пентамидина (1, R1=R2=R3=H; n=5), антимикробного лекарственного препарата.

Патент US 6,057,317 указывает на возможность применения соединений общей формулы 4 при гипертонических состояниях, вызванных различными патологиями, в том числе диабетом и ожирением. Для соединений 4 методом вытеснения тритий-меченных лигандов установлено связывание с имидазолиновыми рецепторами I и II типов в наномолярном диапазоне концентраций.

В патенте US 2011/0118289 методом конкурентного связывания с радиоактивно-меченым лигандом установлено взаимодействие соединений общей формулы 6 с имидазолиновыми рецепторами II типа. Для соединений 6 на животных моделях показаны антидепрессантная и противоболевая активности. Эти же соединения и указанная для них активность запатентованы в РФ (патент RU № 2472508).

В патенте WO 2016/105449 широкий круг лигандов имидазолиновых рецепторов I типа заявляется в качестве анальгетиков при болевых синдромах различной этиологии. Большая часть применяемых соединений относится к имидазолинам различного строения, в том числе к известным из научных информационных источников агонистам имидазолиновых рецепторов I и II типов.

Однако в приведенных патентных источниках нет данных об использовании агонистов имидазолиновых рецепторов I и II типов для лечения СД 2 типа, относящихся по химической структуре к амидам гетероциклических кислот.

Известно соединение ( $\pm$ )-цис-3-(2'-бензимидазол)-1,2,2-триметилциклопентанкарбоновая кислота, проявляющая сахароснижающее и антидиабетогенное действие (RU № 2205826, опубл. 10.06.2003). Данное соединение проявляет высокую сахароснижающую и антидиабетогенную активность и может быть использовано как сахароснижающее средство при манифестных формах СД 1 и 2 типа, а также как антидиабетогенное средство, которое предупреждает и/или ослабляет развитие инсулиновой недостаточности на ранних стадиях заболевания.

Действующим веществом препарата Диакамф (Diacamph) является ( $\pm$ )-цис-3-(2'-бензимидазолил)-1,2,2-триметилциклопентанкарбоновая кислота (<http://nuph.edu.ua/ru/diakamf-3/>). Это оригинальное антидиабетическое средство для лечения патологических состояний, связанных с инсулинорезистентностью (СД и его сосудистые осложнения и др.). Относится к агонистам I типа (центральных) и II типа (периферических) имидазолиновых рецепторов.

Недостатком данного решения является низкая терапевтическая эффективность препарата.

Задачей предлагаемого изобретения является создание более эффективного способа коррекции стрептозотоцин-индуцированного СД у крыс с использованием лекарственного средства на основе амида гетероциклических кислот.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ коррекции стрептозотоцин-индуцированного СД у крыс с использованием лекарственного средства на основе амида гетероциклических кислот, подтверждаемый более выраженным снижением концентрации глюкозы в крови крыс по сравнению с терапией диакамфом и статистически значимым улучшением показателей морфометрического и иммуногистохимического исследования поджелудочной железы, превосходящим значения в группе с терапией диакамфом.

Поставленная задача достигается тем, что предложен способ коррекции стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс с использованием лекарственного средства на основе амида гетероциклических кислот, включающий моделирование экспериментального сахарного диабета типа 2 путем внутрибрюшинного однократного введения стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг с предварительным, за 15 мин, однократным внутрибрюшинным введением никотинамида в дозе 230 мг/кг, затем коррекцию патологии путем внутривенного введения крысам препарата BSD24 в дозе 8,6 мг/кг, начиная с 7 дня по 21 день включительно после введения стрептозотоцина.

Основным преимуществом предлагаемого способа является то, что введение лекарственного средства на основе амида гетероциклических кислот под лабораторным шифром BSD24 в дозе 8,6 мг/кг приводит к более выраженному снижению концентрации глюкозы в крови крыс на 7-е и 21-е сутки после введения стрептозотоцина по сравнению с терапией диакамфом в дозе 8,6 мг/кг ( $p < 0,05$ ). Также установлено, что при внутривенном введении BSD24 в дозе 8,6 мг/кг выявлено статистически значимое улучшение показателей морфометрического и иммуногистохимического исследования поджелудочной железы, превосходящее значения в группе с терапией диакамфом в дозе 8,6 мг/кг.

В связи с вышесказанным следует отметить актуальность исследования нового лекарственного средства на основе амида гетероциклических кислот под лабораторным шифром BSD24 (табл. 1, 2), а именно амида 4-(4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)-1-метил-5-фенилпирролидин-2-карбоновой кислоты,  $C_{15}H_{20}N_4O$ , для коррекции стрептозотоцин-индуцированного СД в эксперименте, являющегося агонистом имидазолиновых рецепторов I и II типа.

Способ получения амида 4-(4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)-1-метил-5-фенилпирролидин-2-карбоновой кислоты.

Химическая схема синтеза амида 4-(4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)-1-метил-5-фенилпирролидин-2-карбоновой кислоты представлена на схеме 1 (Фиг.1).

Лабораторная технология производства фармацевтической субстанции: в технологический прибор, состоящий из трёхгорлой колбы объёмом 3000 мл, термометра,

капельной воронки, магнитного якоря и коаксиально размещённой магнитной мешалкой последовательно при перемешивании загружают сухой дихлорметан, гидрохлорид метилглицината, безводный сульфат магния. При перемешивании добавляют по каплям через капельную воронку триэтиламин, не допуская увеличения температуры  
5 реакционной смеси выше +20 °С. При перемешивании добавляют по каплям через капельную воронку бензальдегид. Перемешивают реакцию смесь в течение 24 ч. Добавляют 500 мл воды, отделяют органическую фазу. Органическую фазу промывают насыщенным раствором гидрокарбоната натрия, водой, насыщенным раствором хлорида натрия. Высушивают органическую фазу сульфатом натрия и концентрируют  
10 в вакууме на ротационном испарителе. Получают метил-(Е)-2-(бензилиденамино)ацетат.

Далее в технологический прибор, состоящий из трёхгорлой колбы объёмом 2000 мл, термометра, капельной воронки, магнитного якоря и коаксиально размещённой магнитной мешалкой последовательно при перемешивании загружают тетрагидрофуран, метил-4-карбамоил-5-фенилпирролидин-2-карбоксилат из ТП-1, охлаждают до минус  
15 5 °С. При перемешивании добавляют по каплям через капельную воронку раствор бромида лития в тетрагидрофуране, не допуская превышения температуры реакционной смеси выше +5 °С. При перемешивании добавляют по каплям через капельную воронку в реакцию смесь триэтиламин, не допуская превышения температуры реакционной смеси выше +10 °С. Перемешивают реакцию смесь в течение 24 ч. Промывают  
20 реакцию смесь насыщенным раствором хлорида аммония. Экстрагируют реакцию смесь трижды диэтиловым эфиром. Высушивают органическую фазу сульфатом натрия и концентрируют в вакууме на ротационном испарителе. Остаток хроматографируют на силикагеле в системе петролейный эфир-этилацетат (2:1). Получают метил-4-карбамоил-5-фенилпирролидин-2-карбоксилат.

На следующем этапе в технологический прибор, состоящий из трёхгорлой колбы объёмом 2000 мл, термометра, капельной воронки, магнитного якоря и коаксиально размещённой магнитной мешалкой последовательно при перемешивании загружают сухой диметилформамид, карбонат калия, метил-4-карбамоил-5-фенилпирролидин-2-карбоксилат из ТП-2. При перемешивании добавляют по каплям через капельную  
30 воронку метилйодид, не допуская увеличения температуры реакционной смеси выше +20°С. Перемешивают реакцию смесь в течение 48 ч. Полученную суспензию фильтруют, фильтрат концентрируют в вакууме на ротационном испарителе. Остаток хроматографируют на силикагеле в системе петролейный эфир-этилацетат (5:1). Получают метил-4-карбамоил-1-метил-5-фенилпирролидин-2-карбоксилат.

Далее в технологический прибор, состоящий из трёхгорлой колбы объёмом 1000 мл, термометра, капельной воронки, магнитного якоря и коаксиально размещённой магнитной мешалкой последовательно при перемешивании загружают этиловый спирт, метил-4-(этоксид(имино)метил)-1-метил-5-фенилпирролидин-2-карбоксилат из ТП-4. При перемешивании добавляют по каплям через капельную воронку этилендиамин,  
40 не допуская превышения температуры реакционной смеси выше +25°С. Перемешивают реакцию смесь в течение 48 ч. Добавляют в реакцию смесь насыщенный раствор хлорида аммония. Экстрагируют реакцию смесь трижды диэтиловым эфиром. Высушивают органическую фазу сульфатом натрия и концентрируют в вакууме на ротационном испарителе. Остаток хроматографируют на силикагеле в системе петролейный эфир-этилацетат-триэтиламин (2:1:0.01). Получают метил-4-(4,5-дигидро-1Н-имидазол-2-ил)-1-метил-5-фенилпирролидин-2-карбоксилат.

На конечном этапе в технологический прибор, состоящий из трёхгорлой колбы объёмом 2000 мл, термометра, капельной воронки, магнитного якоря и коаксиально

размещённой магнитной мешалкой последовательно при перемешивании загружают метиловый спирт, метил-4-(4,5-дигидро-1Н-имидазол-2-ил)-1-метил-5-фенилпирролидин-2-карбоксилат из ТП-5. При перемешивании пропускают газообразный аммиак из баллона, не допуская превышения температуры реакционной смеси выше +25°C, в течение 12 часов. Перемешивают реакционную смесь в течение 48 ч. В течение 2 часов пропускают в реакционную смесь аргон из баллона. Концентрируют реакционную смесь в вакууме на ротационном испарителе. Остаток хроматографируют на силикагеле в системе петролейный эфир-этилацетат-триэтиламин (3:1:0.01). Получают амид 4-(4,5-дигидро-1Н-имидазол-2-ил)-1-метил-5-фенилпирролидин-2-карбоновой кислоты.

Субстанция представляет собой кристаллический порошок белого или почти белого цвета. Испытание проводят визуально в соответствии ГФ XIII, ОФС.1.1.0006.15.

Порошок практически нерастворим в воде, растворим в метаноле, тетрагидрофуране (ГФ XIII ОФС.1.2.1.0005.15). Раствор 0,75 г субстанции в 25 мл тетрагидрофурана должен быть прозрачным или выдерживать сравнение с эталоном I. (ГФ XIII ОФС.1.2.1.0007.15).

Подлинность – ВЭЖХ: Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, полученной при количественном определении, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца амида 4-(4,5-дигидро-1Н-имидазол-2-ил)-1-метил-5-фенилпирролидин-2-карбоновой кислоты.

Таблица 1

### СПЕЦИФИКАЦИЯ

Таблетки BSD24, покрытые пленочной оболочкой, 50 мг

ООО «НЦ Белфарма», Российская Федерация

Показатели	Методы	Нормы
1	2	3
Описание	Визуальный ГФ XIII	Круглые двояковыпуклые таблетки, покрытые пленочной оболочкой светло-желтого цвета. Должны соответствовать требованиям ГФ XIII, ОФС.1.4.1.0015.15.
Подлинность	ВЭЖХ	Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, полученной при количественном определении, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора стандартного образца BSD24
Однородность массы	Гравиметрический ГФ XIII	В соответствии с требованиями
Тальк, аэросил	гравиметрический ГФ XIII	Не более 3,0 % (суммарно)
Растворение	ГФ XIII, ОФС.1.4.2.0014.15, ВЭЖХ	Через 45 мин в раствор должно перейти не менее 70 % (Q) BSD24
Посторонние примеси	ВЭЖХ	Любая единичная неидентифицированная примесь – не более 0,5 %; сумма примесей – не более 1,5 %.
Однородность дозирования:	ГФ XIII, способ 1, ВЭЖХ	Отклонения в однородности дозирования должны соответствовать требованиям ОФС.1.4.2.0008.15
Микробиологическая чистота	ГФ XIII	Категория 3А
Количественное определение	ВЭЖХ	От 47,5 до 52,5
Маркировка	В соответствии с НД.	
Хранение	При температуре не выше 25 °С	
Срок годности	2 года	

Таблица 2

Состав на одну таблетку

АФС – BSD24 (Проект НД)	50,00 мг
-------------------------	----------

	Лактоза моногидрат (USP)	65,00 мг
	Крахмал картофельный (ГОСТ 7699-78, сорт «экстра» или Eur.Ph. или USP)	5,00 мг
	Целлюлоза микрокристаллическая (USP или Eur.Ph.)	20,00 мг
	Поливинилпирролидон низкомолекулярный (Eur.Ph. или USP)	0,7 мг
5	Коллидон К-25 (Eur.Ph. или USP)	0,40 мг
	Магния стеарат (USP или ВР или Eur.Ph.)	1,60 мг
	Аэросил (Eur.Ph.)	1,00 мг
	Средняя масса ядра	143,70 мг
	Состав оболочки	
	Гидроксипропилметилцеллюлоза (USP или Eur.Ph.)	3,23 мг
10	Твин-80 (USP)	0,70 мг
	Титана диоксид (USP или Eur.Ph.)	1,05 мг
	Тальк (ТУ 9318-013-21250238-99 или Eur.Ph или USP)	1,08 мг
	Сиковит желто-оранжевый 85 E110 (ТУ 2463-004-47929464-98)	0,005 мг
	Средняя масса оболочки	6,07 мг
	Средняя масса таблетки	149,77 мг

### СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ

Исследование выполнено на 40 крысах линии Wistar массой 200±20 г. Негенетическая форма экспериментального СД типа 2 воспроизводилась по методике Islam S., Choi H. (2007). СД моделируется стрептозотоцином («Sigma», США) (внутрибрюшинно – 65 мг/кг) с предварительным (за 15 мин) введением никотинамида (внутрибрюшинно – 230 мг/кг). Количественное определение глюкозы в крови и в моче проводилось на 3, 7, 21 сутки после введения стрептозотоцина.

На 22-е сутки после введения стрептозотоцина животных выводили из эксперимента путем передозировки этилового эфира. Фиксацию ткани поджелудочной железы, почек и печени осуществляли в 10% растворе нейтрального забуференного формалина в течение 24 ч. Срезы для стандартного гистологического исследования окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Ван Гизон и Маллори с использованием стандартных наборов.

После обзорного гистологического исследования в каждом блоке выбирали стандартные репрезентативные участки площадью 5x5 мм<sup>2</sup>, которые вырезали и перезаливали в тканевые мультиблоки по 10-15 кусочков из разных групп эксперимента. С полученных стандартных мультиблоков изготавливали срезы толщиной 4 мкм для иммуногистохимического исследования. Таким образом, на одном стекле одновременно выполняли иммуногистохимические реакции на 10-15 образцах в идентичных условиях. Демаскировку антигенов выполняли по стандартному протоколу высокотемпературной демаскировки в цитратном буфере с pH=7,0 или трис-ЭДТА буфере с pH=9,0 в зависимости от протокола исследования (табл. 3). Для выявления реакции применяются полимерные системы детекции Ultra Vision (ThermoScientific, Великобритания) и Histofine (Nichirei Biosciences, Япония) с хромогеном – диаминобензидином. Характеристики использованных антител в соответствии с задачами исследования и особенности протоколов представлены в таблице 3.

Иммуногистохимическое исследование выполнено в лаборатории научно-образовательного центра «Прикладной иммуноморфологии и цитогенетики» НИУ БелГУ. Для типирования А- и В-клеток островков использовали первичные антитела к инсулину и глюкагону, для изучения апоптоза и пролиферативной активности - первичные антитела к про- и антиапоптогенным белкам.

#### Таблица 3

Маркировка антител для проведения исследования фармакологической активности препарата BSD24



Антитела	Клон	Фирма
Инсулин	Поликлональные	Spring Bioscience
	клон Ab-6 (INS04 + INS05)	Spring Bioscience
Глюкагон	Поликлональные	Spring Bioscience
Каспаза-3	JHM62	Novocastra, Великобритания
	Rb-1197-P0	NeoMarkers, США
TRAIL (апоптоз индуцирующий лиганд фактора некроза опухоли)	27B12	CellMarque
p53	(Pab 240) MS-104-P0	CellMarque
PCNA	Поликлональные	Dako Cytomation, Дания
	(PC10) MS-106-P0	NeoMarkers, США
Ki-67 (ядерный антиген пролиферирующих клеток)	MIB-1	Dako Cytomation, Дания
	MM1	Novocastra, Великобритания

Основная часть морфологического исследования выполнена после создания электронной галереи изображений с помощью полуавтоматического сканера микропрепаратов Mirax Desk (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Германия), что позволило полностью стандартизировать режимы морфометрии исследования. На компьютерных изображениях микропрепаратов определяли характер распределения иммуногистохимических реакций, определяли процентное соотношение площади, занимаемой в-инсулоцитами, к общей площади островка, которая составляет 100%, объемную долю (ОД, %) островков по отношению к экзокринной части железы, площадь островков ( $\text{мкм}^2$ ), а также размеры ядер инсулоцитов ( $\text{мкм}^2$ ) и их количество (% от общего количества клеток панкреатических островков).

С помощью программы для просмотра сканированных изображений «Panoptic Viewer 1.15» производились линейные измерения. Определение площадей иммунореактивного вещества проводили с использованием программы для анализа изображений WCIF ImageJ (США) после преобразования изображений с выделением зон реакций по типу «компьютерного скелетирования».

Количественные данные регистрировали в электронных таблицах MS Excel, средствами которой проведена статистическая обработка после определения характера распределения признаков с применением параметрических (критерий t Стьюдента) и непараметрических (критерий Пирсона –  $\chi^2$  и Фишера), критериев сравнения средних.

Животных разделяли на 4 группы:

- 1 группа (10 животных) – интактные животные;
- 2 группа (10 животных) – стрептозотоцин (внутрибрюшинно – 65 мг/кг) + никотинамид (внутрибрюшинно – 230 мг/кг);
- 3 группа (10 животных) – животным, начиная с 7 дня по 21 день включительно после введения стрептозотоцина, вводили внутривентрикулярно исследуемый препарат BSD24 в дозе 8,6 мг/кг;
- 4 группа (10 животных) – животным, начиная с 7 дня по 21 день включительно после введения стрептозотоцина, вводили внутривентрикулярно препарат диакамф в дозе 8,6 мг/кг.

#### ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

Уровень глюкозы в крови у крыс с моделированием СД на 3 день после введения стрептозотоцина и никотинамида как без терапии, так и с введением препаратов BSD24 и диакамфа достоверно превосходил таковой у интактных животных (табл. 5). В течение последующих дней наблюдений количество сахара в крови крыс достигало максимума в группе с моделью СД на 7 сутки и далее после введения стрептозотоцина. В группе животных, получавших BSD24 в дозе 8,6 мг/кг уровень сахара в крови достоверно не отличался от интактных животных (табл. 6, 7).

Таблица 4

Концентрация глюкозы в крови экспериментальных животных (n=10, ммоль/л).  
Исходные значения.

	Интактные	Стрептозотоцин, 65 мг/кг + никотинамид, 230 мг/кг (кон- троль)	Диакамф, 8,6 мг/кг	BSD24, 8,6 мг/кг
М	6,19	6,32	6,30	6,31
m	0,35	0,32	0,26	0,26

Примечание: здесь и везде далее \* при  $p < 0,05$  по сравнению с интактными; \*\* при  $p < 0,05$  по сравнению с группой контроля

Таблица 5

Концентрация глюкозы в крови экспериментальных животных (n=10, ммоль/л). 3 день после введения стрептозотоцина.

	Интактные	Стрептозотоцин, 65 мг/кг + никотинамид, 230 мг/кг (кон- троль)	Диакамф, 8,6 мг/кг	BSD24, 8,6 мг/кг
М	6,39	11,36*	9,12*	9,36*
m	0,28	0,84	0,23	0,59

Таблица 6

Концентрация глюкозы в крови экспериментальных животных (n=10, ммоль/л). 7 день после введения стрептозотоцина.

	Интактные	Стрептозотоцин, 65 мг/кг + никотинамид, 230 мг/кг (кон- троль)	Диакамф, 8,6 мг/кг	BSD24, 8,6 мг/кг
М	6,57	13,97*	9,60*	7,39**
m	0,16	0,80	0,25	0,49

Таблица 7

Концентрация глюкозы в крови экспериментальных животных (n=10, ммоль/л). 21 день после введения стрептозотоцина.

	Интактные	Стрептозотоцин, 65 мг/кг + никотинамид, 230 мг/кг (кон- троль)	Диакамф, 8,6 мг/кг	BSD24, 8,6 мг/кг
М	7,20	14,12*	9,17*	8,01**
m	0,19	0,75	0,31	0,38

При стрептозотоцин-индуцированном СД в поджелудочной железе отмечаются выраженные деструктивные и воспалительные изменения островков Лангерганса, что сопровождается статистически достоверным уменьшением их размера, объемной доли, а также количества и площади инсулин-позитивных клеток. У неповрежденных в-эндокриноцитов определяется выраженная гипертрофия ядер (табл. 8)

Таблица 8

Данные морфологического и иммуногистохимического исследования в группах экспериментальных животных (n=10)

	Интактные	Контроль	Диакамф, 8,6 мг/кг	BSD24, 8,6 мг/кг
Площадь островков, мкм <sup>2</sup>	10712,0 ± 367,6	2190,0 ± 124,7*	7464,0 ± 141,5**	9015,0 ± 693,8**
ОД островков, %	26,1 ± 1,6	12,0 ± 1,2*	17, ± 0,9**	23, ± 1,3**
Количество в-клеток, %	78,0 ± 1,9	10,0 ± 0,8*	59, ± 4,7**	68, ± 3,9**
Площадь в-клеток, %	70,0 ± 3,3	20,0 ± 1,4*	36,4 ± 4,1*	46,0 ± 4,1**

Размер ядер в-клеток, мкм <sup>2</sup>	25,0 ± 1,07	28,9 ± 1,3*	26, ± 0,7**	27, ± 1,1**
---	-------------	-------------	-------------	-------------

При внутрижелудочном введении таблеток, покрытых пленочной оболочкой, содержащих 50 мг BSD24 в дозе 8,6 мг/кг установлено статистически значимое улучшение показателей морфометрического и иммуногистохимического исследования поджелудочной железы и исследуемые показатели статистически значимо не отличались от таковых в интактной группе животных (табл. 8).

Установлено, что лекарственное средство на основе амида 4-(4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)-1-метил-5-фенилпирролидин-2-карбоновой кислоты под лабораторным шифром BSD24 в дозе 8,6 мг/кг обладает более выраженной терапевтической эффективностью на модели стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс по сравнению с препаратом диакамф в дозе 8,6 мг/кг. Это выражается в более выраженном снижении концентрации глюкозы в крови крыс на 7-е (на 23%) и 21-е (на 13%) сутки после введения стрептозотоцина по сравнению с терапией диакамфом (p<0,05). Также выявлено статистически значимое улучшение показателей морфометрического и иммуногистохимического исследования поджелудочной железы в группе с коррекцией BSD24, превосходящее значения в группе с терапией диакамфом.

#### (57) Формула изобретения

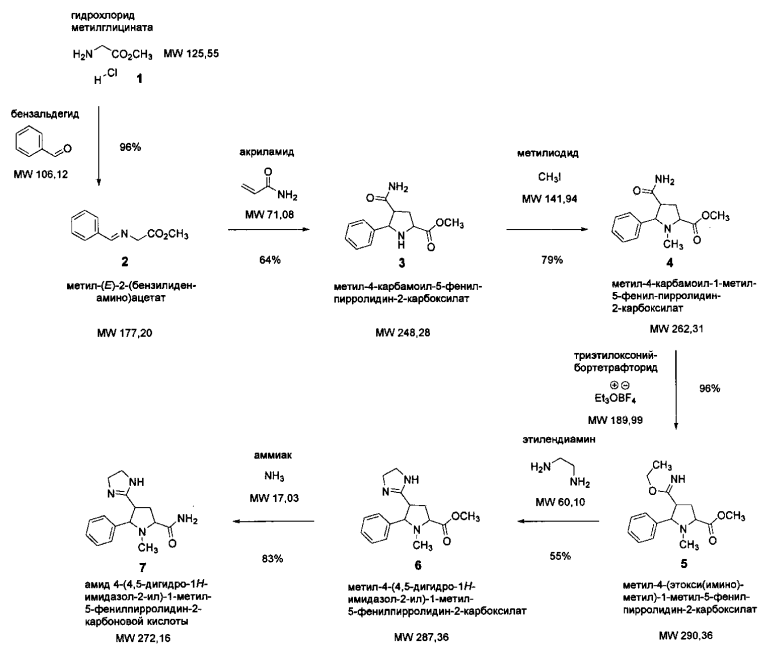
Способ коррекции стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс с использованием лекарственного средства на основе амида гетероциклических кислот, включающий моделирование экспериментального сахарного диабета типа 2 путем внутрибрюшинного однократного введения стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг с предварительным, за 15 мин, однократным внутрибрюшинным введением никотинамида в дозе 230 мг/кг, затем проводят коррекцию патологии путем внутрижелудочного введения амида 4-(4,5-дигидро-1H-имидазол-2-ил)-1-метил-5-фенилпирролидин-2-карбоновой кислоты в дозе 8,6 мг/кг, начиная с 7 дня по 21 день включительно после введения стрептозотоцина.

30

35

40

45



Фиг.1