

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

Клочков Владлен Геннадиевич

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 2-ОКСИНДОЛА**

3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
Спасов Александр Алексеевич
академик РАН, заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук, профессор

Волгоград – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. Фармакологические свойства производных 2-оксиндола	11
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	27
ГЛАВА 3. Поиск производных 2-оксиндола, ингибирующих киназу гликогенсинтазы типа 3 бета (GSK3B)	58
3.1. Поиск ингибиторов GSK3B среди новых производных 2-оксиндола	58
3.1.1. Зависимость ингибирующей активности от структуры новых производных 2-оксиндола	60
3.1.2. Построение модели связывания in silico соединений К-167 и К-248.....	63
3.1.3. Цитотоксичность соединений К-167 и К-248.....	66
3.1.4. Заключение	69
3.2. Антидиабетическая активность соединения К-167	69
3.2.1. Влияние на утилизацию глюкозы фибробластами крыс	70
3.2.2. Влияние на уровень постпрандиальной гипергликемии в пероральном тесте толерантности к глюкозе	70
3.2.3. Антидиабетическая активность при курсовом введении	72
3.2.4. Влияние на воспалительный статус животных с моделью сахарного диабета 2-го типа	79
3.2.5. Влияние на поведенческую активность животных с моделью сахарного диабета 2-го типа	82
3.3. Противовоспалительные свойства соединения К-167.....	84
3.4. Антиагрегантная и антитромботическая активность соединения К-167.....	96
3.4.1. Антиагрегантная активность in vitro	96
3.4.2. Антитромботическая активность in vivo	98
3.5. Оценка лекарственного подобия основных фармакокинетических и токсикологических свойств соединения К-167 по показателям ADMET	99
3.6. Острая токсичность при пероральном введении белым мышам	100
3.7. Заключение	101
3.8. Антидиабетическая активность соединения К-248	102
3.8.1. Влияние на утилизацию глюкозы фибробластами крыс	102
3.8.2. Антидиабетическая активность при курсовом введении	103
3.8.3. Влияние на воспалительный статус животных с моделью сахарного диабета 2-го типа	110
3.8.4. Влияние на поведенческую активность животных с моделью сахарного диабета 2-го типа	113
3.9. Противовоспалительные свойства соединения К-248.....	114

3.10. Антиагрегантная активность соединения К-248.....	126
3.11. Оценка лекарственного подобия, основных фармакокинетических и токсикологических свойств соединения К-248 по показателям ADMET	128
3.12. Заключение	129
ГЛАВА 4. Поиск производных 2-оксиндола, ингибирующих α -глюкозидазу	131
4.1. Влияние новых производных 2-оксиндола на активность α -глюкозидазы	131
4.1.1. Зависимость ингибирующей активности от структуры новых производных 2-оксиндола	133
4.1.2. Построение модели связывания соединения К-170(1) с α -глюкозидазой in silico	137
4.1.3. Цитотоксичность соединения К-170(1).....	139
Заключение	140
4.2. Антигипергликемическая активность соединения К-170(1).....	141
4.2.1. Влияние на уровень постпрандиальной гипергликемии в пероральном тесте толерантности к дисахаридам	141
4.2.2. Влияние на уровень постпрандиальной гипергликемии в пероральном тесте толерантности к глюкозе	143
4.3. Оценка лекарственного подобия, основных фармакокинетических и токсикологических свойств соединения К-170(1) по показателям ADMET	144
Заключение	146
Глава 5. Обсуждение результатов	147
Заключение	159
ВЫВОДЫ	161
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	163
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	164
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	165

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Сахарный диабет 2-го типа (СД2) является глобальной медико-социальной проблемой 21-го века, имея темпы роста распространённости, соизмеримые с масштабами мировой пандемии. По данным мировой ассоциации диабета, на 2019 год около 463 миллионов человек подвержено данному заболеванию (1 из 11 от населения Земли) [Cho и др., 2019]. При этом половина из них имеют недиагностированный или скрытый СД2. Заболевание характеризуется прогрессивным течением инсулинорезистентности [Tkachuk, Vorotnikov, 2014] и развитием ряда острых (диабетический кетоацидоз, гиперосмолярная кома, гипогликемия [Дедов и др., 2020]) и поздних осложнений (атеросклероз, инфаркт миокарда и инсульт, ретинопатия, нефропатия, сенсорная нейропатия, оппортунистические инфекции [Shestakova и др., 2020]), зачастую приводя к временной потере трудоспособности, инвалидизации и ранней смерти, в первую очередь из-за высокого сердечно-сосудистого риска [Петров В. И., Спасов А. А., Чепляева Н. И., 2016]. При этом большое разнообразие разработанных классов противодиабетических препаратов, к сожалению, не обеспечивает все необходимые потребности [Аметов А. С., 2020]: наличие большого количества побочных эффектов, недостаточная корректировка постпрандиальной гипергликемии, отсутствие влияния на поздние осложнения сахарного диабета или развивающееся вялотекущее хроническое воспаление [Cheng, Fantus, 2005]. В связи с этим большое значение имеет разработка новых классов противодиабетических средств [Середенин С. Б., Островская Р. У., Воронина Т. А. и др., 2016; Тюренков И. Н. и др., 2020] согласно подходам медицинской химии [Зефирова О. Н., Зефилов Н. С., 2000].

2-оксиндольный скаффолд является высокоактивным для поиска новых соединений, проявляющих антидиабетические [Khan и др., 2014], противовоспалительные и иммуностропные [Rudrangi и др., 2011], антиоксидантные [Kaminska и др., 2016] и противоопухолевые [Lozinskaya и др., 2019] свойства.

Перспективными направлениями поиска новых антидиабетических средств среди изучаемых производных 2-оксиндола являются ингибирование киназы гликогенсинтазы типа 3 бета- и альфа-глюкозидазы, а также изучение противовоспалительных и иммуностропных свойств.

Киназа гликогенсинтазы типа 3-бета (GSK3B) – фермент класса серин/треониновых протеинкиназ, участвующий во множестве внутриклеточных процессов [Meijer, Flajolet, Greengard, 2004]. Для соединений, ингибирующих ее активность, показано большое количество фармакологических эффектов: антидиабетический, противовоспалительный, иммуностропный,

антиоксидантный, антитромботический и антиагрегантный [Liu, Yao, 2016]. Выявленные эффекты позволяют сделать вывод, что данный класс средств является перспективным для разработки новых антидиабетических средств. При этом наличие большого спектра плеiotропных активностей показывает их эффективность при отдаленных осложнениях СД2. Большую роль в патогенезе СД2 играют не только нарушения углеводного и жирового обменов, но и каскад реакций, связанный с иммуновоспалительным процессом, в который вовлечен сигнальный каскад Nf-kB [Zyuz'kov G. N., Zdanov V. V. и др., 2015]. Учитывая, что для производных 2-оксиндола характерно наличие противовоспалительных свойств [Rudrangi и др., 2011], данный аспект является важным при изучении новых соединений, проявляющих антидиабетогенные свойства.

Ингибиторы альфа-глюкозидазы – применяемый в настоящее время класс противодиабетических препаратов, имеющий широкий спектр антидиабетических эффектов, влияющий на развивающиеся осложнения СД2, при отсутствии риска гипергликемии [Furman, 2007; Ghani, 2015]. Однако ограничением его применения служит большая частота побочных эффектов, возникающих при этом [Dabhi, Bhatt, Shah, 2013], что показывает важность поиска новых препаратов с обозначенной активностью.

В связи с этим перспективным направлением является разработка новых противодиабетических препаратов, влияющих как на звенья патогенеза заболевания, так и на возникающие осложнения.

Степень разработанности

На сегодняшний день для клинического применения при СД2 одобрено 11 классов лекарственных препаратов, новые классы находятся в разработке, однако ни один из используемых препаратов не назначается в качестве монотерапии для достижения целевого уровня гликированного гемоглобина (HbA1c) [Cheng, Fantus, 2005].

Одним из новых перспективных классов противодиабетических средств являются ингибиторы киназы гликогенситазы типа 3 бета. Для веществ с данной активностью показан широкий спектр противодиабетических эффектов: снижение уровня гипергликемии и инсулинорезистентности [Meijer, Flajolet, Greengard, 2004], нормализация липидного обмена [Liu и др., 2021], препятствование развитию хронического подострого воспаления [Phukan и др., 2010]. Кроме того, выявлено снижение степени и частоты развития таких осложнений сахарного диабета, как: повышенная агрегация и тромбообразование [Wei и др., 2020], поведенческие изменения [King и др., 2013], повышение частоты оппортунистических инфекций [Maes и др., 2012]. В клинической практике лекарственные препараты с подобным механизмом действия отсутствуют. Клинические исследования проводились для трех

ингибиторов GSK3B: 1) NP031112 (Tideglusib) – для лечения болезни Альцгеймера, мышечной дистрофии и аутизма; 2) LY2090314 – для лечения острой лейкемии, в комбинированной терапии метастатических и поздних стадий раковых заболеваний; 3) 9-ING-41 – для лечения опухолевых заболеваний. Опубликованные результаты клинических исследований показывают отсутствие серьезных побочных эффектов и хорошую переносимость ингибиторов GSK3B [Lovestone и др., 2015; Ugolkov и др., 2018].

Используемые в настоящее время для терапии СД2 ингибиторы альфа-глюкозидазы (акарбоза, воглибоза, миглитол) являются классом препаратов, способных как влиять на осложнения заболевания [Patel, 2015], так и корректировать уровень гипергликемии [Israili, 2011]. При этом для данных средств не выявлено явлений гипогликемии. Однако в связи с частым проявлением побочных эффектов данная группа препаратов не имеет широкого применения у населения. Перспективным направлением является поиск новых ингибиторов альфа-глюкозидазы с меньшей частотой побочных эффектов, для чего необходимо чтобы препарат всасывался в ЖКТ и влиял на аллостерический центр фермента.

Целью исследования является изучение фармакологических свойств новых производных 2-оксиндола. Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Провести экспериментальный поиск *in vitro* ингибиторов киназы гликогенсинтазы типа 3 бета (GSK3B) и альфа-глюкозидазы в ряду новых производных 2-оксиндола.
2. Изучить взаимоотношение «структура – активность» у производных 2-оксиндола, ингибирующих GSK3B.
3. Исследовать взаимоотношение «структура – активность» у производных 2-оксиндола, влияющих на активность альфа-глюкозидазы.
4. Оценить влияние на захват глюкозы в клеточной культуре, а также антидиабетическое действие при однократном и курсовом введении на животных моделях СД2 соединений-лидеров, ингибирующих GSK3B.
5. Валидировать метод и провести изучение противовоспалительной активности соединений на клеточной модели с использованием липополисахарида.
6. Исследовать влияние веществ на фагоцитарную активность на первичных выделенных линиях клеток мышей.
7. Определить антиагрегантную и антитромботическую активности производных 2-оксиндола, ингибирующих GSK3B,
8. Изучить антигипергликемическую активность соединения-лидера, ингибирующего альфа-глюкозидазу, в тестах толерантности к дисахаридам и глюкозе.

9. Определить цитотоксичность изучаемых соединений на первичных выделенных линиях клеток мышей.

Научная новизна

Получены данные о влиянии новых производных 2-оксиндола на активность киназы гликогенсинтазы типа 3 бета, альфа-глюкозидазы, липополисахаридиндуцированную секрецию оксида азота и интерлейкина-6, а также о наличии у них противовоспалительных свойств.

Впервые для производных К-167 и К-248 показано наличие высокой антидиабетической активности на клеточной и животной моделях. На животной модели СД2 выявлена нормализация показателей углеводного и липидного обменов, а также препятствование развитию хронического подострого воспаления и оксидативного стресса.

Выявлено, что соединения К-167 и К-248 блокируют активацию макрофагов и выделение оксида азота и интерлейкина-6 (оказывают влияние на «цитокиновый шторм», вызванный липополисахаридом). Данная активность подтверждена на животной модели местного воспаления.

Показано наличие у веществ К-167 и К-248 антиагрегантной активности при использовании индукторов АДФ и коллагена, а также для соединения К-167 антитромботической активности на модели окклюзии сонной артерии 50%-м раствором хлорида железа (3).

Выявлено, что производное К-170(1) оказывает выраженную антигипергликемическую активность в пероральных тестах толерантности к дисахаридам.

Соединения **К-167**, **К-170(1)** и **К-248** не вызывали гибели неонатальных фибробластов сердца крыс в конечной концентрации 20 мкМ и первичных перитонеальных макрофагов мышей в конечной концентрации 7 мкМ. Вещество **К-167** относится к 5-му классу токсичности при пероральном введении мышам.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе проведенного исследования фармакологических свойств новых производных 2-оксиндола выявлены новые высокоактивные ингибиторы киназы гликогенсинтазы типа 3 бета и альфа-глюкозидазы. Валидирована клеточная методика изучения противовоспалительной активности соединений. Установлено, что производные 2-оксиндола блокируют активацию макрофагов и выделение оксида азота и интерлейкина-6 (оказывают влияние на «цитокиновый шторм»). Проведено углубленное изучение соединений-лидеров, которые рекомендованы для проведения расширенных доклинических исследований.

Методология и методы исследования

Методические подходы 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 ВолГМУ. Экспериментальные исследования выполнены в соответствии с «Методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств» [Миронов А.Н. и др., 2012] с использованием достаточного количества нелинейных и линейных лабораторных животных: мышей, крыс и кроликов. Использованы методики тестирования активности соединений *in vitro*: влияние соединений на активность киназы гликогенсинтазы типа 3 бета и альфа-глюкозидазы, на утилизацию глюкозы первичными неонатальными фибробластами сердца крыс, на синтез оксида азота и интерлейкина-6 первичными перитонеальными макрофагами мышей под влиянием липополисахарида, на активацию и фагоцитарную активность (НСТ-тест и микроскопия) первичных перитонеальных макрофагов мышей; на фагоцит-зависимую хемилюминесценцию первичных перитонеальных макрофагов и нейтрофилов мышей, на агрегацию тромбоцитов, а также определение цитотоксичности соединений в МТТ- и ЛДГ-тестах; и *in vivo*: изучение антидиабетической и антигипергликемической активностей (антигипергликемической активности соединений при однократном введении интактным крысам; антидиабетической активности соединений при однократном введении крысам с моделированным СД2; антидиабетической активности соединений при хроническом введении мышам линии C57bl/6j, находившимся на ВЖД), противовоспалительной активности в тесте липополисахаридиндуцированного отека задней лапы крыс, острой токсичности соединений при пероральном введении интактным мышам, антитромботической активности (продлонгация времени окклюзии сонной артерии индуцированной аппликацией 50%-го раствора хлорида железа (III) интактным крысам). Использованы рекомендованные для проведения доклинических исследований методы статистического анализа полученных результатов. Все исследования были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (OHRP), протокол № 2021/042 от 29 апреля 2021 года.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Новые производные 3-арилиден-2-оксиндола ингибируют киназу гликогенсинтазу типа 3 бета (GSK3B) и альфа-глюкозидазу.
2. Производное **К-167** является наномолярным ингибитором GSK3B. Изучаемое соединение оказывает выраженную антидиабетическую и противовоспалительную активность в

методиках *in vitro* и *in vivo*; снижает индуцированную АДФ и коллагеном агрегацию тромбоцитов и оказывает антитромботическую активность.

3. Соединение **K-248** ингибирует GSK3B и имеет выраженную противовоспалительную активность; при курсовом пероральном введении (30 мг/кг) оказывает антидиабетическую активность; препятствует индуцированной АДФ и коллагеном агрегации тромбоцитов.

4. Изученные новые производные 2-оксиндола **K-167** и **K-248** подавляют индуцированную липополисахаридом выработку оксида азота и интерлейкина-6 макрофагами.

5. Соединение **K-170(1)** ингибирует альфа-глюкозидазу (IC_{50} 6,78 мкМ); оказывает антигипергликемическую активность (5 мг/кг) сопоставимую с препаратом сравнения «Акарбозой» (5 мг/кг) в пероральном тесте толерантности к дисахаридам.

6. Производные **K-167**, **K-170(1)** и **K-248** не вызывали гибели неонатальных фибробластов сердца крыс и первичных перитонеальных макрофагов мышей в средних микромолярных концентрациях. Соединение **K-167** относится к 5-му классу токсичности при пероральном введении мышам.

Внедрение результатов исследования

Полученные данные углубленного изучения потенциальных противодиабетических препаратов использованы в лекционных курсах на кафедрах фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ; фармакологии и фармации Института НМФО ВолгГМУ; фармацевтической и токсикологической химии ВолгГМУ. Методика изучения влияния соединений на синтез оксида азота и интерлейкина-6 первичными перитонеальными макрофагами мышей под влиянием липополисахарида (ЛПС) используется в исследованиях, выполняемых в рамках соглашения № 075-15-2020-777 от 1 октября 2020 г. о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий, в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации (Москва).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, полученного с использованием современных методов. Сформулированные в диссертации выводы подтверждены экспериментальными данными, анализом литературы и точностью статистической обработки полученных результатов. Тезисы, содержащие основные положения диссертационной работы, докладывались на XXV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2018); Всероссийской научной конференции молодых ученых «Достижения современной фармакологической науки»,

(Рязань, 2018); 76-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2018); Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2019); XXIV Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2019); 77-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2019); 78-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2020); XXV Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2020); Весенней школе-конференции по медицинской химии «МедХимРар-21» (Москва, 2021); 79-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2021).

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 3 в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 2 в журналах, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени и получен 1 патент на изобретение.

Личный вклад автора

Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования по изучению фармакологических свойств новых производных 2-оксиндола. Автору принадлежит ведущая роль в проведении исследования на всех его этапах. При написании диссертационной работы автором выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, оформление рукописи.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 176 страницах машинописного текста и состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, перечня сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа иллюстрирована 82 рисунками и 23 таблицами. Библиографический указатель включает 189 источников, из них 9 отечественных, 180 иностранных.

ГЛАВА 1. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ 2-ОКСИНДОЛА

Производные 2-оксиндола являются перспективным классом химических соединений, имеющих простые и доступные методы синтеза, а также большой спектр разнообразной фармакологической активности. Выявлено, что производные 2-оксиндола оказывают влияние на центральную нервную систему, в частности: алкоксизамещенные оксиндолы оказывают седативное и антидепрессивное действие. Так, 5-флуорооксиндол, 6-хлорооксиндол и их производные оказывают снотворное действие и угнетают ЦНС [Rudrangi и др., 2011]. Giorno и др. [2015] показали, что 3-(2-оксопропил)-3-гидрокси-2-оксиндолы оказывают центральное и периферическое антиноцицептивное действие. По данным Hirata и др. [2018], 3-арилиден-2-оксиндолы, в частности вещество GIF-2165X-G1, оказывают протективное влияние на многие нейродегенеративные заболевания. Так, показана способность предотвращать глутаматиндуцированную клеточную смерть HT22 клеток гиппокампа, глутамат- и эрастин-индуцированную продукцию активных форм кислорода и вход кальция в клетку. Подобный эффект соединений реализуется посредством активации ядерного фактора $\text{p}53$; переход из цитозоля в ядро клетки запускает его сигнальный каскад, обеспечивающий экспрессию ряда ферментов 2-й фазы антиоксидантной защиты организма, такие как: глутатионредуктаза, хинонредуктаза 1 и 2, тиоредоксинредуктаза. Yoshikawa и др. [2015] обнаружили ряд производных 2-оксиндола, способных ингибировать фосфодиэстеразу 10A, что может быть использовано для терапии шизофрении, болезни Паркинсона и Хантингтона. Кроме того, по данным Watanabe и др. [2012], выявлен ряд производных 3-арилиден-2-оксиндола, способных проникать через гематоэнцефалический барьер и связываться с нейрофибриллярными узлами, образующимися при болезни Альцгеймера, что может служить значимым маркером для ее обнаружения. В исследованиях других авторов [Furuta и др., 2017; Hirata и др., 2018] показано, что производные 3-арилиден-2-оксиндола препятствуют индуцированной оксидативным стрессом нейрональной смерти.

Производные 2-оксиндола оказывают влияние на функции исполнительных органов и систем. Так, нестероидные производные оказывают кардиотоническое и антигипертензивное действие. Индолиндан и адибендан используются для терапии застойной сердечной недостаточности. Индолиндан – сильнодействующий инотропный кардиотоник, оказывающий действие путем ингибирования фосфодиэстеразы. Кроме того, данные соединения оказывают сосудорасширяющее и положительное инотропное действия [Rudrangi и др., 2011]. Так, по данным Rudrangi и др. [2011], некоторые производные 2-оксиндола оказывают

противовоспалительный эффект. Выявлено, что данное действие реализуется посредством ингибирования активности липоксигеназы и циклооксигеназы. Кандидат в лекарственные средства тенидап, разработанный фирмой Pfizer, относится к соединениям с подобным спектром активности [Wylie и др., 1995]. Показано, что производные 2-оксиндола снижают индуцированную липополисахаридом выработку провоспалительных цитокинов ФНО- α и ИЛ-6 макрофагами посредством ингибирования экспрессии мРНК циклооксигеназы-2, PGES и индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS), не вызывая цитотоксичности [Chen и др., 2014]. Описанные изменения характерны для «цитокинового шторма», развивающегося при инфекционно-воспалительных заболеваниях [Hu, Huang, Yin, 2021]. По данным Gupta A.K., Kalpana S. [2012], производные 3-арилиден-2-оксиндола обладают выраженной антиоксидантной и антирадикальной активностями. Yasuda и соавт. [2013] показали, что для производных 2-оксиндола характерно препятствование развитию перекисного окисления липидов внутриклеточного оксидативного стресса, что может быть использовано при терапии СД2. Трифторированные производные 2-оксиндола, по данным Tokunaga и др. [2005], являются секреторагами гармона роста.

В исследованиях Nazare и Arpit [2011] выявлены производные 1,3,5-тризамещенных-2-оксиндола, оказывающие выраженную антибактериальную активность против *B. Subtilis* и *S. Aureus*, а также соединения с высокой активностью против микобактерий туберкулёза. Ghozlan с соавт. [2015] показали, что ряд спиропроизводных циклических 2-оксиндолов обладают широким спектром антибактериальной активности против: *E. coli*, *P.aeuroginosa*, *B. subtilis* и *S. Aureus*; кроме того, способны останавливать рост раковых клеток линии MCF-7 (эпителиоподобная линия аденокарциномы протоков молочной железы). По данным Buzzetti, Brasca, Longo [1995], водорастворимые производные 3-арилиден-2-оксиндолов являются потенциальными противоопухолевыми агентами, посредством ингибирования активности тирозинкиназы. В исследованиях Nesi и др. [2013] 3,5-дизамещенные-2-оксиндолы способны подавлять фазу роста немелкоклеточного рака легкого человека, что показано на линии клеток A549 (линия карциномы легкого человека). Также выявлено влияние производных 2-оксиндола на активность тиоредоксинредуктазы [Kaminska и др., 2016], показано что ингибирование ее активности может быть использовано для терапии раковых заболеваний, показан эффект на линиях MCF-7 и HCT-116 (линия клеток рака толстой кишки человека).

В литературе отражено антидиабетическое действие производных 2-оксиндола. Так, по результатам Khan и др. [2013], выявлено наличие антигликирующей активности. По данным Khan и др. [2014], 3-арилиден-2-оксиндолы являются высокоактивными ингибиторами альфа-глюкозидазы. Результаты работы других авторов [Dhokne, Sakla, Shankaraiah, 2021; Lozinskaya и др., 2019; Rudrangi и др., 2011] показали, что 3-арилиден-2-

оксиндольный скаффолд является высокоактивным при поиске новых ингибиторов киназы гликогенсинтазы типа 3 бета.

Наиболее перспективным направлением для фармакологического изучения новых производных 2-оксиндола представляется поиск соединений с антидиабетической активностью, проявляющих противовоспалительную, иммуностропную и антиоксидантную активности, что будет дополнительными плеiotропными эффектами, потенцирующими основную активность. На основании перечисленных данных и проведенного анализа литературы, наиболее вероятно влияние изучаемых производных на активность киназы гликогенсинтазы типа 3 бета и альфа-глюкозидазу.

Производные 2-оксиндола – высокоактивный скаффолд для создания противодиабетических средств

В 21-м веке распространенность СД2 среди населения всего мира (около 463 миллионов человек, по данным мировой ассоциации диабета на 2019 год) можно приравнять к масштабам мировой пандемии [Cho и др., 2019]. Причем у половины из них СД2 имеет недиагностированную или скрытую форму. Заболевание характеризуется прогрессивным течением и развитием ряда острых (диабетический кетоацидоз, гиперосмолярная кома, гипогликемия) и поздних осложнений (атеросклероз, инфаркт миокарда и инсульт, ретинопатия, нефропатия, сенсорная нейропатия), зачастую приводя к временной потере трудоспособности, инвалидизации и ранней смерти, в первую очередь из-за высокого сердечно-сосудистого риска [Петров В. И., Рогова Н. В., Михайлова Д. О., 2010]. Общие прямые расходы на лечение СД2, по данным ВОЗ, составляют 10 % от общих расходов на здравоохранение (760 миллиардов долларов США) [Wilmot, Idris, 2014]. При этом большое разнообразие разработанных классов противодиабетических препаратов, к сожалению, не обеспечивает все необходимые потребности: наличие большого количества побочных эффектов, недостаточная коррективировка постпрандиальной гипергликемии, отсутствие влияния на поздние осложнения сахарного диабета или развивающееся вялотекущее хроническое воспаление [Cheng, Fantus, 2005]. Поэтому разработка новых классов противодиабетических средств в настоящее время имеет большое значение.

Основные группы препаратов для лечения сахарного диабета 2-го типа

Регулярное обновление международных и национальных алгоритмов терапии СД2 обосновано получением новых данных широкомасштабных рандомизированных исследований, изменяющих целевые значения терапии и способы их достижения. Появление новых данных о лекарственных препаратах иногда вносит ограничения в их применение. В настоящее время

для клинического использования одобрены 11 классов антидиабетических лекарственных средств, новые классы находятся в разработке, однако ни один из используемых препаратов не назначается в качестве монотерапии для достижения целевого уровня гликированного гемоглобина (HbA1c) [Cheng, Fantus, 2005].

Бигуаниды. Единственным используемым в клинике представителем является метформин. Он является наиболее изученным с точки зрения эффективности и безопасности лекарственным средством для терапии СД2. Относится к препаратам первого ряда и является «золотым» стандартом для старта терапии, так как обладает низким риском развития гипогликемии, снижает массу тела [Coll и др., 2019] и обладает рядом плеiotропных эффектов: кардиопротективным, гиполипидемическим [Simanenkova и др., 2021]. Терапия метформином приводит к снижению уровня глюкозы плазмы натощак на 2–4 мМ/л и HbA1c на 1–2 %. К преимуществам препарата также можно отнести низкую стоимость. К недостаткам его применения относят: желудочно-кишечный дискомфорт, риск развития лактатацидоза (редко), риск развития дефицита витамина B12 при длительном применении [Rena, Hardie, Pearson, 2017]. Высокие дозы метформина приводят к увеличению анаэробного гликолиза и способны потенцировать хроническую гипоксию у пациентов с заболеваниями сердца и легких, в связи с чем он не рекомендован для применения людьми старше 60 лет [Graham и др., 2011]. Также противопоказанием для его применения являются заболевания почек и ренальная недостаточность, которые часто развиваются у людей с высокими показателями индекса массы тела и метаболическим синдромом [Raikou, Gavriil, 2018]. Кроме того, проводятся обширные изучения препарата в различных сферах здравоохранения: терапия опухолевых заболеваний, применение при инфекции Covid-19, ожирение и заболевания печени [Lv, Guo, 2020].

Производные сульфонилмочевины. Существует три поколения производных сульфонилмочевины. Толбутамид и хлорпропамид (1-е поколение) в настоящее время имеют ограниченное применение в связи с их частым взаимодействием с другими лекарственными препаратами, которое вызывало гипогликемию. Гликлазид, глипизид, глибенкламид (2-е поколение) не вызывают гипогликемию при совместном применении с другими лекарствами, но при этом встречаются следующие неблагоприятные эффекты: редкие эпизоды гипогликемии при физической нагрузке, нерегулярном приеме пищи; увеличение массы тела; кардиотоксические эффекты [Whitlock и др., 2020]. При этом для глибенкламида выявлено снижение уровня нейротоксичности [Ноч и др., 2020]. Глимепирид (3-е поколение) имеет благоприятный профиль безопасности в отношении гликемии, однако при этом взаимодействие с АТФ-зависимыми калиевыми каналами, расположенными в сосудах, обуславливает отрицательное влияние на сердечно-сосудистую систему [Al-Karaghali и др., 2020].

Меглитиниды. Репаглинид, натеглинид стимулируют инкрецию инсулина, стимулированную глюкозой, имеют малый риск развития гипогликемии и обладают избирательность действия. При этом они используются лишь для профилактики постпрандиальной гипергликемии, не назначаются монотерапией, могут приводить к увеличению массы тела [Akagi и др., 2020]. Показаны для лиц с отсутствием избыточной массы тела или ожирения [Scott, 2012]. Кроме этого, к фактору, снижающему комплаентность пациентов к лечению, можно отнести прием препаратов непосредственно перед употреблением пищи.

Тиазолидиндионы. Пиоглитазон имеет благоприятный метаболический профиль действия: снижение инсулинорезистентности, сахароснижающий эффект без риска развития гипогликемии, гиполипидемический эффект, регулирует дифференцировку адипоцитов и накопление жирных кислот. Выявлено протективное влияние на сердечнососудистую систему [Zhou и др., 2020]. Однако его использование имеет весьма серьезные ограничения [Waugh и др., 2006]. Негативным эффектом тиазолидиндионов является увеличение индекса массы тела, развитие отеков, повышенный риск переломов трубчатых костей. Пиоглитазон рекомендуется в качестве монотерапии пациентам с выраженной инсулинорезистентностью [Fiorentino и др., 2021], отсутствием сердечно-сосудистой патологии в случае непереносимости или противопоказаний к применению препаратов первого ряда [DeFronzo и др., 2011].

Ингибиторы ДПП-4. Вилдаглиптин, ситаглиптин – группа пероральных препаратов из класса инкретиномиметиков. Снижают уровень HbA1c на 0,5–1,0 %, не вызывают гипогликемии и прибавки массы тела, в экспериментах на животных выявлена способность сохранять массу β -клеток поджелудочной железы [Ates Bulut и др., 2020; Wiciński и др., 2020]. Ограничивают применение данной группы высокая цена, риск развития панкреатитов, а также применение в комбинации для достижения необходимых показателей контроля гликемии. Выявлено повышение оксидативного статуса на фоне приема вилдаглиптина [Al-Kuraishy и др., 2020]. Препараты не рекомендуется применять при тяжелой почечной и печеночной патологии [Lambeir, Scharpé, Meester De, 2008].

Агонисты рецепторов ГПП-1. Эксенатид, лираглутид, семаглутид – группа инъекционных препаратов из класса инкретиномиметиков. Препараты снижают уровень HbA1c на 0,8–1,8 %, не вызывают гипогликемии, снижают массу тела и артериальное давление [Куркин Д.В., Волотова Е.В., Бакулин Д.А., Ломкина Е.М., 2016]. В сентябре 2019 года одобрен первый пероральный препарат данного класса – «Рибелсас» компании Novo Nordisk [Semenya, Wilson, 2020]. В экспериментах на животных показано сохранение массы β -клеток поджелудочной железы. У больных с ожирением позволяют ожидать дополнительный эффект в виде снижения массы тела [Chaplin, 2020]. Препараты не рекомендуется применять у пациентов

с тяжелыми нарушениями функции почек и печени; сердечной недостаточностью; воспалительными заболеваниями кишечника; парезом желудка. Кроме этого, агонисты рецепторов ГПП-1 являются дорогостоящими препаратами, что делает их малодоступными для большинства пациентов и снижает приверженность к лечению.

Ингибиторы альфа-глюкозидаз. Акарбоза и миглитол обладают относительно невысоким антигипергликемическим потенциалом. При этом несоблюдение предписанной диеты приводит к выраженным побочным эффектам со стороны желудочно-кишечного тракта, что обуславливает крайне низкую приверженность к лечению у пациентов. Препараты не оказывают системного действия, не вызывают гипогликемии, снижают уровень постпрандиальной гликемии [Furman, 2007]. Выявлено, что акарбоза оказывает протективный эффект при развитии СД2 [Zhao и др., 2020]. При этом стоит отметить класс всасываемых ингибиторов альфа-глюкозидаз (воглибоза), для которого характерна меньшая частота возникновения побочных эффектов [Dabhi, Bhatt, Shah, 2013; Kawamori и др., 2009].

Ингибиторы натрий-глюкозного котранспортера 2-го типа (SGLT2). Это новый класс пероральных антидиабетических средств, снижающих уровень гипергликемии, независимо от инсулина и функции бета-клеток. Препараты этого класса предлагают новые возможности в лечении СД2: не зависящий от инсулина механизм действия, небольшое снижение массы тела, благоприятные фармакокинетические свойства и хорошая переносимость, снижение риска осложнений системы крови [Ganorkar и др., 2020]. При этом механизм действия ингибиторов SGLT2 направлен на клинические проявления диабета, не влияя на причину его появления. Для данных препаратов характерны следующие побочные эффекты: инфекции половых органов и мочевыводящих путей, осмотический диурез, возможный риск гипотонии и диабетического кетоацидоза [Azim, Baker, White, 2014]. При этом препараты данной группы входят в национальные рекомендации по терапии СД2 в комбинированном применении с другими классами антидиабетических средств.

Исходя из проведенного обзора литературы, можно сделать вывод о перспективности разработки нового класса антидиабетических средств, оказывающего выраженную антидиабетическую активность, предотвращающего развитие осложнений СД2 и при этом не обладающего широким спектром побочных эффектов.

Киназа гликогенсинтазы типа 3 бета (GSK3B)

Киназа гликогенсинтазы типа 3-бета (GSK3B) – фермент класса серин/треониновых протеинкиназ, участвующий во множестве внутриклеточных процессов. На рисунке 1.1 представлены ферменты, регулирующие ее активность, а также субстраты реакций. Обширное количество субстратов киназы, вовлеченность во многие сигнальные каскады (Nf-kB, инсулина,

бета-катенина, Wnt) отражает важность регулирования ее активности в организме для поддержания гомеостаза.

В настоящее время GSK3B является новой и перспективной мишенью для терапии СД2 [Maqbool, Hoda, 2017], воспалительных заболеваний [Phukan и др., 2010], болезни Альцгеймера [Lovestone и др., 2015], шизофрении, депрессии [Maes и др., 2012] и снижения резистентности опухолевых заболеваний [Czeleń, Szeffler, 2021; Ugolkov и др., 2018]. По данным авторов [Domoto и др., 2020; Maqbool, Hoda, 2017; Norwitz и др., 2019], при заболеваниях повышается активность GSK3B в тканях, что ведет к их прогрессированию.

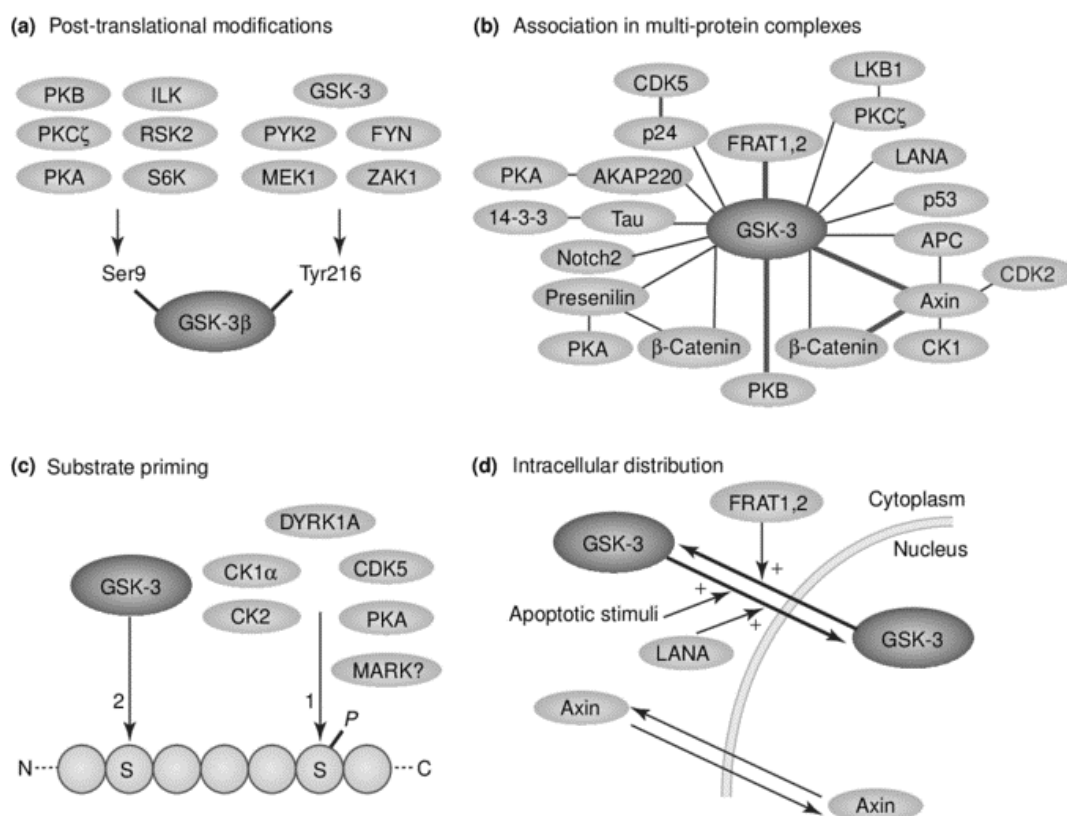


Рисунок 1.1. Возможные взаимодействия GSK3B в организме по [Beurel, Grieco, Jope, 2015]

Большой интерес представляет изучение роли GSK3B в развитии патогенеза СД2. На рисунке 1.2 представлена ее роль в сигнальном каскаде инсулинового рецептора. Так, основным ферментом, активность которого регулируется фосфорилированием GSK3B, является гликогенсинтаза, отвечающая за накопление глюкозы в виде гликогена. Кроме того, влияние на фактор обмена гуаниновых оснований 2Б показывает большую значимость GSK3B в процессе синтеза белка.

Кроме этого, GSK3B участвует во множестве внутриклеточных процессов через сигнальные каскады бета-катенина и Nf-kB, также задействованных в патогенезе СД2. По данным Dokken и др. (2008), выявлена взаимосвязь между чрезмерной активностью GSK3B и развитием инсулинорезистентности скелетных мышц. Liu и Yao (2016) в исследованиях

обнаружили, что повышенная активность GSK3B приводит к развитию ожирения и прогрессированию СД2.

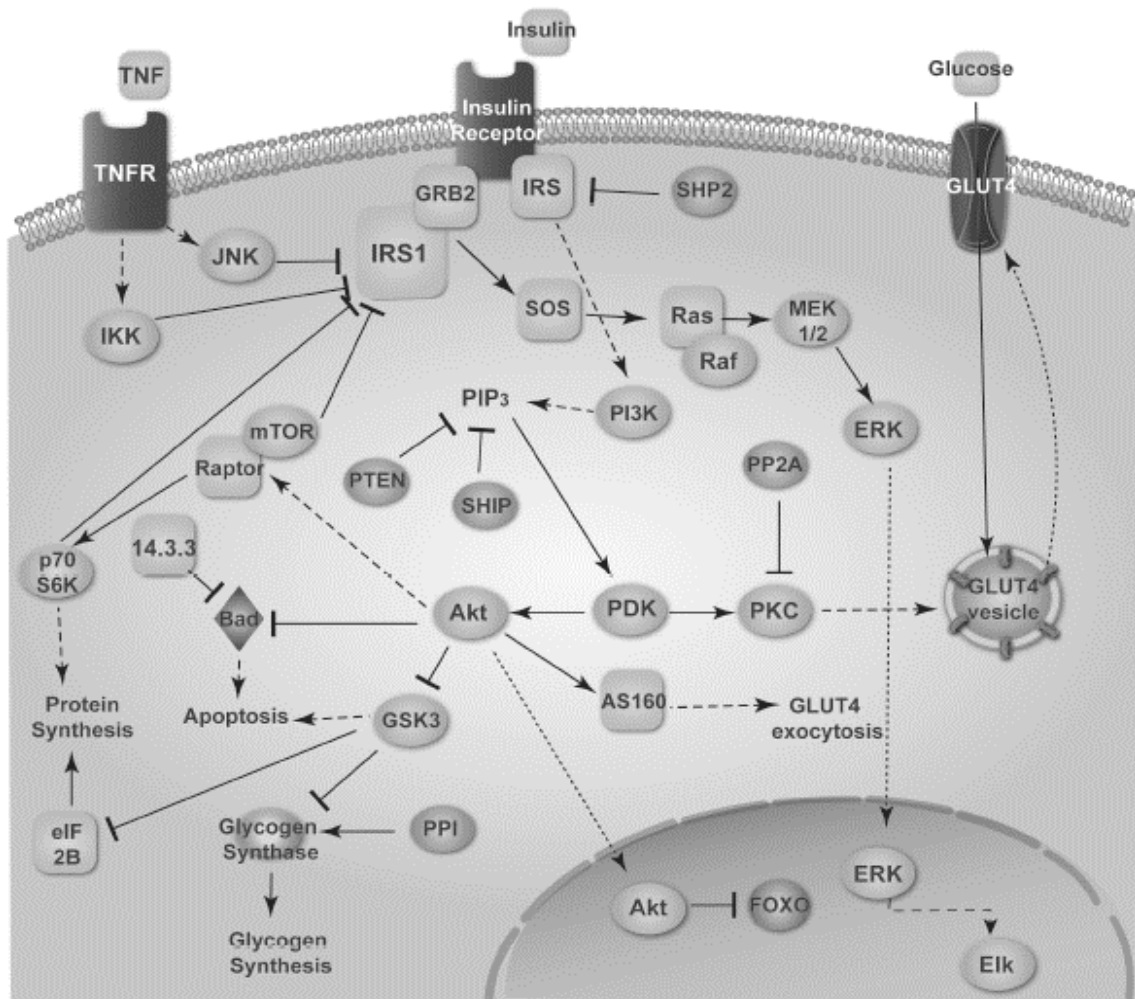


Рисунок 1.2. Роль GSK3B в передаче сигнала инсулинового рецептора
по [Wagman, Johnson, Bussiere, 2005]

По литературным данным, большой вклад в развитие инсулинорезистентности в организме вносит активация макрофагов жировой ткани под действием ненасыщенных жирных кислот. Активирование макрофагов происходит через сигнальный каскад Tlr4 рецептора (Рисунок 1.3) (что также характерно при развитии гиперцитокинемии, характерной при ковидоподобных заболеваниях [Kaushik, Bhandari, Kuhad, 2021; Khanmohammadi, Rezaei, 2021]). Выявлено, что GSK3B задействована как в Myd88-зависимом, так и в Myd88-независимом активировании данного каскада. При этом ее связывание с p50- и p65-субъединицами Nf-kB является необходимым для запуска дальнейшего каскада.

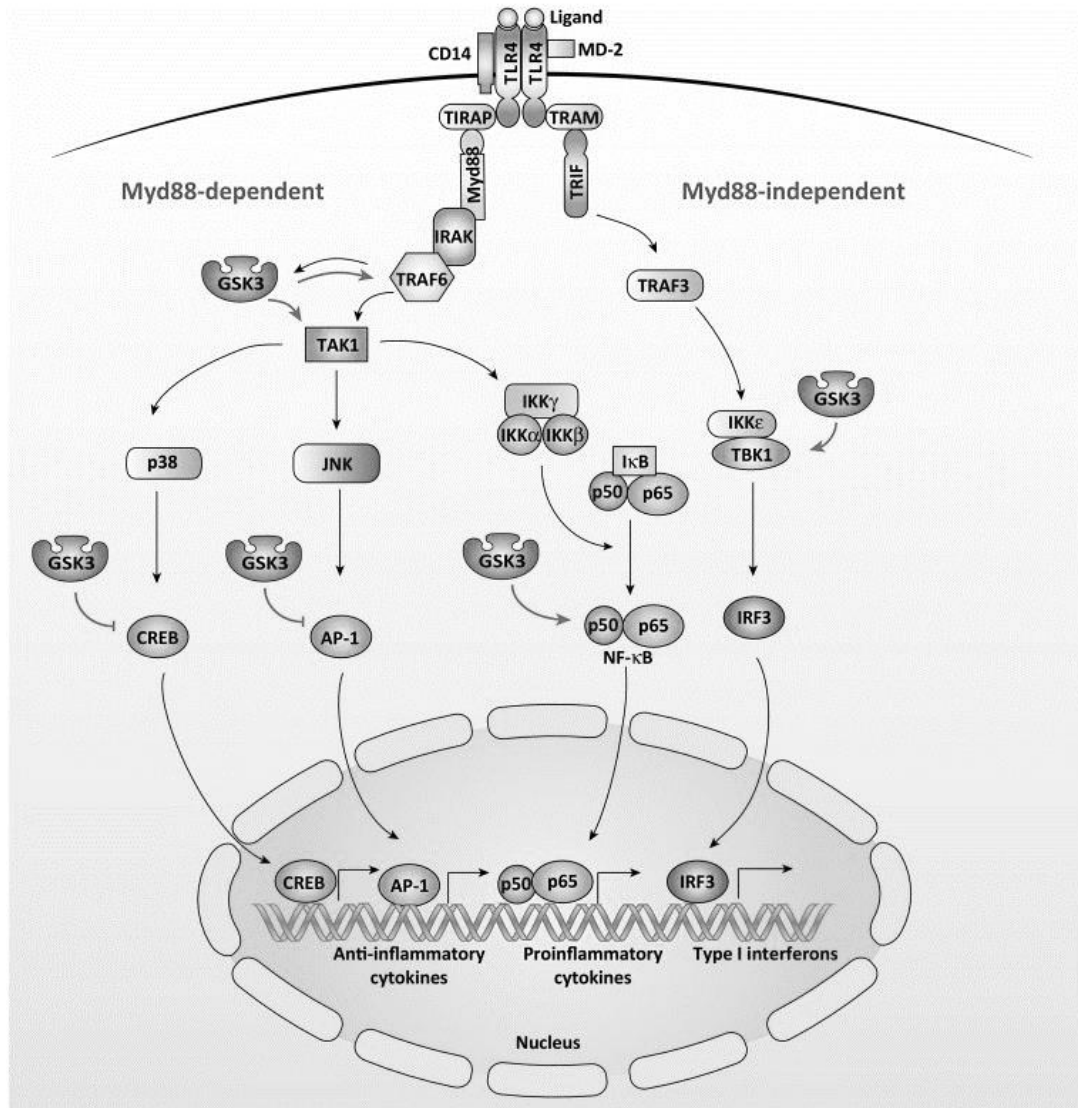


Рисунок 1.3. Сигнальный каскад Tlr4 рецептора по [Ко, Lee, 2016]

Повышение активности GSK3B характерно при развитии осложнений СД2. Так, выявлена ее роль в повышении агрегационной активности тромбоцитов [Li, August, Woulfe, 2008]. Формируемая эндотелиальная дисфункция при СД2 под действием активных форм кислорода и азота, а также при нарушениях в метаболической и воспалительной системах организма ведет к увеличению частоты возникновения артериальных тромбозов. По данным Yin и др. (2017), показана роль GSK3B в развитии тромбозов (Рисунок 1.4). Так, показана ее вовлеченность в сигнальный каскад коллагенового рецептора через сигнальный каскад бета-катенина и Nf-kB. По данным Jun и др. (2021), выявлена принципиальная роль GSK3B в предотвращении развития артериального тромбоза, индуцированного оксидативным стрессом и эндотелиальной дисфункцией.

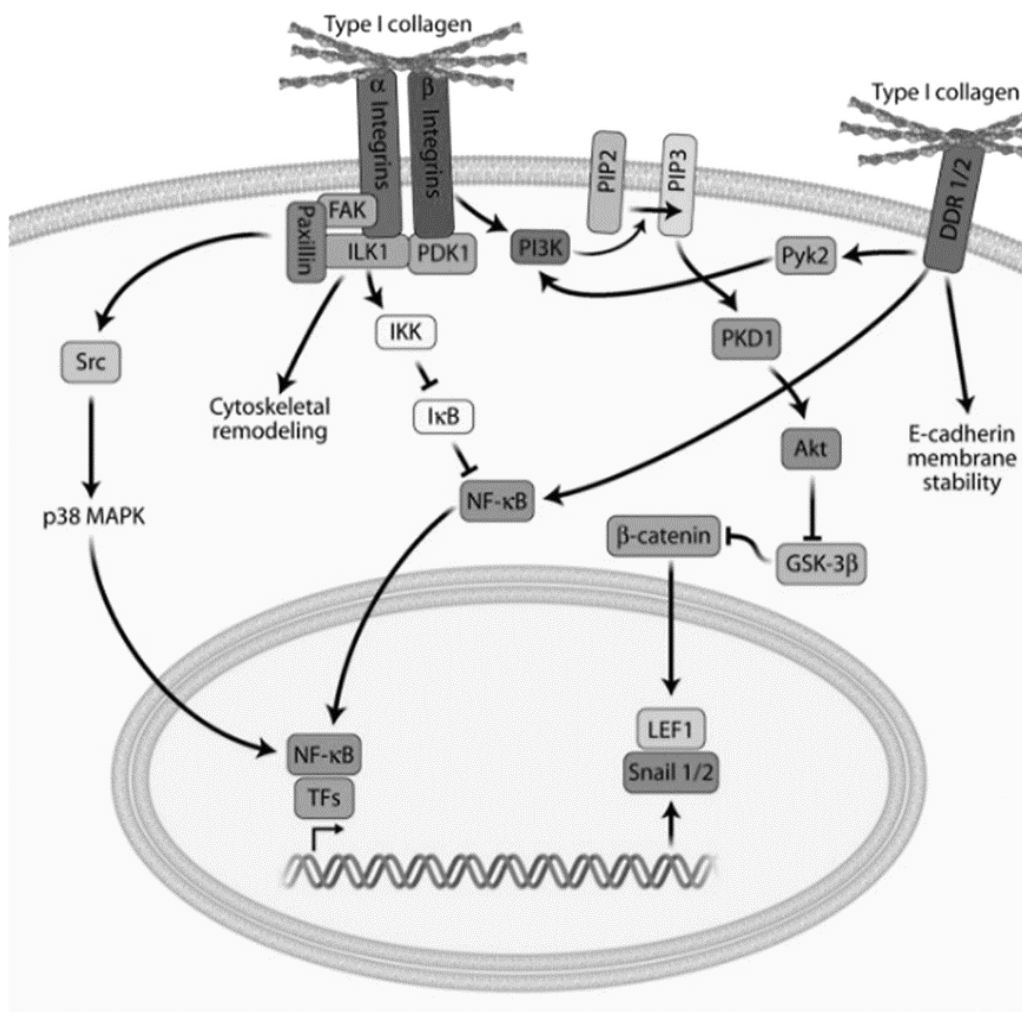


Рисунок 1.4. Сигнальный каскад агрегации, индуцированной коллагеном по [Barry и др., 2003]

По данным авторов [Antunes, Biala, 2012; Okun и др., 2012], выявлена взаимосвязь формирующихся при СД2 нарушениях в поведенческой активности и способности к обучению с повышенной активностью GSK3B мозга (Рисунок 1.5). Так, при СД2 в головном мозге повышается активность GSK3B, что приводит к развитию оксидативного стресса, нарушению инсулинорезистентности и развитию воспалительного процесса. Данные изменения влияют на поведенческую активность, вызывая состояния, сходные со стрессовыми, при этом увеличивается гибель нейронов и изменяется процесс нейрогенеза. Данный процесс затрагивает многие сигнальные системы организма, исходя из чего можно выделить GSK3B как одно из связующих звеньев для коррекции подобных изменений.

В результате анализа литературы мы видим, что киназа гликогенсинтазы типа 3 бета представляет большой интерес для поиска новых препаратов с антидиабетической активностью, оказывающих плеiotропную активность на многие звенья патогенеза заболевания.

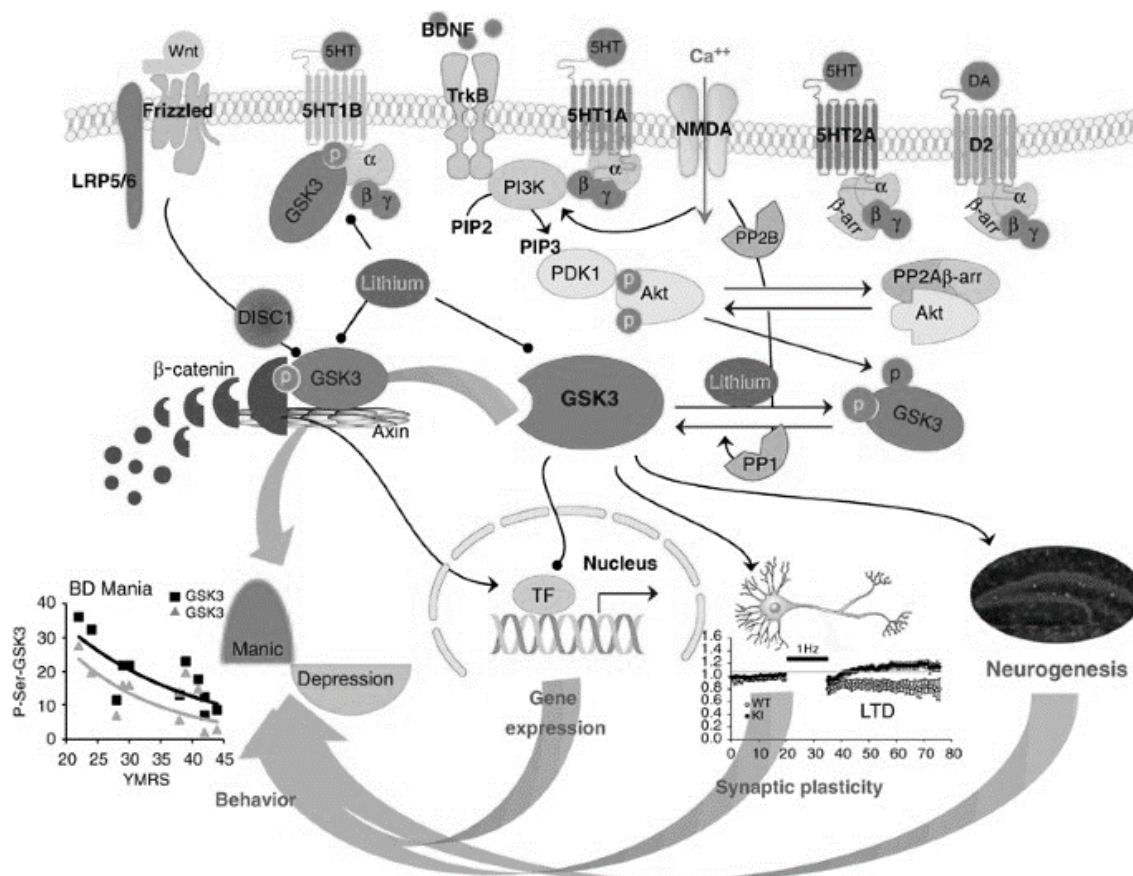


Рисунок 1.5. Взаимосвязь GSK3B и нарушений поведенческой активности при СД2 по [Li, Jope, 2010]

Эффекты ингибиторов GSK3B

По данным литературы, GSK3B является валидной мишенью для терапии СД2 [Maqbool, Noda, 2017]. На животных моделях СД2 было показано, что ингибирование GSK3B приводит к дефосфорилированию и активации гликогенсинтазы, что, в свою очередь, приводит к усилению захвата и метаболизма глюкозы [Kim K. M. и др., 2015]. В ряде работ было показано, что использование низкомолекулярных ингибиторов GSK3B приводит к снижению инсулинорезистентности тканей, увеличению выживаемости и пролиферации бета-клеток поджелудочной железы, а также значительному улучшению состояния модельных животных с СД2 [Dokken и др., 2008]. Также показано увеличение экспрессии Glut2 и инсулина, а также повышение секреции инсулина посредством восстановления активности PDX1 (фактор промотора инсулина 1) в бета-клетках островков Лангерганса при СД2 [Sacco и др., 2019].

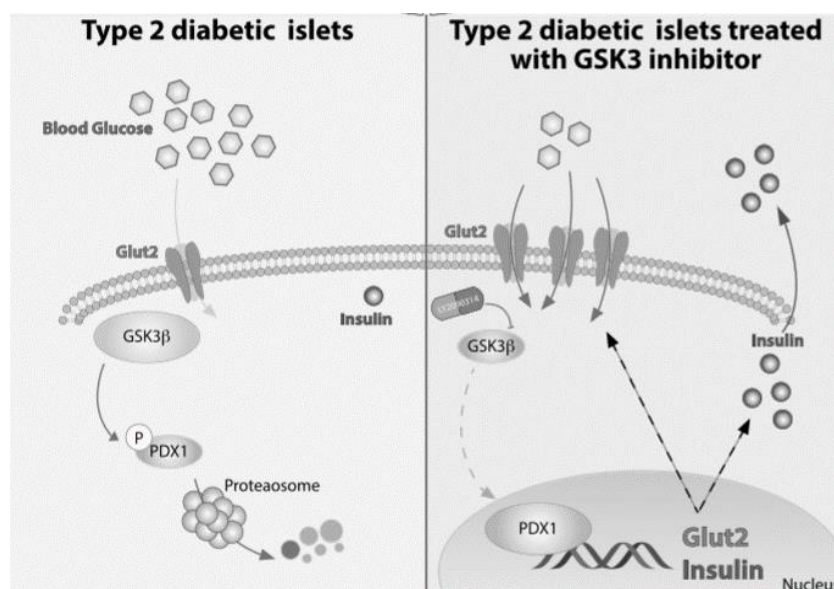


Рисунок 1.6. Влияние ингибитора GSK3B
на продукцию инсулина и Glut2 по [Sacco и др., 2019]

Предполагается также перспективным использование малых молекул для коррекции осложнений, вызванных СД2, таких как: замедленное ранозаживление, нефро- и ретинопатия [Кароог и др., 2008; Paeng и др., 2014]. Согласно современным представлениям о патогенезе СД2, большое значение в нем имеет системный воспалительный процесс, а также оксидативный стресс, которые впоследствии приводят к инсулинорезистентности периферических тканей и опосредуют глюкотоксичность и липотоксичность. Так, в литературе показана взаимосвязь между гипергликемией, развитием оксидативного стресса, дисфункцией бета-клеток и индуцированной глюкозой секреции выделения инсулина [Santos Dos, Tewari, Mendes, 2019]. В том числе показана взаимосвязь развития таких осложнений СД2, как: ретинопатии, нефропатии, нейропатии и сосудистые осложнения с повышенным уровнем активных форм кислорода и азота в организме [Goh, Cooper, 2008; Santos Dos, Tewari, Mendes, 2019; Wu и др., 2020]. В связи с этим большое значение приобретает наличие у ингибиторов GSK3B противовоспалительного эффекта, опосредованного влиянием на сигнальный путь NF-kB, что приводит к противовоспалительному репрограммированию макрофагов. Так, ингибиторы GSK3B приводят к снижению синтеза оксида азота и миграции макрофагов, снижению хемотаксиса моноцитов путем уменьшения количеств цитокинов Msp1 и Msp3, уменьшению количества провоспалительных цитокинов (ФНО-альфа, ИЛ-1бета, ИЛ-6) и увеличению количества противовоспалительного ИЛ-10 [Kim K. M. и др., 2015; Wang и др., 2018]. В литературе для ингибиторов GSK3B показано снижение уровня оксидативного стресса и увеличение выживаемости гепатоцитов на клеточных линиях и модельных животных [Park и др., 2015].

Выявленные эффекты, свойственные для ингибиторов GSK3 β , позволяют сделать вывод, что данный класс средств является перспективным для разработки новых антидиабетических средств. При этом наличие противовоспалительной, иммуностропной, антиоксидантной и антиагрегантной активностей показывают их эффективность при отдаленных осложнениях СД2.

Альфа-глюкозидаза

Это обширная группа гликозил-гидролаз, способных расщеплять полисахариды до ди- и моносахаридов. В зависимости от субстратной специфичности выделяют несколько ферментов: амилаза, мальтаза, изомальтаза, сахараза, декстриназа и глюкоамилаза (Рисунок 1.7).

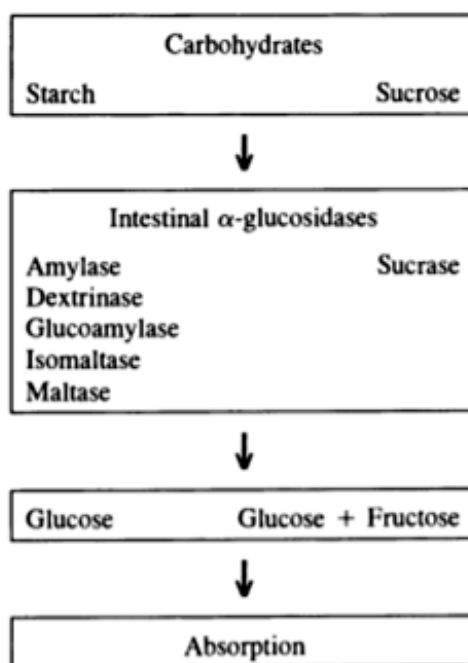


Рисунок 1.7. Представители ферментов типа альфа-глюкозидазы

Общим признаком ферментов данной группы является гидролизующая активность альфа-1,4-связей на нередуцирующем конце альфа-1,4-гликанов, отщепляющая глюкозу в альфа-форме [Zhang и др., 2015]. Наибольшее распространение в организме данный фермент имеет в желудочно-кишечном тракте.

В настоящее время разработано несколько *in vitro* методик для поиска соединений, влияющих на его активность. Так, показано высокое сходство между продуцируемым человеком, лабораторными животными (крысы) и получаемым в промышленных масштабах из *E. Coli*. Наибольшее распространение при скрининге соединений имеет фермент *E. Coli*, однако в литературе показано отличие некоторых его аллостерических центров [Xie и др., 2011].

В качестве фермента лабораторных животных используют сухой бензольный экстракт желудочно-кишечного тракта крыс. При этом присутствие в нем не только альфа-глюкозидазы, а также других ферментов ЖКТ является недостатком его использования.

Исходя из активности ферментов, ингибиторы альфа-глюкозидазы применяются для терапии СД2 и болезни Помпе.

Эффекты ингибиторов альфа-глюкозидазы

В настоящее время в клинической практике используются 4 лекарственных препарата, обладающие ингибирующей альфа-глюкозидазу активностью: акарбоза, воглибоза, миглитол и 1-дезоксиноиримицин (1-ДНМ). В России для использования разрешены два из них (акарбоза и воглибоза). Структурные формулы препаратов представлены на рисунке 1.8.

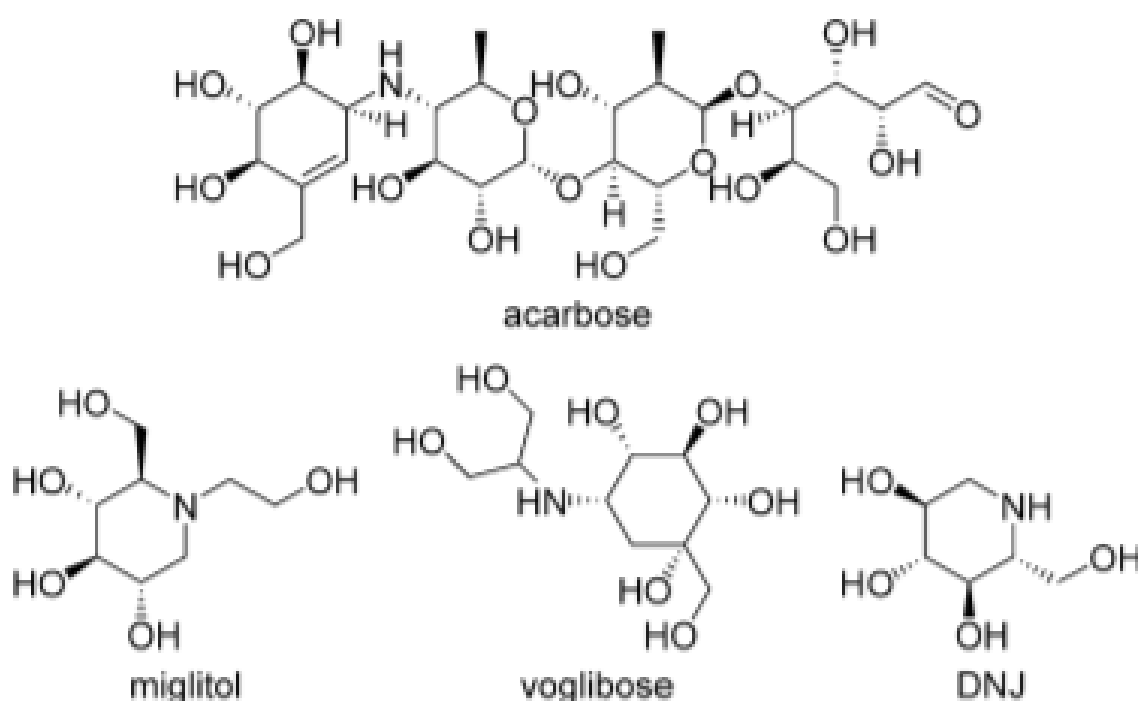


Рисунок 1.8. Химическое строение применяемых в клинической практике ингибиторов альфа-глюкозидазы

Используемые в настоящее время препараты структурно относятся к классу сахаридомиметиков и являются ингибиторами активного центра альфа-глюкозидаз. Акарбоза, миглитол и 1-ДНМ относятся к невсасываемым в ЖКТ препаратам [Ghani, 2015]. В литературе описано аллостерическое влияние структурно разнородных соединений на альфа-глюкозидазы: халконов [Liu, Ma, 2017], флавоноидов [Ryu и др., 2010; Wu и др., 2016], тритерпеноидов [Lai и др., 2012], бензотиазолов [Gollapalli и др., 2019], бензимидазолов [Singh и др., 2018], хроменов [Spasov и др., 2019], 2-оксиндолов [Khan и др., 2014].

Для данного класса препаратов характерен большой спектр антидиабетических эффектов: улучшение гликемического контроля, повышение уровня инсулина, снижение толерантности к глюкозе, предотвращение снижения экспрессии GLUT4, снижение уровня гликированного гемоглобина и конечных продуктов гликирования [Hofmann и др., 2012]. Данные эффекты препаратов выявляются при соблюдении показанной для пациентов диеты. Также показано влияние на липидный обмен, в частности снижение уровня общего холестерина и триглицеридов печени. По данным Dabhi, Bhatt, Shah (2013), ингибитор альфа-глюкозидазы приводит к снижению массы тела, что является важным положительным эффектом при терапии СД2. Saul и соавт. (1985) показали, что использование всасываемого в ЖКТ ингибитора альфа-глюкозидазы приводит к снижению гликогенолиза и увеличению содержания гликогена в печени. В скелетных мышцах обнаружено что ингибирование альфа-глюкозидазы приводит к улучшению базального и стимулированного инсулином поглощения глюкозы, а также к предотвращению снижения экспрессии GLUT-4 [Bischoff, 1995]. Выявлено влияние на поздние осложнения сахарного диабета: предотвращение почечных изменений, замедление развития полинейропатии и снижения скорости нервной проводимости [Hamada и др., 1989; Hofmann и др., 2012]. В ретроспективном метаанализе эффективности применения ингибиторов альфа-глюкозидазы показано значимое влияние на выраженность и частоту возникновения осложнений СД2, связанных с сердечно-сосудистой системой [Patel, 2015]. За счет улучшения гликемического контроля ингибиторы альфа-глюкозидазы снижают уровень гликированных белков, гликированного гемоглобина и конечных продуктов гликирования [Ghani, 2015]. Обнаружено влияние на микробиоту кишечника, измененную под влиянием СД2. Так, по данным Smith и др. (2018), под воздействием акарбозы показано восстановление количества бактерий родов *Bacteroidales*, *Bifidobacter* и *Clostridium*, а также уровня короткоцепочечных жирных кислот.

Широкий спектр антидиабетических эффектов применяемых средств, влияние на развивающиеся осложнения СД2, при отсутствии риска гипергликемии, показывает важность данного класса средств для терапии. Однако ограничением его применения служит высокая частота возникающих побочных эффектов, что показывает важность поиска новых молекул.

Побочные эффекты ингибиторов альфа-глюкозидазы и способы их коррекции

Основным ограничивающим моментом применения ингибиторов альфа-глюкозидазы для терапии СД2 является наличие широкого спектра побочных эффектов для препаратов, объясняемых механизмом их действия. Так, при несоблюдении прописанной диеты часто возникает вздутие и боли в животе, диарея, метеоризм, повышенное газообразование [Furman, 2007]. Связано это с процессом переваривания дисахаридов микробиотой кишечника

(процессы брожения). Развитие данных побочных эффектов снижает комплаентность пациентов к лечению. Кроме этого, для отдельных препаратов выявлены собственные побочные эффекты, например: фульминантный гепатит, отек, кишечная непроходимость, желтуха, пневмотоз для акарбозы.

В связи с этим учеными проводятся поиски путей для снижения частоты возникновения побочных эффектов данного класса препаратов. Так, по данным Dabhi, Bhatt, Shah (2013), для препарата воглибоза характерно снижение частоты возникновения побочных эффектов за счет всасывания его в желудочно-кишечном тракте. По результатам исследований других авторов [Asghari и др., 2015], показано уменьшение выраженности побочных эффектов ингибиторов альфа-глюкозидазы, влияющих на аллостерический центр фермента. Исходя из полученных результатов, в настоящее время перспективным направлением является поиск аллостерических ингибиторов альфа-глюкозидазы, всасываемых в ЖКТ, для снижения частоты и выраженности проявления побочных эффектов.

Заключение

Исходя из данных, представленных в обзоре литературы, можно сделать вывод, что 2-оксиндольный скаффолд является перспективным для поиска соединений, влияющих на активность киназы гликогенсинтазы типа 3 бета и альфа-глюкозидазы, а также оказывающих противовоспалительное и иммулотропное действие (что также характерно для ингибиторов GSK3B). Дополнительные плеiotропные эффекты (противовоспалительное действие и благоприятный иммулотропный профиль) потенцируют антидиабетическую активность, влияя на хроническое подострое воспаление, являющееся одним из главных звеньев патогенеза СД2.

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, 2012]. Все эксперименты были одобрены Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер IRB0005839 IORG0004900 (OHRP), протокол № 2021/042 от 29 апреля 2021 года. Эвтаназию животных проводили согласно требованиям, изложенным в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1997).

2.2. Перечень используемых реактивов и веществ

Для исследований использованы реактивы: гидроокись калия (ООО АГАТМЕД, Россия), гидрокарбонат натрия, альфа-глюкозидаза рекомбинантная *S. cerevisiae* (Sigma #G0660, США), 4-нитрофенил-а-D-глюкопиранозид (Sigma, США), сахароза (Sigma, США), мальтоза (Sigma, США), кальций хлористый 2-водный, D-глюкоза (безводная), калий хлористый, магний хлористый 6-водный, магния сульфат, калий фосфорнокислый однозамещённый, калий фосфорнокислый двузамещенный, натрий хлористый, натрий фосфорнокислый двузамещенный, натрия хлорид 0,9 % (Эском, Россия), хлорид железа (III) (ч., «Мосреактив» Россия); сульфат железа (Диа-М, Россия); 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), диметилсульфоксид (ДМСО) (Fisher Scientific, США), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (MP Biomedicals, Inc., Франция), таблетки фосфатно-солевого буфера pH 7,4 (ООО «ПанЭко», Россия), киназа гликогенсинтазы 3-бета человеческая рекомбинантная (Sigma, США), HEPES (GERBU, Германия), Tween 20 (Fisher Scientific, США), Tween 80 (Fisher

Scientific, США), АДФ (Sigma, США), люминол (Serva, Германия), соли Хенкса (HBSS), не содержащие Ca, Mg, бикарбонат Na и фенол. кр. (Biosera, Франция), пенициллин-стрептомицин 100-х лиофил. трихлоруксусная кислота (ТХУ) (Fisher Scientific, США), 1,4- дитиотрептоил (ДТТ) (Sigma, США), киназа гликогенсинтазы рекомбинантная человеческая (Sigma, США), динатриевая соль аденозин-5-трифосфорной кислоты (АТФ) (Sigma, США); натриевая соль β -никотинамидадениндинуклеотид фосфата (Sigma, США), тромбин (Sigma, США), перекись водорода 30% (ООО АО РЕАХИМ, Россия), стрептозотоцин (Sigma, США, физиологический раствор (ООО «Мосфарм» Россия), хлоралгидрат (Panreac Química S.L.U., Испания), двухфазный инсулин «ХУМУЛИН МЗ» (Eli Lilly, Франция), коллаген (Sigma, США), цитрат натрия (ч.д.а., Реахим, Россия), бычий сывороточный альбумин (BSA) фракции V (BioWest, Франция), ЛПС *E. coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, США), раствор МТТ (Sigma, США), Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США), реактив Элмана (дитионитробензойная кислота) (Sigma, США), стерильный раствор Хенкса (ПанЭко, Россия), реактив Грисса (Sigma, США), среда DMEM с глутамином, содержание глюкозы 4,5 г/л («ПанЭко», Россия); сыворотка крови эмбриональная телячья (Biosera, Франция); гентамицин («НПО Микроген», Россия), пептон ферментативный («ДиаМ», Россия), («ПанЭко», Россия), бальзам канадский для микроскопии («Panreac», Испания), зимозан А («Sigma», США), комплемент сухой (НПО «Микроген», Россия), акридиновый оранжевый («ПанЭко», Россия), нитросиний тетразолий-п (хлорид) (НСТ) >90 % («Sigma», США), дрожжи хлебопекарные сухие («Dr. August Oetker Nahrungsmittel KG», Германия), натрия хлорид, раствор для инфузий 0,9 % (ОАО НПК «Эском», Россия), фрагмент мышечной гликоген синтазы типа 1 (Sigma, США), среда RPMI 1640 («ПанЭко», Россия).

Наборы: набор для измерения активности киназ ADP-Glo™ (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 для определения концентрации глюкозы в плазме крови глюкозооксидазным методом («Фармацевтика и клиническая диагностика», Россия), набор для количественного определения инсулина в сыворотке и плазме крови Human Insulin ELISA Kit, набор для определения фактора некроза опухолей Rat TNF- α ELISA Kit (Cloud-Clone Corp., Китай) набор для определения фактора некроза опухолей Mice TNF- α ELISA Kit (BD Biosciences Pharmingen, США), набор реагентов для определения концентрации триглицеридов в сыворотке и плазме крови Triaglyceroly Liquid 250 S (Erba Lachema, Чехия).

Красители: краситель Азур-Эозин по Романовскому Минимед (ООО «МиниМед», Россия), фиксатор-краситель по Май-Грюнвальду Минимед (ООО «МиниМед», Россия).

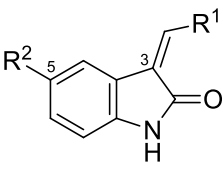
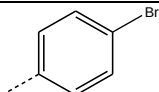
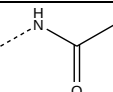
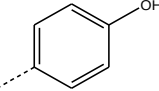
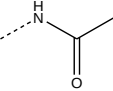
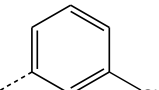
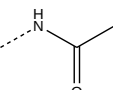
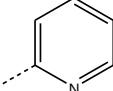
В качестве препаратов сравнения были использованы: SB216763 (Sigma, США), вилдаглиптин (Novartis, Россия), акарбоза (Sigma, США), метформин (ООО Озон, Россия),

вилдаглиптин (Новартис, Россия); ацетилсалициловая кислота (Sigma, США); кверцетин (Диа-М, Россия); дексаметазон (M.J.Biopharm, Индия); целекоксиб (ВЕРТЕКС АО, Россия).

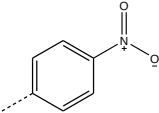
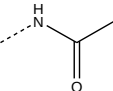
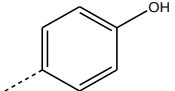
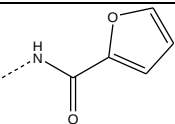
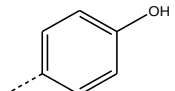
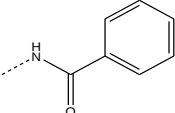
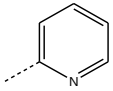
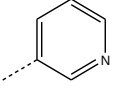
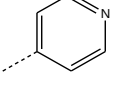
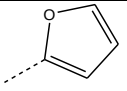
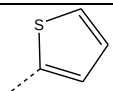
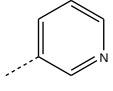
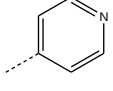
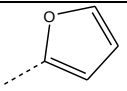
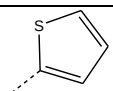
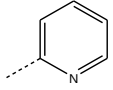
Изучено 27 производных под лабораторными шифрами «К» и «ОИР», 20 из которых относится к производным 3-арилиден-2-оксиндола, 7 соединений – к производным 3,3-дизамещённых-2-оксиндолов (Таблица 2.1). Исследуемые вещества были синтезированы в Московском государственном университете имени М. В. Ломоносова (МГУ) под руководством доцента, канд. хим. наук Н. А. Лозинской¹.

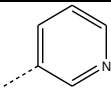
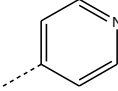
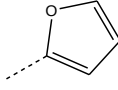
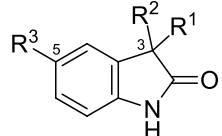
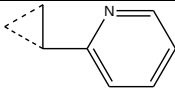
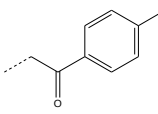
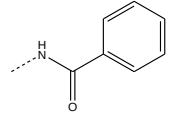
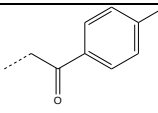
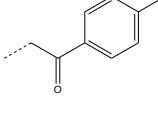
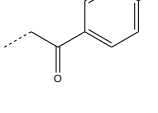
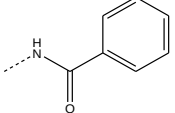
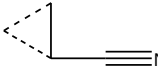
Таблица 2.1

Химическое строение исследованных новых производных 3-арилиден-2-оксиндола и 3,3-дизамещённых-2-оксиндолов

3-арилиден-2-оксиндолы			
			
№	Шифр соединения	R ¹	R ²
1	K-127		
2	K-165		
3	K-166		
4	K-167		H

¹Выражаем глубокую признательность сотрудникам Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (МГУ): доценту кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза, канд. хим. наук Н. А. Лозинской за синтез и предоставление субстанций веществ для данной работы.

№	Шифр соединения	R ¹	R ²
5	K-170(1)		
6	K-246		
7	K-248		
8	OIP-Br-2		Br
9	OIP-Br-3		Br
10	OIP-Br-4		Br
11	OIP-Br-O		Br
12	OIP-Br-S		Br
13	OIP-H-3		H
14	OIP-H-4		H
15	OIP-H-O		H
16	OIP-H-S		H
17	OIP-NO ₂ -2		NO ₂

№	Шифр соединения	R ¹	R ²	
18	OIP-NO ₂ -3		NO ₂	
19	OIP-NO ₂ -4		NO ₂	
20	OIP-NO ₂ -O		NO ₂	
3,3-дизамещённые-2-оксиндолы				
				
№	Шифр соединения	R ¹	R ²	R ³
1	K-215			H
2	K-237		OH	
3	K-231		OH	OMe
4	K-229		OH	Br
5	K-183(1)		OH	H
6	K-223	NCCH ₂	OH	
7	M-CPN		Br	

2.3. Список используемого оборудования и программного обеспечения

Термошейкер для планшетов PST-60HL (Biosan, Латвия), pH-метр pH213 (HANNA Instrumento, Германия), магнитная мешалка MSH-300 (Biosan, Латвия), весы лабораторные Adventurer AR2140 (OHAUS Europe, Швейцария), холодильник-морозильник ХМ-6021-000 (ЗАО «Атлант», Беларусь), Камера для счета форменных элементов крови (камера Горяева), 4-х сет., исп. 3 (ООО «МиниМед», Россия), весы Scout Pro SPU601 (OHAUS, США), центрифуга MultiCentrifuge CM-6M (Elmi, Латвия), микроцентрифуга Minispin (Eppendorf, Германия), вортекс Elmi V-3 (Elmi, Латвия), микропланшетный ридер Infinite M200 (Tecan, Швейцария), гомогенизатор Ultra Turrax T10 (Ikawerk, Janke and Kunkel Inc., Германия), термостат воздушный BINDER BD 115 (115 л) (Германия), металлический гастральный зонд (ОАО «МИЗ-Ворсма», Россия), ультразвуковой доплерограф («Минимакс-Допплер-К» Санкт-Петербург), биохимический анализатор Biosen C_Line (EKF Diagnostics, Германия), ультразвуковая ванна 4,0 л (Сапфир, Россия), центрифуга SIGMA 2-16KL универсальная с охлаждением, до 15 300 об./мин (Sigma Laborzentrifugen, Германия); глюкометр «Глюкокард» (ООО «АРКРЭЙ», Россия); тест-полоски для глюкометра «Глюкокард Сигма-Мини» (ООО «АРКРЭЙ», Россия); ветеринарный тонометр для измерения ВГД (Topovet, Финляндия); агрегометр Biola 220 LA (ООО НФП «Биола», Россия); двухканальный анализатор агрегации тромбоцитов ChronoLog-700 Lumi- Aggregomete (Chronolog, США), кюветы стеклянные (Chronolog, США), планшет Nunc 96 Flat Bottom White (Nunc 267350 U96 Microwell, Дания), 96-луночные прозрачные планшеты (SPL Life Sciences Co., Ltd., Корея), планшет 96-луночный с плоским дном черный (Greiner #655076, Австрия), планшет 96-луночный с плоским дном UV-прозрачный (Corning #3635, Австрия); чашки Петри («Минимед», Россия); плетизмометр (Ugo Basil, Италия), открытое поле для мышей (Open Science, Россия); ламинарный шкаф SafeFAST Elite – S/D, 2-й класс защиты (Faster, Италия); микроскоп медицинский «МИКМЕД-6» (люминесцентный) с цифровой камерой высокого разрешения (АО «ЛОМО», Россия); CO₂-инкубатор (Binder, Германия); двухканальный анализатор агрегации тромбоцитов ChronoLog-700 Lumi-Aggregometer («Chronolog», США); кюветы стеклянные («Chronolog», США); магнитные мешалки («Chronolog», США).

Для исследований использовано следующее программное обеспечение: программный пакет ChemOffice 8.0 (CambridgeSoft, США), ПО i-control™ для микропланшетных ридеров Tecan (Tecan, Швейцария), CellProfiler (Broad Institute, США), AutoDock Vina (The Scripps Research Institute, США), Discovery Studio Visualizer (DASSAULT SYSTEMS, США), DataWarrior (OPENMOLECULES, США), графический редактор MarvinSketch 17.1.23 (MarvinSketch, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программных пакетов GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, США), Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office, США).

2.4. Экспериментальные животные

Фармакологические исследования проводились на лабораторных животных: 90 нелинейных крысах-самцах массой 200–350 г (филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, ветеринарное свидетельство № 860665249 от 01.10.18 г.); 60 нелинейных мышах-самцах массой 20–30 г (ООО «НИЦ БМТ», ветеринарное свидетельство № 0725507 от 01.09.17 г.); 70 мышах-самцах линии C57bl/6J массой 20–23 г (ООО «НИЦ БМТ», ветеринарное свидетельство № 1376917942 от 24.01.19 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 °С на 41-й 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. Методы скрининга фармакологических свойств новых производных 2-оксиндола *in vitro*

Согласно проведенному анализу литературы, можно сделать вывод, что наиболее перспективным при изучении новых производных 2-оксиндола является определение влияния на активность киназы гликогенсинтазы типа 3 бета и альфа-глюкозидазы

2.5.1. Методика изучения влияния соединений на активность киназы гликогенсинтазы (GSK3B)

Активность киназы гликогенсинтазы человеческой рекомбинантной (GSK3B; Sigma, США) определяли люминесцентным методом по измерению уровня люминесценции в люциферазной реакции. Анализ проводили при 25 °С в 96-луночном белом полистиреновом

планшете с плоским дном (Nunc 267350 U96 Microwell, Дания), в конечном инкубируемом объеме 25 мкл [Ап и др., 2010]. Все используемые реактивы приготавливались в 40 mM Трис-НСl буферном растворе (pH 7.5), содержащем 20 mM хлорида магния, 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина и 50 мкМ дитиотриэтола. Инкубационная смесь содержала: 2 нг/мл раствора GSK3B, 0,2 мг/мл фрагмента мышечной гликоген синтазы типа 1 (Sigma, США), 25 мкМ раствора АТФ, а также исследуемое вещество или буферный раствор. Исследуемые соединения вносили в буферный раствор и предварительно инкубировали с GSK3B в термостатируемом шейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) в течение 10 мин до достижения температурного равновесия, а затем инициировали реакцию введением субстрата. За меру активности GSK3B принимали повышение уровня люминесценции через 60 минут после инициации реакции и использования набора для измерения активности киназы по АДФ ADP-Glo™ Kinase (Promega, США), время интегрирования 500 мс. Измерения проводили на микропланшетном ридере Tecan Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия).

Активность веществ определялась в конечной концентрации 10 мкМ. Для соединений, снижающих активность GSK3B более чем на 50 % по отношению к контрольному уровню, выполнялись исследования в диапазоне концентраций от 1 нМ до 50 мкМ.

Оценку полученных результатов для веществ проводили в сравнении с известным по литературным данным ингибитором GSK3B-SB216763 (Sigma, США) [Coghlan и др., 2000].

2.5.2. Методика изучения влияния соединений на активность альфа-глюкозидазы (AG)

Активность альфа-глюкозидазы *S. cerevisiae* (Sigma #G0660, США) определяли спектрофотометрическим методом по измерению оптической плотности продукта реакции 4-нитрофенола. Анализ проводили при 37° в 96-луночном прозрачном полистиреновом планшете с плоским дном (Costar 9018, США), в конечном инкубируемом объеме 100 мкл. Все используемые реактивы приготавливались в 0,1 М натрий-фосфатном буферном растворе (pH 6,8). Инкубационная смесь содержала: 25 мкл 1 нг/мл раствора AG, 25 мкл 5 mM раствора 4-нитрофенил-α-D-глюкопиранозид (Sigma, США), 50 мкл исследуемого вещества или буферного раствора. Исследуемые соединения вносили в буферный раствор и предварительно инкубировали с AG в термостатируемом шейкере PST-60HL (Biosan, Латвия) в течение 5 мин до достижения температурного равновесия, а затем инициировали реакцию введением субстрата [Spasov и др., 2019]. За меру активности AG принимали повышение уровня оптической плотности при длине волны испускания 400 нм через 15 минут после инициации реакции. Измерения проводили на микропланшетном ридере Tecan Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия).

Активность веществ определялась в конечной концентрации 100 мкМ. Для соединений, снижающих активность АГ более чем на 55 % по отношению к контрольному уровню, выполнялись исследования в диапазоне концентраций от 100 нМ до 1 мМ.

Оценку полученных результатов для веществ проводили в сравнении с известным по литературным данным ингибитором АГ-акарбозой (Sigma, США) [Furman, 2007].

2.6. Методы исследования фармакологических свойств новых производных 2-оксиндола на клеточных культурах

В настоящее время большое распространение получило использование клеточных культур для проведения скрининговых исследований новых соединений, что снижает количество используемых животных в исследованиях и позволяет конкретизировать действие производного на живой организм.

2.6.1. Методы выделения и культивирования первичных клеточных культур

В данном исследовании использовался пул первичных клеток животных, благодаря чему нивелируются индивидуальные особенности организма, а также становится возможным оценить влияние соединения на популяцию в целом.

2.6.1.1. Метод выделения и культивирования первичных перитонеальных макрофагов и нейтрофилов мышей

Перитонеальные макрофаги (ПМ) и нейтрофилы выделяли из перитонеального экссудата белых беспородных мышей или мышей линии C57bl/6j [Вøyum, 1974]. Для аккумуляции ПМ внутрибрюшинно вводили 1 мл 3%-го раствора пептона. Через 3 суток для макрофагов или через 3 часа для нейтрофилов мышей подвергали эвтаназии цервикальной дислокацией. Клетки перитонеального экссудата получали, асептически промывая брюшную полость 5 мл стерильного раствора Хенкса (4–6 °С) без ионов кальция и магния. Подсчет общего количества клеток и оценку их жизнеспособности проводили в счетной камере Горяева (Россия) окраской 0,4%-м трипановым синим (Sigma-Aldrich, США). Доля живых клеток превышала 95 %. Концентрацию клеток доводили до $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в полной питательной среде DMEM (Gibco), дополненной 2 мМ L-глутамина (Gibco), 10 % инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой (BioClot, Германия), с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (Gibco). Высевали 200 мкл/лунку в 96-луночные прозрачные планшеты (SPL Life Sciences Co., Ltd., Корея). Оставляли на 2 ч при 37 °С в увлажненной

атмосфере с 5%-м CO₂, после чего лунки промывали для удаления неадгезивных клеток. После 24 часов инкубации отбирали 20 мкл супернатанта, вносили 20 мкл растворов тестируемых веществ и инкубировали в течение суток.

2.6.1.2. Метод выделения и культивирования первичных неонатальных фибробластов сердца крыс

Работу проводили на беспородных лабораторных крысах, в 2 этапа. На 1-м этапе получали суспензию клеток желудочков сердец новорожденных 1–2-суточных животных с помощью метода протеолитической диссоциации. Суспензию клеток сердца центрифугировали при 200 g в течение 5 минут. Для отделения фибробластов использовали метод селективной адгезии [Dubey и др., 1997; Villarreal и др., 1993]. После центрифугирования осадок ресуспендировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко», Россия) и гентамицином («НПО Микроген», Россия, 50 мкг/мл), высевали на чашки Петри («Минимед», Россия) и помещали в CO₂-инкубатор на 60 минут. По истечении времени инкубации среду осторожно собирали и переносили на новые чашки Петри. Процедуру повторяли дважды. При этом на старой чашке оставалась культура, обогащенная фибробластами, которую в дальнейшем использовали для получения чистой культуры сердечных фибробластов.

На 2-м этапе первично адгезированные клетки растили до монослоя (80%-я конфлюентность) и снова рассевали в соотношении 1:2. Жизнеспособность клеток оценивали окрашиванием 0,4%-м раствором трипанового синего («ПанЭко», Россия). Контроль чистоты клеточной культуры и состояния клеток в ходе экспериментов наблюдали с помощью инвертированного микроскопа. На протяжении эксперимента фибробласты культивировали в полной питательной среде DMEM с 10%-й сывороткой и гентамицином (50 мкг/мл) при 37 °C в увлажненной атмосфере, содержащей 5%-й CO₂ [Тао и др., 2014].

2.6.2. Методика изучения влияния соединений на утилизацию глюкозы первичными неонатальными фибробластами сердца крыс

Для изучения влияния веществ на утилизацию глюкозы для культивирования неонатальных фибробластов использовалась питательная среда DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л. После их инкубирования с соединениями в течение 24 ч отбирали по 5 мкл супернатанта для определения содержания глюкозы глюкозооксидазным методом («Фармацевтика и клиническая диагностика», Россия). Концентрация полученного хромогена определялась спектрофотометрически при длине волны 450 нм.

Активность веществ определялась в конечной концентрации 20 мкМ. Преобразование оптической плотности в клеточную активность проводили по калибровочной кривой (интактные клетки – 100 %, Тритон X-100 – 0 %).

2.6.3. Валидация методики изучения влияния соединений на синтез оксида азота и интерлейкина-6 первичными перитонеальными макрофагами мышей под влиянием липополисахарида (ЛПС)²

Липополисахарид (ЛПС) является провоспалительным агентом. Воспалительная реакция под его воздействием запускается через каскад Tlr4-рецепторов [Jerala, 2007]. Данный каскад является также важным в патогенезе СД2. Так как при нем происходит накопление свободных жирных кислот, которые активируют данный сигнальный путь и приводят к формированию хронического подострого воспаления и прогрессированию инсулинорезистентности [Davis и др., 2020]. Также данная методика широко используется для моделирования процессов, свойственных для гиперцитокинемии, и поиска новых препаратов, уменьшающих выделение провоспалительных факторов при инфекционно-воспалительных заболеваниях [Jerala, 2007].

Определение уровней синтеза оксида азота и интерлейкина-6 первичными перитонеальными макрофагами мышей под влиянием липополисахарида (ЛПС) проводилось согласно методикам, представленным ниже.

Методика определения уровня синтеза оксида азота

Накопление нитрит-аниона (стабильного конечного продукта распада NO, продуцируемого iNOS) в супернатантах после 20 ч инкубации клеток с липополисахаридом (ЛПС) определяли с помощью стандартного реактива Грисса. Метод Грисса основан на диазотировании нитрит-аниона в кислой среде сульфаниламидом и взаимодействии диазосоединения с N-(1-нафтил)этилендиамином с образованием окрашенного производного. 50 мкл супернатантов, отобранных спустя 22 часа после инкубации ПМ с тестовыми и контрольными соединениями, смешивали с 50 мкл 1%-го сульфаниламида в 2,5% H₃PO₄ и 50 мкл 0,1%-го N-(1-нафтил)этилендиамина в 2,5% H₃PO₄. После инкубации при 23 °С в течение 10 минут в термостатируемом шейкере определяли оптическую плотность при длине

² Исследования выполнены в рамках соглашения № 075-15-2020-777 от 1 октября 2020 г. о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации, г. Москва.

волны 550 нм. Преобразование оптической плотности в мкМ NO проводили по стандартной кривой (0–100 мкМ NaNO₂, разведенного в среде DMEM).

Методика определения уровня выработки интерлейкина-6

Клеточный супернатант после 20 ч инкубации клеток с липополисахаридом (ЛПС) центрифугировали при 1000 g 20 минут и определяли концентрацию интерлейкина-6 (IL-6) с помощью коммерческих наборов (Cloud-clone ELISA kit). В основе определения лежит принцип иммуноферментного анализа. Калибровка набора выполнялась по стандартному раствору интерлейкина-6 в диапазоне концентраций от 7,8 пкг/мл до 500 пкг/мл. В результате, получена калибровочная кривая, по которой определялась концентрация интерлейкина-6 в пробах (пкг/мл). Измерение проводили на микропланшетном ридере Infinite M200 Pro (Tecan, Австрия)

Для валидирования использования данных методик проведено 10 независимых серий экспериментов, в каждой из которых исследованы следующие группы: интактные клетки, клетки под влиянием ЛПС и группа препарата сравнения «Дексаметазона». Полученные первичные данные и рассчитанный критерий сходимости представлены в таблицах 2.2 и 2.3.

Таблица 2.2

Уровни синтеза оксида азота первичными перитониальными макрофагами мышей под воздействием липополисахарида и в присутствии дексаметазона ($M \pm m$)

№	Интактные клетки	Клетки под влиянием липополисахарида	Клетки под влиянием липополисахарида и дексаметазона (10 мкМ)
1	0,145	0,267	0,110
2	0,149	0,273	0,093
3	0,139	0,311	0,093
4	0,131	0,275	0,100
5	0,112	0,274	0,098
6	0,108	0,245	0,092
7	0,135	0,258	0,140
8	0,123	0,260	0,115
9	0,131	0,246	0,119
10	0,134	0,304	0,117
M	0,131	0,271*	0,108
m	0,013	0,022	0,015
CV [#]	9,92	8,11	13,88

CV – обозначения показателя сходимости методики;

* – статистически достоверно ($p < 0,05$) относительно группы интактных клеток, Т-тест

Уровни интерлейкина-6 первичными перитонеальными макрофагами мышей под воздействием липополисахарида и в присутствии дексаметазона ($M \pm m$)

№	Интактные клетки	Клетки под влиянием липополисахарида	Клетки под влиянием липополисахарида и дексаметазона (10 мкМ)
1	0,132	0,335	0,138
2	0,161	0,264	0,171
3	0,158	0,351	0,163
4	0,097	0,309	0,153
5	0,112	0,541	0,143
6	0,113	0,466	0,134
7	0,134	0,589	0,154
8	0,091	0,751	0,136
9	0,099	0,219	0,146
10	0,124	0,229	0,157
M	0,150	0,315	0,149
m	0,016	0,038	0,012
CV[#]	10,60	12,07*	8,16

CV – обозначения показателя сходимости методики;

* – статистически достоверно ($p < 0,05$) относительно группы интактных клеток, Т-тест.

Исследование сходимости методики рассчитывали по формуле:

$$CV = m/M \times 100 \%,$$

где, CV – сходимость метода, m – стандартное отклонение, M – среднее арифметическое.

Согласно полученным результатам рассчитанного критерия сходимости, данная методика может быть использована для поиска новых соединений, влияющих на уровень синтеза оксида азота и интерлейкина-6 (блокирующих гиперцитокинемию, «цитокиновый шторм»).

На рисунке 2.1 представлены результаты влияния дексаметазона в зависимости от концентрации на выработку первичных медиаторов воспаления (оксид азота, интерлейкин-6).

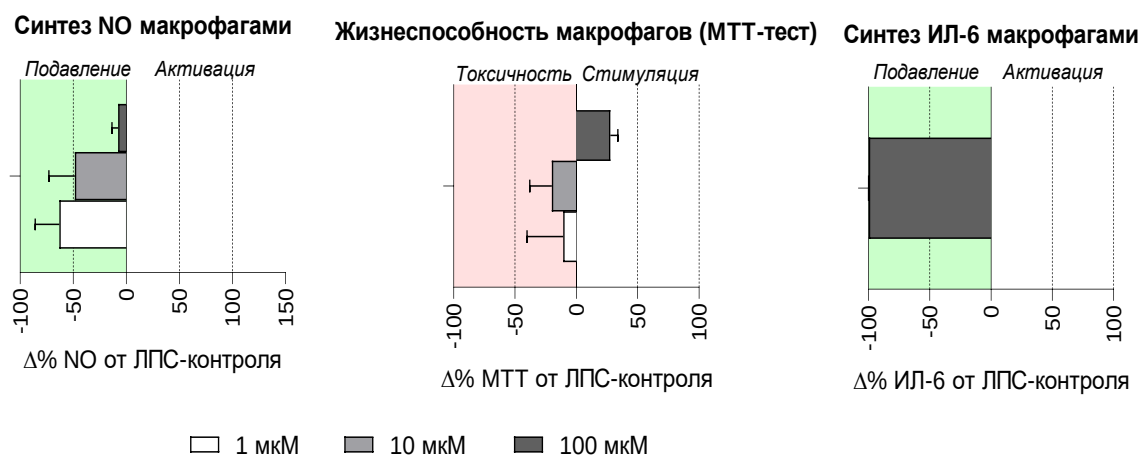


Рисунок 2.1. Влияние дексаметазона в зависимости от концентрации на синтез оксида азота, интерлейкина-6 и жизнеспособность первичных перитонеальных макрофагов ($M \pm m$)

2.6.4. Методика изучения влияния соединений на активацию первичных перитонеальных макрофагов мышей

После внесения в культуральную среду с перитонеальными макрофагами исследуемых веществ через час вносили ЛПС *E. coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали в течение 24 ч [Takeuchi и др., 1999]. Затем из общего объема лунки забирали 60 мкл клеточной среды, а к оставшимся 140 мкл супернатанта с клетками в микропланшете добавляли 50 мкл 0,15%-го раствора НСТ и 50 мкл 2 мг/кг раствора зимозана А. После инкубации при 37 °С в течение 30 минут в термостатируемом шейкере содержимое лунок аспирировали и добавляли 150 мкл 95%-го этанола с экспозицией 15 мин. Затем клетки дважды промывали и добавляли 70 мкл 2М раствора гидроксида калия. После инкубации при 60 °С в течение 30 минут в термостатируемом шейкере к полученной смеси добавляли 130 мкл ДМСО. Полученную смесь перемешивали в шейкере до полного растворения гранул восстановленного НСТ. Определяли оптическую плотность при длине волны 630 нм (референсная длина волны 490 нм).

Активность веществ определялась в диапазоне концентраций от 24,4 нМ до 100 мкМ.

Оценку полученных результатов для веществ проводили в сравнении с известными по литературным данным противовоспалительными препаратами – дексаметазоном и целекоксибом.

2.6.5. Методика изучения влияния соединений на фагоцитарную активность первичных перитонеальных макрофагов мышей в НСТ-тесте

После внесения в культуральную среду с перитонеальными макрофагами исследуемых веществ, через час вносили ЛПС *E. coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали в течение 24 ч [Jerala, 2007]. Затем из общего объема лунки забирали 60 мкл клеточной среды (для дополнительных исследований), а к оставшимся 140 мкл супернатанта с клетками в микропланшете добавляли 50 мкл 0,15%-го раствора НСТ и 50 мкл 2 мг/кг раствора опсонизированного зимозана А. После инкубации при 37 °С в течение 30 минут в термостатируемом шейкере содержимое лунок аспирировали и добавляли 150 мкл 95%-го этанола с экспозицией 15 мин. Затем клетки дважды промывали и добавляли 70 мкл 2М раствора гидроксида калия. После инкубации при 60 °С в течение 30 минут в термостатируемом шейкере к полученной смеси добавляли 130 мкл ДМСО [Hyung и др., 2006]. Полученную смесь перемешивали в шейкере до полного растворения гранул, восстановленного НСТ. Определяли оптическую плотность при длине волны 630 нм (референсная длина волны 490 нм).

Влияние веществ на фагоцитарную активность определялось в диапазоне концентраций от 2,7 нМ до 50 мкМ.

Оценку полученных результатов для веществ проводили в сравнении с известными по литературным данным противовоспалительными препаратами – дексаметазоном и целекоксибом.

2.6.6. Методика изучения влияния соединений на фагоцитарную активность первичных перитонеальных макрофагов мышей (микроскопия)

Перитонеальные макрофаги (ПМ) [Gordon, 2007] культивировали в 24-луночном планшете в объеме 500 мкл/лунку (10^5 клеток/мл) в течение 24 часов перед разделением на группы: интактные клетки; клетки, стимулированные ЛПС *E. coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, США); клетки, стимулированные опсонизированным комплементом зимозаном А; клетки, стимулированные обоими стимулами; а также клетки, обработанные исследуемым веществом или дексаметазоном в присутствии обоих стимулов. Через 24 ч инкубации с исследуемыми веществами среду удаляли. Клетки фиксировали красителем Мая – Грюнвальда, содержащим метанол, и окрашивали азур-эозином в модификации Романовского (дифференциальное окрашивание и контраст между цитоплазмой и ядром достигается тем, что ядра окрашиваются кислотным красителем, а цитоплазма основным) в течение 45 минут при комнатной

температуре, промывали, высушивали на воздухе и анализировали с использованием микроскопа «Микмед-6» (Россия), оснащенным цифровой камерой.

Влияние веществ на фагоцитарную активность определялось в диапазоне концентраций от 2,7 нМ до 50 мкМ.

Оценку полученных результатов для веществ проводили в сравнении с известным по литературным данным противовоспалительным препаратом «Дексаметазоном».

2.6.7. Методика изучения влияния соединений на фагоцитарную активность первичных перитонеальных макрофагов мышей с дрожжами, меченными акридиновым оранжевым

Перитонеальные макрофаги (ПМ) культивировали в 24-луночной планшете в объеме 500 мкл/лунку (10^5 клеток/мл) в течение 24 часов перед разделением на группы: интактные клетки; контрольная группа; а также группа исследуемого вещества и препарата сравнения. В каждую группу, кроме интактной вносилось 50 мкл 1%-й суспензии дрожжей, полученную смесь инкубировали в течение 40 минут. Для выполнения анализа на предметное стекло наносили 50 мкл осадка, к которому добавляли 50 мкл раствора акридинового оранжевого. Оценка фагоцитарной активности проводилась визуальным методом, путем люминисцентной микроскопии.

Влияние веществ на фагоцитарную активность определялось в конечной концентрации 10 мкМ.

Оценку полученных результатов для веществ проводили в сравнении с известным по литературным данным противовоспалительным препаратом «Целекоксибом».

2.6.8. Методика изучения влияния соединений на фагоцит-зависимой хемилюминесценции первичных перитонеальных макрофагов и нейтрофилов мышей

Измерение фагоцит-зависимой хемилюминесценции проводили в белых 96-луночных полипропиленовых планшетах (Thermo Fischer, Дания). Вносили в лунку 100 мкл суспензии нейтрофилов или макрофагов из расчета $1,0 \times 10^6$ клеток на лунку, 100 мкл раствора тестируемых соединений в среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия) и 50 мкл 0,56 мМ раствора люминола в деионизированной воде. Конечная концентрация ДМСО в пробах не превышала 0,3 %. Для измерения индуцированной и спонтанной хемилюминесценции интактных клеток вместо растворов веществ вносили 100 и 200 мкл среды соответственно. Инкубировали в термошейкере при 37 °C и 300 об./мин. в течение 15 мин для проникновения соединений и люминола в клетки [Kobayashi и др., 2001]. Затем вносили в опытные пробы и пробы для

измерения индуцированной хемилюминесценции 100 мкл раствора опсонизированного зимозана и регистрировали люминесценцию (время интеграции 1000 мс) каждые 2 мин в течение 1 ч на микропланшетном ридере Infinite M200 Pro (Tecan, Австрия) при постоянной температуре 37 °C [Dahlgren, Karlsson, 1999].

Активность соединений определялась в диапазоне концентраций от 16 нМ до 50 мкМ.

Оценку полученных результатов для веществ проводили в сравнении с известными по литературным данным противовоспалительными препаратами – дексаметазоном и целекоксибом.

2.6.9. Методика изучения цитотоксичности соединений в МТТ-тесте

Исследуемый тип клеток ($2,0 \times 10^5$ на лунку) высевали в 96-луночные планшеты с плоским дном, содержащие 200 мкл культуральной полной среды (DMEM, Gibco, UK). Подготовленные образцы исследуемых веществ (конечная концентрация ДМСО в пробе составляла 0,25 %) или 0,25%-й раствор ДМСО добавляли в лунки ($n = 3$) через 24 часа после посева. Среда, содержащая 0,01% Triton X-100, служила отрицательным контролем. Клетки инкубировали в течение 24 часов при 37 °C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. После 24 ч инкубации клеток в каждую лунку вносили 20 мкл раствора МТТ, инкубировали при 37 °C, в течение 4 часов. Культуральную среду удаляли, клетки лизировали, и растворяли кристаллы формазана в 150 мкл ДМСО [Wan и др., 1994]. Планшеты встряхивали при комнатной температуре в течение 10 минут и измеряли оптическую плотность в микропланшетном ридере Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия) при длине волны 565 нм.

Влияние веществ на выживаемость клеток определялось в диапазоне концентраций от 425 пкМ до 50 мкМ.

2.6.10. Методика изучения цитотоксичности соединений в ЛДГ-тесте

Увеличение содержания фермента лактатдегидрогеназы в культуральной среде является маркером увеличения проницаемости клеточной мембраны и клеточной смерти. Для определения ее содержания в супернатантах использовался метод, основанный на спектрофотометрической детекции убыли NADH в смеси, содержащей пируват. 10 мкл супернатантов, отобранных спустя 24 часа после инкубации ПМ с тестовыми и контрольными соединениями, и ЛПС смешивали с 250 мкл 0,194 нМ/л раствора NADH, растворенного в 54 мМ фосфатном буферном растворе, pH 7,5. После чего к смеси

добавляли 25 мкл 6,48 мМ раствора пирувата [Diamantino и др., 2001]. Определяли оптическую плотность при длине волны 340 нм в течении 20 мин. Преобразование оптической плотности в клеточную жизнеспособность проводили по стандартной кривой (интактные клетки – 100 %, Тритон X-100 – 0 %).

Влияние веществ на выживаемость клеток определялось в диапазоне концентраций от 2,7 мкМ до 50 мкМ.

2.7. Методы изучения фармакологических свойств новых производных 2-оксиндола на животных моделях

Выявленные на предыдущих этапах исследования соединения-лидеры тестировались на наличие активности в целом организме. Для исследований использовались интактные животные без патологий, а также животные с моделированным заболеванием.

2.7.1. Методы изучения антидиабетической и антигипергликемической активностей соединений

Вещества, ингибирующие активность киназы гликогенсинтазы типа 3 бета и альфа-глюкозидазы изучены на целых животных в методиках, исходя из предполагаемых свойств соединений.

2.7.1.1. Изучение антигипергликемической активности соединений при однократном введении на интактных крысах

Изучение антидиабетической активности проводилось на нелинейных крысах-самцах массой 200–350 г (филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, ветеринарное свидетельство № 860665249 от 01.10.18 г.) при пероральной нагрузке углеводами.

Пероральный тест толерантности к углеводам.

Изучение перорального теста толерантности к углеводам исследуемых веществ проводилось на интактных животных, которые в течение 6 часов находились на свободном питьевом режиме при полной пищевой депривации [Bartoli, Fra, Schianca, 2011]. Половозрелых нелинейных крыс-самцов содержали в стандартных клетках по 5 особей при температуре 25 °С и стандартном световом режиме. Были сформированы контрольная и опытные группы по 5 животных. В момент времени -30 мин животным опытных групп были введены изучаемые вещества в дозе в различных дозировках перорально, солюбилизированные в 10%-м растворе диметилсульфоксида (ДМСО). Животным

контрольной группы введен растворитель (10%-й водный раствор ДМСО) в том же объеме. В момент времени 0 мин животным вводили углеводную нагрузку перорально. Образцы крови забирали из хвостовой вены в 0, 30, 60, 90 и 120 мин. Определение уровня глюкозы плазмы крови проводили тест-полосками с помощью глюкометра «Глюкокард» (ООО «АРКРЭЙ», Россия). В качестве углеводной нагрузки применяли введение моносахаридов (глюкоза) или дисахаридов (мальтоза, сахароза) в дозе 2 г/кг.

2.7.1.2. Изучение антидиабетической активности соединений при однократном введении на крысах с моделированным СД2

Моделирование СД2 проводилось на нелинейных крысах-самцах массой 200–350 г (филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, ветеринарное свидетельство № 860665249 от 01.10.18 г.).

Экспериментальную форму СД2 моделировали внутрибрюшинным введением малых доз стрептозотоцина (35 мг/кг) и дальнейшим содержанием животных на высокожировой диете (ВЖД) в течение 1 месяца. Высокожировая диета: комбикорм для крыс экструдированный (13 000 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 – 1 000 000 МЕ, витамина D3 – 300 000 МЕ, витамина Е – 1,0 г, витамина В2 – 0,6 г, витамина В12 – 12 мг, железа – 20 г, меди – 4 г, марганца – 6 г, цинка – 10 г, кобальта – 0,08 г, йода – 0,4 г. Компоненты отвешивали в соответствии с таблицей 2.4 из расчета 30 г смеси на 1 животное в сутки, измельчали и смешивали до однородности [Srinivasan и др., 2005]. Хранили при +4 °С.

Таблица 2.4

Состав высокожировой диеты

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

Общий срок моделирования СД2 составил 37 дней, после чего был проведен пероральный тест толерантности к глюкозе (ПТТГ) для подтверждения развития СД2 (Рисунки 2.2, 2.3).

После подтверждения развития СД2 проводилось изучение антидиабетической активности соединений при однократном применении в пероральном тесте толерантности к глюкозе.

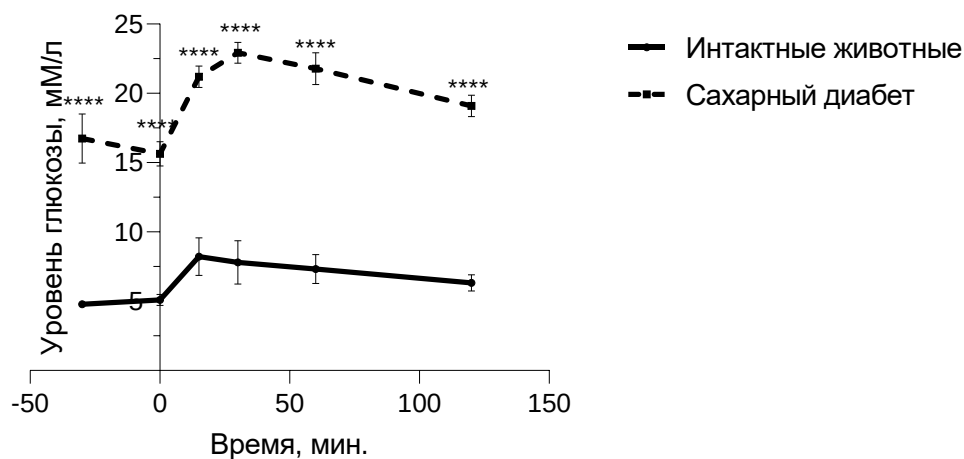


Рисунок 2.2. Влияние моделированного СД2 на уровень глюкозы плазмы крови крыс при пероральной нагрузке глюкозой (2 г/кг)

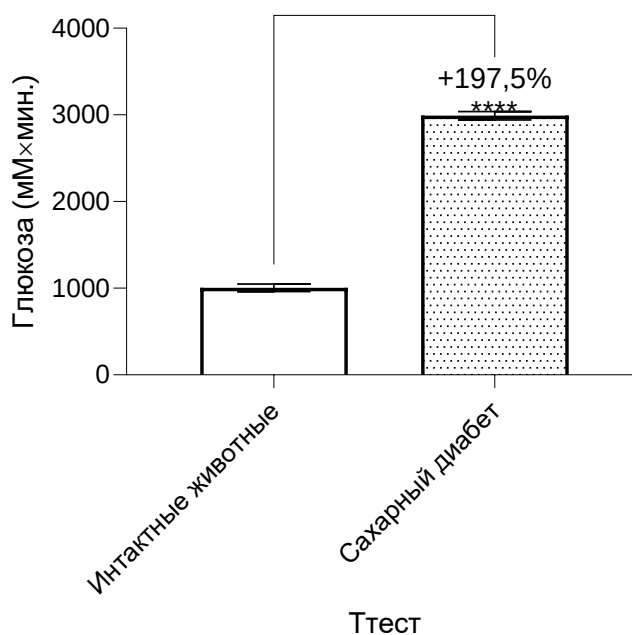


Рисунок 2.3. Влияние моделированного СД2 на площадь под кривой «Глюкоза-Время» при пероральной нагрузке глюкозой (2 г/кг)

2.7.1.3. Изучение антидиабетической активности соединений при хроническом введении на мышах линии C57bl/6j, находящихся на ВЖД

Продолжительность эксперимента составила 217 дней. Дизайн эксперимента представлен в таблице 2.5.

Таблица 2.5

Дизайн исследования

Манипуляция	День эксперимента		
	1–120	121–210	211–217
Высокожировая диета	1-210		
ИТТГ	120	121, 165 , 210	
Определение массы тела	1, 30, 60, 90, 105, 120	150, 180, 210	
Определение концентрации глюкозы в крови	90, 120	150, 180, 210	
Поведенческое тестирование		203	
Эвтаназия			211,212,213
Морфометрическое исследование жировой ткани			211,212,213
Забор биоматериала (кровь, печень)			211,212,213
Биохимическое исследование плазмы крови			214, 215
Биохимическое исследование гомогената печени			216, 217

Моделирование экспериментального СД2 проводилось путем содержания мышей линии C57bl/6j массой 22–23 г (возраст – 12 недель) на ВЖД в течение 4 месяцев (120 дней). Состав ВЖД соответствовал приведенному в пункте 2.7.1.2 «Изучение антидиабетической активности соединений при однократном введении на крысах с моделированным СД2».

Для подтверждения развития экспериментального СД2 ежемесячно проводилось измерение веса животных (Рисунок 2.4); на 90-й и 120-й день измерение уровня глюкозы плазмы крови натошак (Рисунок 2.5) и на 120-й день интроперитонеальный тест толерантности к глюкозе (Рисунки 2.6, 2.7).

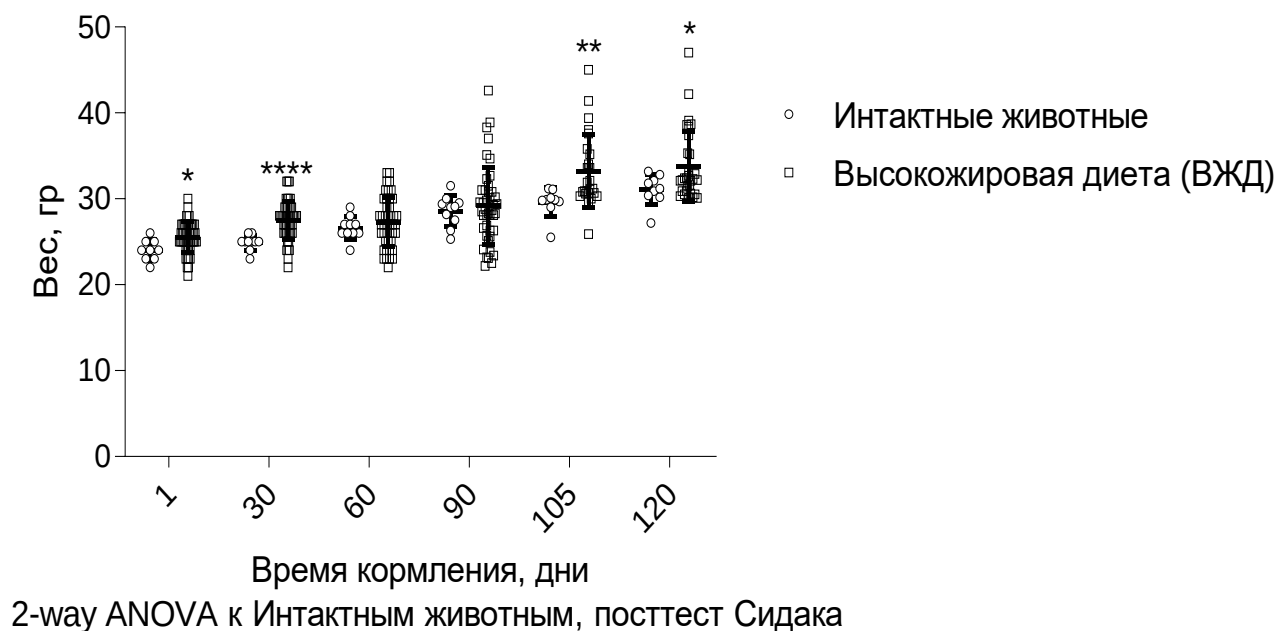


Рисунок 2.4. Влияние моделированного СД2 на вес мышей линии C57bl/6j

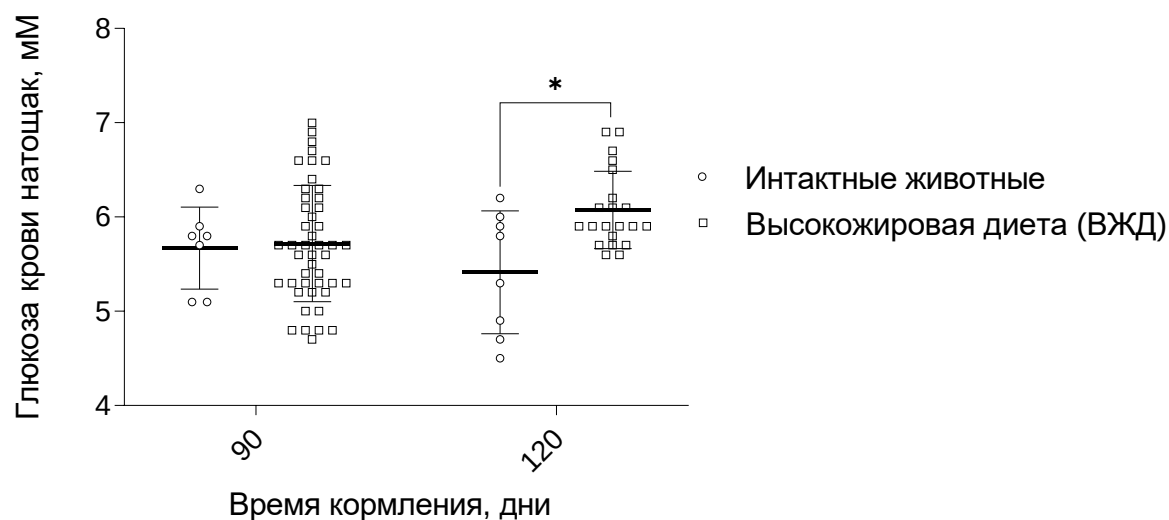
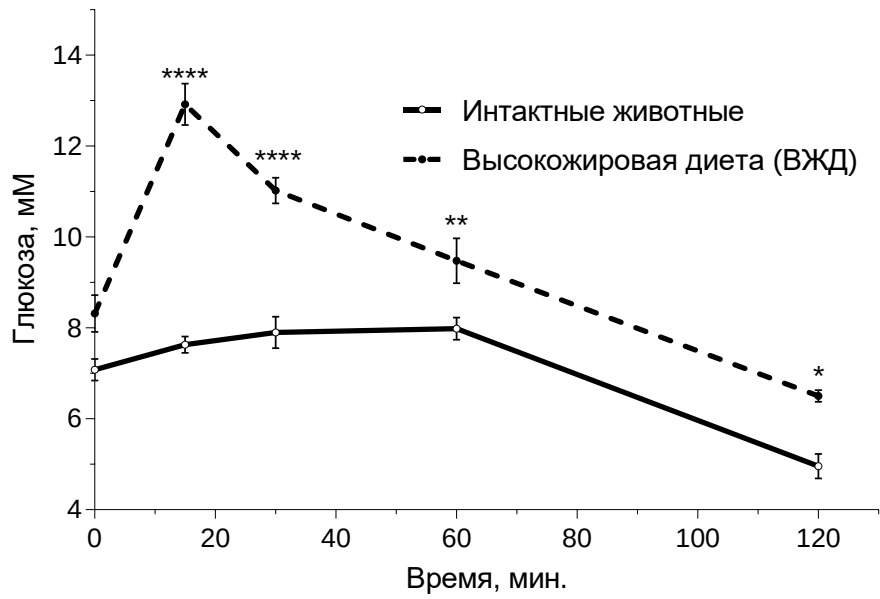


Рисунок 2.5. Влияние моделированного СД2 на уровень глюкозы плазмы крови мышей линии C57bl/6j натошак



2-way ANOVA к Интактным животным, посттест Даннета

Рисунок 2.6. Влияние моделированного СД2 на уровень глюкозы плазмы крови мышей линии C57bl/6j при интروперитонеальной нагрузке глюкозой (2 г/кг)

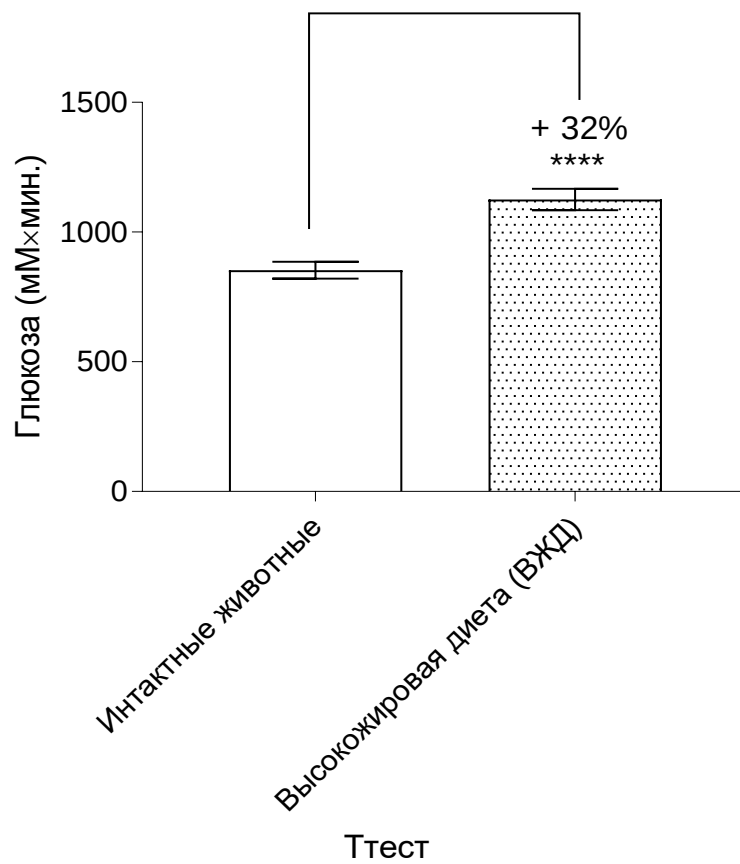


Рисунок 2.7. Влияние моделированного СД2 на площадь под кривой «Глюкоза–Время» при интروперитонеальной нагрузке глюкозой (2 г/кг)

Ход эксперимента

На 121-й день эксперимента после развития патологии животные были рандомизированы на 5 групп: интактные животные (без патологии, стандартный рацион вивария), ВЖД (патология + ВЖД), ВЖД + метформин (патология + ВЖД и введение препарата сравнения «Метформина»), ВЖД + соединение К-167 (патология + ВЖД и введение исследуемого вещества К-167), ВЖД + соединение К-248 (патология + ВЖД и введение исследуемого вещества К-248). Введение исследуемых соединений и препарата-сравнения проводили 90 дней.

Интактным животным и группе ВЖД перорально вводили растворитель. Группе препарата сравнения перорально вводили метформин в дозе 100 мг/кг, животным опытных групп перорально вводили исследуемые вещества К-165 или К-248 в дозе 30 мг/кг. В качестве растворителя использовался 10%-й раствор ДМСО.

В ходе исследования ежемесячно проводили измерение массы тела животных.

На 30, 60 и 90-й дни введения веществ проводили интроперитонеальный тест толерантности к глюкозе. Тест проводили на неанестезированных мышах, находившихся на пищевой депривации в течение 6 часов. За 30 минут до введения глюкозы измерялся начальный уровень глюкозы плазмы крови. Затем животным в/б вводили раствор глюкозы (10 мл/кг) в концентрации, эквивалентной 1 г/кг веса животного. Образцы крови забирали из хвостовой вены в 0, 30, 60, 90 и 120 мин. Определение уровня глюкозы плазмы крови проводили тест-полосками с помощью глюкометра «Глюкокард» (ООО «АРКРЭЙ», Россия).

На 203-й день проводилось поведенческое тестирование всех групп животных в тестах «Открытое поле» и «Распознавание нового объекта».

Методика проведения теста «Открытое поле». Животные помещались в центральную область круглой установки «Открытое поле» для мышей (Open Science, Россия) с расчерченными секторами, диаметром арены 44 см и высотой стенок 32 см при комнатном освещении – 300 люкс. В течение 5 минут наблюдения регистрировалась горизонтальная и вертикальная активности животных [Walsh, Cummins, 1976].

Методика проведения теста «Распознавание нового объекта». Данный тест проводился в два этапа. На первом этапе животное помещалось в центр пластиковой клетки на равном расстоянии между двумя объектами для изучения на 20 минут. Животное имело свободный доступ к обоим объектам. В качестве изучаемых объектов использовались идентичные фигуры (одного цвета, размера, формы и состава). После 20 минут изучения животное помещалось обратно в клетку на 40 минут. На втором этапе животное также помещалось в центр той же клетки на равном расстоянии между двух объектов для изучения на 10 минут. При этом производилась замена одного из изучаемых объектов на новый

(иного цвета, размера, формы и состава). На данном этапе фиксировалось время исследовательской активности относительно нового и старого объектов с расчетом уровня интереса к новому объекту [Antunes, Biala, 2012].

По окончании эксперимента на 211–213-е сутки животных наркотизировали введением раствора хлоралгидрата в/б (400 мг/кг) и забирали до 2 мл крови из нижней полой вены. Плазму крови получали центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об./мин. Каждый образец крови делили следующим образом: по 20 мкл крови на определение общего количества лейкоцитов и подсчет лейкоцитарной формулы, оставшееся количество (≈ 1 мл) центрифугировали при 5000 об./мин в течение 20 минут. Отобранную надосадочную жидкость (плазму крови) хранили при -80°C . Полученную плазму использовали для биохимических исследований. После эвтаназии производили забор белой жировой ткани (ретроперитонеальной, эпидидимальной и мезентериальной) и печени. Образцы промывались физиологическим раствором, высушивались марлевыми салфетками и взвешивались [Johnson, Hirsch, 1972].

На 214-й и 215-й дни эксперимента определяли биохимические показатели плазмы крови всех образцов с помощью наборов для количественного определения инсулина в сыворотке и плазме крови Human Insulin ELISA Kit (Cusabio, США), набор для количественного определения уровня глюкозы в плазме крови глюкозооксидазным методом («Фармацевтика и Клиническая Диагностика», Россия), набор для определения фактора некроза опухолей Mouse TNF- α ELISA Kit (Cloud-Clone Corp., Китай).

На 216-й и 217-й дни эксперимента проводилось определение биохимических показателей всех образцов в гомогенате печени с помощью набора для количественного определения уровня триглицеридов Triaglyceroly Liquid 250 S (Erba Lachema, Чехия).

Определение восстановленного глутатиона в гомогенате печени. В гомогенизаторе Ultra Turrax T10 Basic (IKA, Германия) при охлаждении гомогенизировали 50 мг печени в 500 мкл 0,1 М фосфатного буфера pH 7.4. После к нему добавляли 500 мкл 20%-го раствора ТХУ, содержащего 1 мМ ЭДТА для осаждения белка, после чего центрифугировали 10 минут при 2000 rpm. После центрифугирования отбирали супернатант и добавляли к нему 0,1 мМ раствор реактива Элмана, приготовленного в 0,3 М фосфатном буфере, содержащем 1% цитрата натрия, в соотношении 1:10. После прохождения реакции определяли оптическую плотность раствора при 412 нм [Alam, Bristi, Rafiquzzaman, 2013].

Определение уровня ТБК-активных продуктов в гомогенате печени. В гомогенизаторе Ultra Turrax T10 Basic (IKA, Германия) при охлаждении гомогенизировали 50 мг печени в 200 мкл 0,1М фосфатного буфера pH 7.4. После чего к 40 мкл полученного гомогената добавляли 160 мкл дистиллированной воды, 300 мкл 20%-го раствора уксусной кислоты и

300 мкл 0,8%-го раствора ТБК. Полученную смесь помещали в термостат при 95 °С на 60 мин. После смесь охлаждали под холодной проточной водой, добавляли 200 мкл дистиллированной воды и 1 мл н-бутанола, тщательно взбалтывали и центрифугировали при 4000 рпм в течение 10 мин. После измеряли оптическую плотность органического слоя смеси при 532 нм [Alam, Bristi, Rafiquzzaman, 2013].

Определение уровня оксида азота в гомогенате печени. В гомогенизаторе Ultra Turrax T10 Basic (IKA, Германия) при охлаждении гомогенизировали 50 мг печени в 500 мкл 0,1 М фосфатного буфера pH 7.4. После к нему добавляли 1 мл этилового спирта для осаждения белка, после чего полученную смесь центрифугировали 10 минут при 2000 рпм. Отбирали 50 мкл супернатантов, смешивали с 50 мкл 1%-го раствора и 50 мкл 0,1%-го N-(1-нафтил)этилендиамина. Растворы сульфаниламида и N-(1-нафтил)этилендиамина приготавливали разведением в 2,5%-й фосфорной кислоте [Coleman, 2001]. После инкубации при 23 °С в течение 10 минут в термостатируемом шейкере определяли оптическую плотность при длине волны 550 нм. Преобразование оптической плотности в мкМ NO проводили по стандартной калибровочной кривой (0–100 мкМ раствор нитрита натрия).

2.7.2. Методика изучения противовоспалительной активности соединений в тесте ЛПС-индуцированного отека задней лапы крыс

Изучение противовоспалительной активности проводилось на нелинейных крысах-самцах массой 200–350 г (филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, ветеринарное свидетельство № 860665249 от 01.10.18 г.).

Развитие местного воспаления проводилось путем инъекции в интраплантарную область задней лапы крыс ЛПС *E. coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, США) в дозе 100 мкг/лапу. Изучаемые вещества и препарат сравнения «Целекоксиб» в дозах 30 мг/кг вводили перорально, за 1 ч до инъекции ЛПС. Определение объема образующегося отека проводили с помощью плетизмометра (Ugo Basile, Италия) через 2, 4, 6, 7 и 24 ч после инъекции [Tantray и др., 2016]. Также через 4 часа после введения ЛПС у животных забирали 1 мл крови из подъязычной вены для определения ранних медиаторов воспаления: оксида азота (NO), фактора некроза опухолей α (ФНО- α , TNF- α). Кровь центрифугировали в течение 10 минут при 4 °С 1000 g, после чего отбирали плазму и использовали в последующих тестах.

Определение оксида азота проводили по методике, представленной в разделе 2.7.1.3 «Изучение антидиабетической активности соединений при хроническом введении на мышах линии C57bl/6j, находящихся на ВЖД»

Количественное определение ФНО- α проводили с помощью набора для определения фактора некроза опухолей Rat TNF- α ELISA Kit (Cloud-Clone Corp., Китай). В основе определения лежит принцип иммуноферментного анализа. Калибровка набора выполнялась по стандартному раствору фактора некроза опухолей в диапазоне концентраций от 7,8 пкг/мл до 500 пкг/мл. В результате, получена калибровочная кривая, по которой определялась концентрация фактора некроза опухолей в пробах (пкг/мл). Измерение проводили на микропланшетном ридере Infinite M200 Pro (Tecan, Австрия).

2.7.3. Методика изучения острой токсичности соединений при пероральном введении интактным мышам

Исследование острой токсичности проводилось на нелинейных мышах-самцах массой 20–30 г (ООО «НИЦ БМТ», ветеринарное свидетельство № 0725507 от 01.09.17 г.).

Животные были разделены на 2 группы: контрольная и исследуемая. Контрольной группе животных перорально вводили растворитель в объеме 2 мл / 100 г веса животного. Исследуемой группе животных перорально вводили исследуемое вещество в дозе 2 г/кг в объеме 2 мл / 100 г веса животного. Введение производилось после 12-часовой пищевой депривации [OECD, 2001]. Через 4 часа после введения животные получали свободный доступ к еде и воде. Оценивалась смертность животных в первые 24 часа и затем в течение 2 недель после введения. Еженедельно измерялся вес животных.

2.8. Методы изучения антиагрегантной и антитромботической активностей соединений

К основным отдаленным осложнениям сахарного диабета относят повышение агрегантной активности тромбоцитов и образование артериальных тромбов. Для ингибиторов GSK3 β характерно наличие активности, препятствующей развитию данных осложнений [Barry и др., 2003], в связи с чем определялись данные свойства.

2.8.1. Методика изучения влияния соединений на агрегацию тромбоцитов in vitro

Исследование влияния новых производных 2-оксиндола на агрегацию тромбоцитов проводилось на богатой тромбоцитами плазме кроликов породы шиншилла.

В качестве индукторов агрегации тромбоцитов использовали: АДФ (конечная концентрация 5 мкМ), коллаген (конечная концентрация 15 мкг/мл) [Rand, Leung, Packham, 2003]. Исследование проводилось на двухканальном лазерном анализаторе агрегации

тромбоцитов Biola LA-220. Калибровка прибора проводилось по дистиллированной воде. Контрольная проба содержала 300 мкл суспензии тромбоцитов и раствор индуктора агрегации, опытная проба содержала также раствор исследуемого вещества или препарата сравнения.

Активность соединений определялась в диапазоне концентраций от 1 мкМ до 100 мкМ.

Оценку полученных результатов для веществ проводили в сравнении с известным по литературным данным антиагрегантным препаратом «Ацетилсалициловой кислотой».

2.8.2. Методика изучения влияния соединений на время окклюзии сонной артерии индуцированного аппликацией 50%-го раствора хлорида железа (III) интактным крысам

Изучение антитромботической активности проводилось на белых беспородных крысах-самцах массой 200–350 г (филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, ветеринарное свидетельство № 860665249 от 01.10.18 г.).

Животные были разделены на группы: контрольная, препарата-сравнения и исследуемого вещества по 6 животных в группе. Исследуемые соединения и препарат сравнения перорально вводились животным за час до начала эксперимента. Контрольной группе вводился эквивалентный объем 10%-го раствора ДМСО. Крыс наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг внутривенно), затем послойно вскрывали кожу и ткани, производили препарирование сонной артерии на 2 см в длину. На участок длиной около 1 см накладывали ватный диск размером 2 × 8 мм, пропитанный 50%-м раствором хлорида железа (III) (0,025 мл). Для изолирования окружающих тканей под сонную артерию подводили парафиновую бумагу. Ультразвуковой датчик аппарата «Минимакс-Допплер-К» (Санкт-Петербург) устанавливали на расстоянии 1 см от ватного диска по ходу кровотока в сонной артерии. Регистрация кровотока проводилась до полной окклюзии сосуда тромбом [Kurz, Main, Sandusky, 1990].

Оценку полученных результатов для веществ проводили в сравнении с известным по литературным данным препаратом с антитромботическим эффектом – ацетилсалициловой кислотой.

2.9. Методы компьютерной обработки информации

В данной работе в качестве материалов использовались данные по 2D-структуре 27 новых производных 2-оксиндола. База данных по структуре новых соединений, а также по уровню фармакологической активности была сформирована с помощью компьютерной программы DataWarrior (Idorsia Pharmaceuticals Ltd., США) [Sander и др., 2015]. Полученная

база данных, а также имеющиеся в программе сервисы позволили сделать обобщающие выводы относительно полученных результатов, а также выявить взаимосвязи «структура – активность».

После чего в графическом редакторе MarvinSketch 17.1.23 [MarvinSketch, США] [Csizmadia, 2019] построены пространственно-оптимизированные 3D-модели найденных соединений-лидеров. Пространственная оптимизация проводилась с помощью встроенного в программу метода молекулярной динамики. Полученные 3D-модели соединений были использованы для изучения механизма взаимодействия исследуемых веществ с моделями ферментов методом молекулярного докинга. Экспериментальные рентгеноструктурные 3D-модели были получены по спискам базы знаний UniProtKB [Magrane, Consortium, 2011] и из базы данных PDBe [Gutmanas и др., 2014]. Подготовка 3D-моделей лигандов и 3D-моделей ферментов для докинга производилась с помощью программы AutoDockTools 1.5.2 [Morris и др., 2009]. Молекулярный докинг выполнялся с помощью программы AutoDock Vina 1.1.1 [Trott, Olson, 2009]. Анализ молекулярного механизма связывания с сайтами ферментов проводился в программе Discovery Studio Visualizer (DASSAULT SYSTEMS, США) [Studio, 2015].

Для соединений-лидеров был произведен анализ показателей ADMET *in silico*, для чего были использованы наиболее популярные сервисы: ProTox 2 [Banerjee и др., 2018], SwissADME [Daina, Michielin, Zoete, 2017], pkCSM [Pires, Blundell, Ascher, 2015], admetSAR [Cheng и др., 2012] и ADMETlab [Dong и др., 2018]. С их помощью были оценены фармакокинетические и токсикологические параметры соединений. Также произведен прогноз параметров лекарственного подобия веществ в программе DataWarrior. Данные показатели позволяют судить о дальнейшей перспективности углубленного изучения веществ.

2.10. Методы статистической обработки

Для обработки результатов микропланшетного скрининга использовались следующие методы.

Межпланшетная IQM нормализация. Первичные данные были нормализованы для каждого планшета путем деления значений каждой лунки планшета на межквартильное среднее (IQM) в соответствии с уравнением:

$$\text{IQM нормализованная активность} = \frac{S}{\mu_{iq}},$$

где S представляет измеренное значение образца, а μ_{iq} представляет среднее (μ) межквартильных (iq) данных планшета.

Значение μ_{iq} было найдено для каждого планшета с помощью функции =TRIMMEAN (начало: конец; 0,5) в Microsoft Excel, где начало и конец определяют первую и последнюю ячейки массива данных соответственно. Показателем контроля качества для каждого планшета считали разницу между средним межквартильным и медианным значением, не превышающую 15 %.

Внутрипланшетная нормализация. Процент активности в каждой пробе нормализовали по внутрипланшетным контролям с использованием уравнения, где S представляет измеренное значение образца, а H и L представляют среднее значение для высокоактивных и низкоактивных контролей на планшете соответственно:

$$\% \text{ Активности} = \left(\frac{S - L}{H - L} \right) \times 100.$$

Расчет значений IC_{50} . Измерения проводились в трех независимых экспериментах. Данные обрабатывали с использованием Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.). Величины IC_{50} вычисляли нелинейной 3-параметрической регрессией по уравнению:

$$y = y_{min} + \frac{y_{max} - y_{min}}{1 + \frac{x}{IC_{50}}}.$$

Среднее арифметическое взвешенное IC_{50} и стандартных ошибок определения IC_{50} рассчитывали, исходя из весов (w_i), стандартных ошибок (SE_i), индивидуальных измерений по формуле:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i * x_i}{\sum_{i=1}^n w_i}, w_i = \frac{1}{SE_i^2}.$$

Для обработки экспериментальных фармакологических исследований использовались методы согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств, реализованные в программных пакетах GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, США), Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office, 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 и двухфакторный дисперсионный анализ с пост-тестом Даннета; для зависимых измерений – парный t-тест. В случае ненормального распределения данных использованы U-критерий Манна – Уитни; критерий Краскела – Уоллиса с пост-тестом Данна – для множественного сравнения; для зависимых измерений – критерий Вилкоксона. Расчеты концентрационных зависимостей выполнены с использованием линейного и нелинейного регрессионного анализов.

ГЛАВА 3. ПОИСК ПРОИЗВОДНЫХ 2-ОКСИНДОЛА, ИНГИБИРУЮЩИХ КИНАЗУ ГЛИКОГЕНСИНТАЗЫ ТИПА 3 БЕТА (GSK3B)

3.1. Поиск ингибиторов GSK3B среди новых производных 2-оксиндола

In vitro изучено влияние 16 новых производных 2-оксиндола на активность киназы гликогенсинтазы типа 3 бета человека. Конечная концентрация соединений в скрининге составила 10 мкМ. В качестве препарата сравнения был выбран известный ингибитор GSK3B, вещество SB-216763 (3-(2,4-дихлорфенил)-4-(1-метил-1H-индол-3-ил)-2,5-дигидро-1H-пиррол-2,5-дион) – соединение, из класса конкурентных ингибиторов АТФ-связывающего сайта GSK3B [Coghlan и др., 2000]. Результаты первичного скрининга приведены в таблице 3.1.

Таблица 3.1

Влияние новых производных 2-оксиндола, в концентрации 10 мкМ,
на активность GSK3B (*in vitro*)

№	Шифр соединения	$\Delta\% \pm m$
1	K-167	$95,70 \pm 4,45$
2	K-165	$91,82 \pm 2,95$
3	OIP-NO ₂ -2	$87,60 \pm 1,87$
4	K-248	$58,94 \pm 7,97$
5	OIP-NO ₂ -4	$42,11 \pm 1,94$
6	OIP-H-4	$37,50 \pm 4,04$
7	OIP-Br-S	$34,99 \pm 0,37$
8	OIP-NO ₂ -3	$34,50 \pm 4,02$
9	OIP-Br-O	$29,65 \pm 4,50$
10	OIP-H-S	$28,22 \pm 12,24$
11	OIP-H-3	$18,93 \pm 20,5$
12	K-183(1)	$11,28 \pm 5,63$
13	M-CPN	$4,58 \pm 5,69$
14	K-229	$3,89 \pm 5,98$
15	OIP-H-O	$2,03 \pm 14,54$
16	K-231	$-4,68 \pm 5,57$
17	SB-216763	$93,23 \pm 14,50$

Из изученных 16 новых производных 2-оксиндола в концентрации 10 мкМ было выявлено 1 соединение (К-167 95,70 %), оказывающее большее ингибирующее GSK3В действие, чем вещество сравнения SB-21673 (93,23 %). Четыре вещества проявили активность выше 50 %, а остальные ниже 50 %. Для 4 наиболее активных веществ было проведено определение величины полуингибирования активности фермента. Результаты исследования приведены в таблице 3.2.

Таблица 3.2

Величина ($IC_{50} \pm m$) полуингибирования активности GSK3В новых производных 2-оксиндола

№	Шифр соединения	нМ
1	К-167	$4,2 \pm 0,7$
2	К-165	$155,4 \pm 18,0$
3	К-248	$4343,0 \pm 217,0$
4	OIP-NO₂-2	$20000,0 \pm 1345,0$
5	SB-216763	$8,4 \pm 2,0$

Согласно проведенному исследованию величина полуингибирующей активности для препарата сравнения SB-216763 составила IC_{50} 8,4 нМ. При изучении новых производных 2-оксиндола было обнаружено производное К-167, превосходящее его по данному показателю в 2 раза. На рисунке 3.1 представлено влияние наиболее активных соединений и SB-216763 в зависимости от концентрации на активность GSK3В.

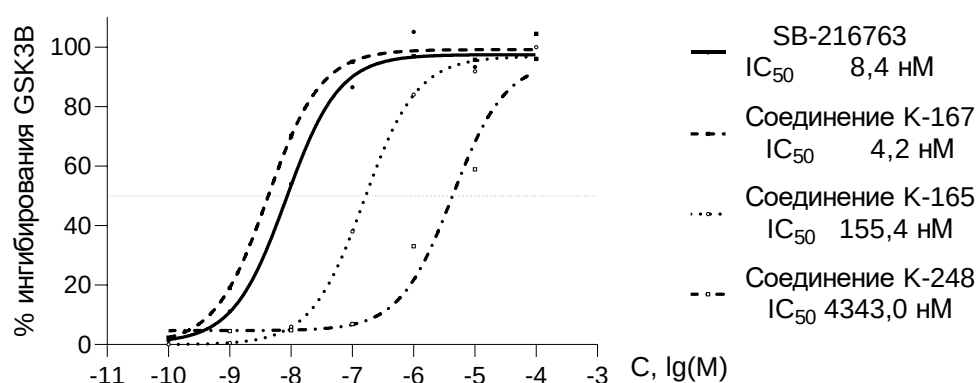


Рисунок 3.1. Влияние соединений К-167, К-165, К-248 и SB-216763 в зависимости от концентрации на активность GSK3В

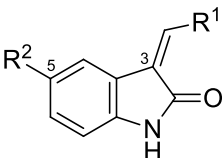
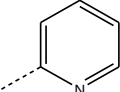
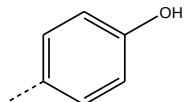
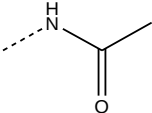
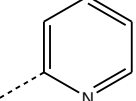
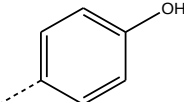
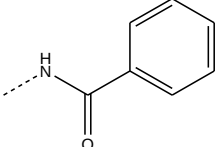
На основании полученных ранее результатов, описывающих способность проникновения веществ в клетку и ингибирования липополисахаридиндуцированной выработки оксида азота первичными перитонеальными макрофагами мышей, для детального изучения было выбрано соединение К-248, проявившее высокую активность.

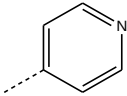
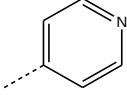
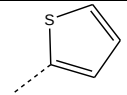
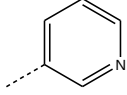
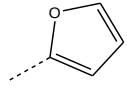
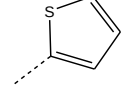
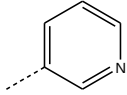
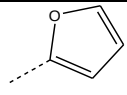
3.1.1. Зависимость ингибирующей активности от структуры новых производных 2-оксиндола

Результаты скрининга и исследования влияния соединений на активность GSK3B в зависимости от концентрации являлись основными данными для проведения анализа зависимости ингибирующей активности от структуры новых производных 2-оксиндола. В таблице 3.3 представлены данные о химической структуре и величине активности исследованных соединений.

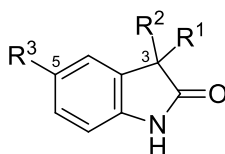
Таблица 3.3

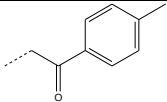
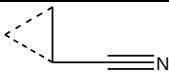
Химическая структура новых производных 2-оксиндола и величина ингибирующей GSK3B активности ($\Delta\% \pm m$ - ингибирование активности фермента в концентрации 10 мкМ)

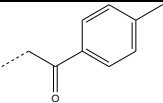
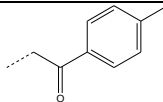
3-Арилиден-2-оксиндолы 				
№	Шифр соединения	R ¹	R ²	$\Delta\% \pm m$
1	К-167		H	95,7 ± 4,45
2	К-165			91,82 ± 2,95
3	OIP-NO ₂ -2		NO ₂	87,60 ± 1,87
4	К-248			58,94 ± 7,97

№	Шифр соединения	R ¹	R ²	Δ% ± m
5	OIP-NO ₂ -4		NO ₂	42,11 ± 1,94
6	OIP-H-4		H	37,50 ± 4,04
7	OIP-Br-S		Br	34,99 ± 0,37
8	OIP-NO ₂ -3		NO ₂	34,50 ± 4,02
9	OIP-Br-O		Br	29,65 ± 4,50
10	OIP-H-S		H	28,22 ± 12,24
11	OIP-H-3		H	18,93 ± 20,5
12	OIP-H-O		H	2,03 ± 14,54

3,3-Дизамещённые-2-оксиндолы



№	Шифр соединения	R ¹	R ²	R ³	Δ% ± m
1	K-183(1)		OH	H	11,28 ± 5,63
2	M-CPN			Br	4,58 ± 5,69

№	Шифр соединения	R ¹	R ²	R ³	$\Delta\% \pm m$
3	K-229		ОН	Br	$3,89 \pm 5,98$
4	K-231		ОН	OMe	$-4,68 \pm 5,57$

В соответствии с базовым скаффолдом, исследованные новые производные 2-оксиндола можно разделить на 2 класса: производные 3-арилиден-2-оксиндола и 3,3-дизамещенные производные 2-оксиндола.

Было обнаружено, что производные 3-арилиден-2-оксиндолов оказались более перспективными и активными в сравнении с 3,3-дизамещенными-2-оксиндолами. Возможным объяснением служит наличие ароматического радикала в положении С3 у производных 3-арилиден-2-оксиндола. В результате, образуется расширенная система π - π сопряжения, электронные системы находятся в одной плоскости, образуя плоский σ -скелет. При моделировании пространственного 3D-строения данных структур в графическом редакторе MarvinSketch можно визуалью увидеть данные стерические различия (Рисунок 3. 2).

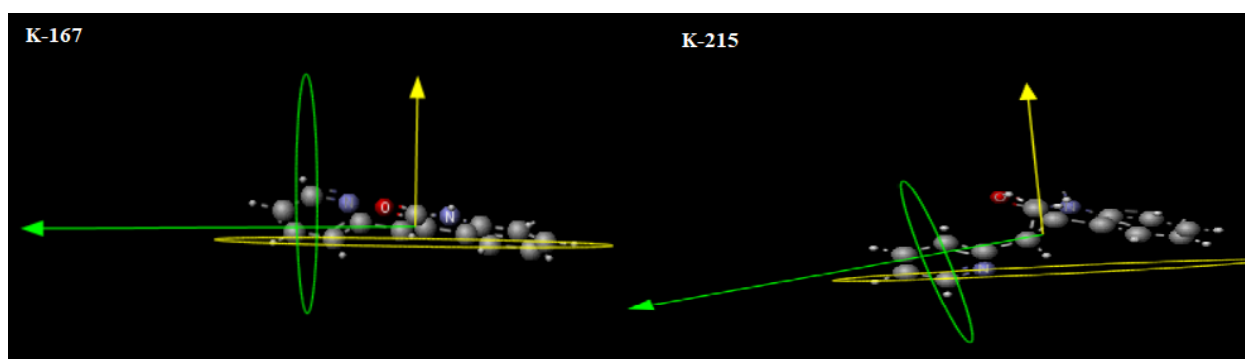


Рисунок 3.2. Влияние радикала в положении С3 на пространственное строение новых производных 2-оксиндола

При анализе заместителей в положении С3 (R¹) выявлено, что наличие шестичленного ароматического цикла с гетероатомом в орто-положении или гидроксильной группой в пара-положении повышало ингибирующую GSK3B активность.

Обнаружено два соединения-лидера K-167 и K-248 с высокой ингибирующей киназу гликогенсинтазы типа 3 бета активностью, при этом способные проникать внутрь клетки и

оказывать противовоспалительное действие. В связи с этим они были выбраны для определения цитотоксичности и оценки антигипергликемической, антидиабетической и противовоспалительной активности *in vivo*.

3.1.2. Построение модели связывания *in silico* соединений K-167 и K-248

Для уточнения молекулярного механизма взаимодействия исследуемых соединений с GSK3B было проведено моделирование их связывания *in silico*. Для моделирования в графическом редакторе MarvinSketch 17.1.23 [MarvinSketch, США] были построены наиболее энергетически выгодные 3D структуры исследуемых соединений. В работе использовалась модель GSK3B человека 3sd0 из базы данных Protein Data Bank in Europe. В ходе проведения исследования в качестве модели фермента использовалась GSK3B человека, но полученные данные могут быть транслированы на другие организмы, в связи с высокой гомологичностью фермента [Ап и др., 2010]. Для определения места связывания производных K-167 и K-248 из используемой модели был удален имеющийся лиганд и проведено докирование по всей структуре фермента. На рисунке 3.3 показан сайт связывания исследуемых соединений с GSK3B, согласно его расположению; он является АТФ-связывающим центром фермента.

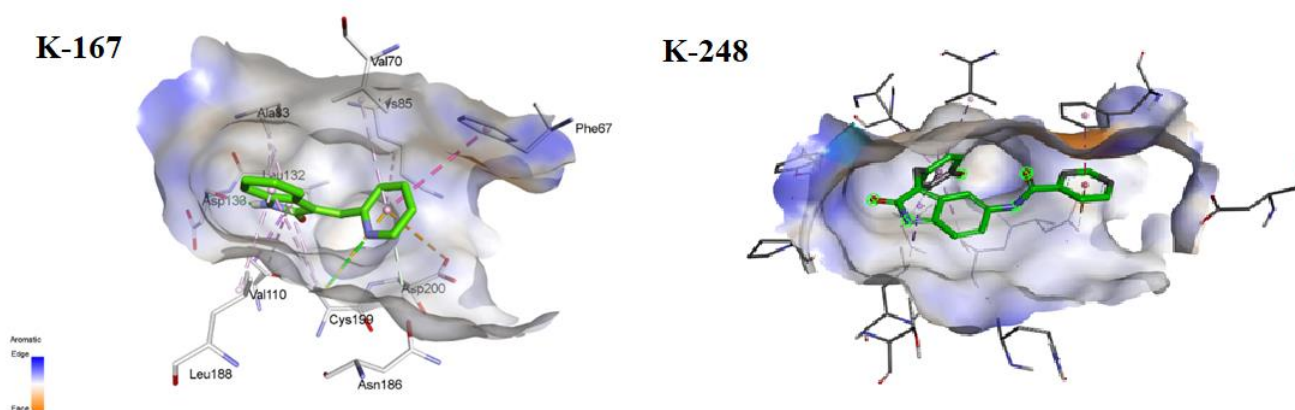


Рисунок 3.3. Пространственное строение образующегося взаимодействия соединений K-167, K-248 и АТФ-связывающего центра GSK3B

На рисунках 3.4–3.6 представлены межмолекулярные взаимодействия вещества SB-216763, K-167, K-248 и АТФ-связывающего центра GSK3B.

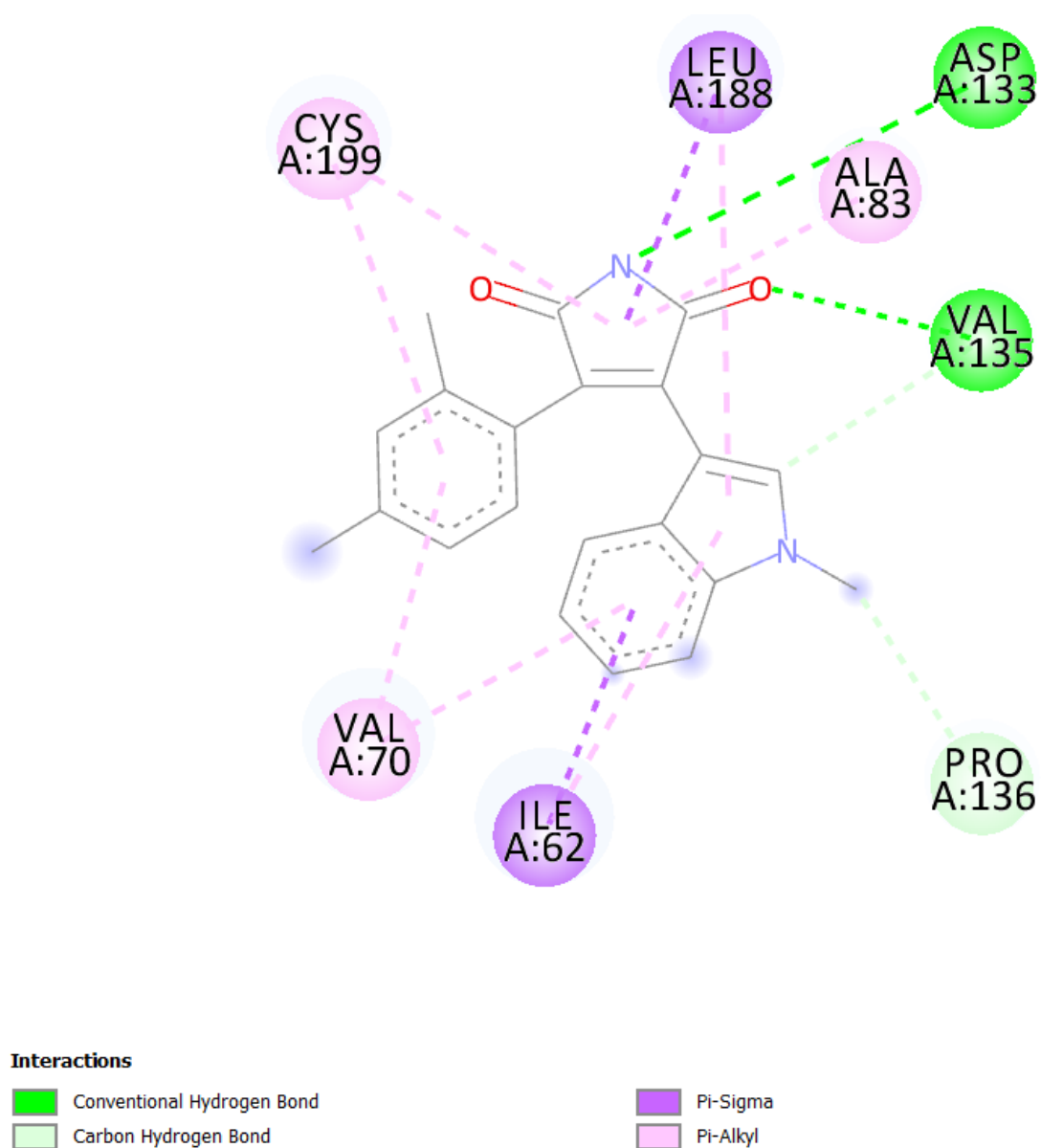


Рисунок 3.4. Межмолекулярные взаимодействия SB-216763
и АТФ-связывающего центра GSK3B

Межмолекулярные взаимодействия между соединением SB-216763 и GSK3B: водородные связи с VAL135, ASP133 и PRO136; π -алкил взаимодействия с CYS199, VAL70, ALA83; π -сигма связь с LEU188, ILE62.

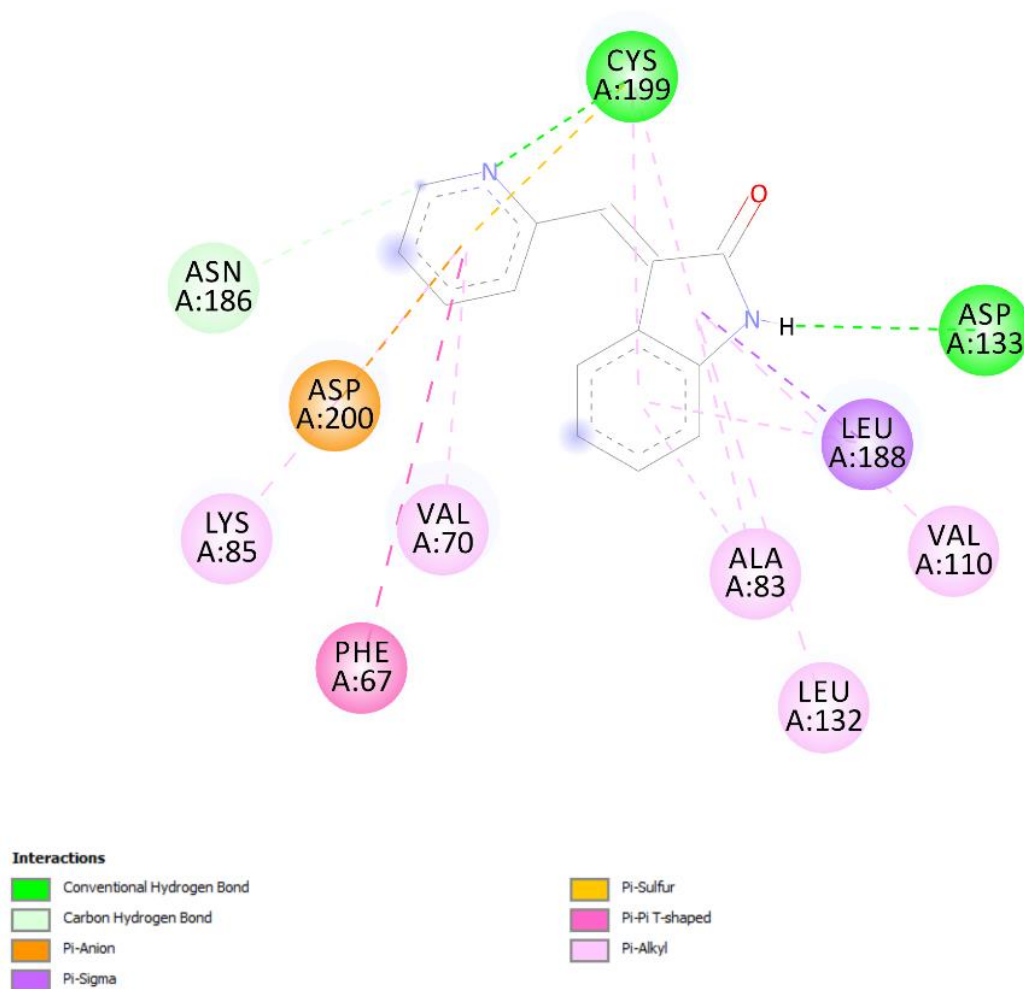


Рисунок 3.5. Межмолекулярные взаимодействия соединения К-167 и АТФ-связывающего центра GSK3B

Межмолекулярные взаимодействия между производным 2-оксиндола К-167 и GSK3B: водородные связи с CYS199, ASP133 и ASN186; π -акил взаимодействия с LYS85, VAL70, ALA83, LEU132, VAL110; π -сигма связь с LEU188; π -сера связь с ASP200; т-образная связь с PHE67; а также π -анион связь с ASP200.

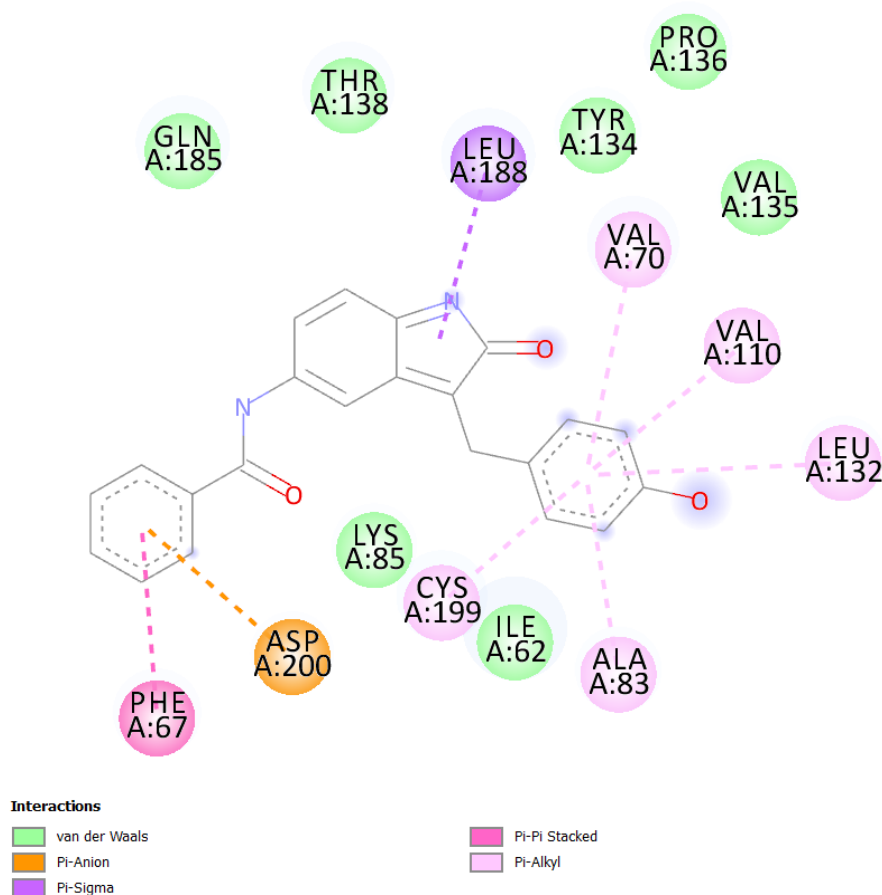


Рисунок 3.6. Межмолекулярные взаимодействия соединения К-248 и АТФ-связывающего центра GSK3B

Межмолекулярные взаимодействия между соединением К-248 и GSK3B: π -акил взаимодействия с VAL70, ALA83, LEU132, VAL110, CYS199; π -сигма связь с LEU188; Вандерваальсовы взаимодействия с GLN185, THR138, TYR134, PRO136, VAL135, LYS85, ILE62; π - π связь с PHE67; а также π -анион связь с ASP200.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о схожем механизме ингибирования GSK3B у исследуемых производных и SB-216763. При этом можно выделить следующие ключевые аминокислоты фермента, участвующие во взаимодействиях со всеми соединениями: VAL70, ALA83, CYS199 и LEU188.

3.1.3. Цитотоксичность соединений К-167 и К-248

Для выявленных соединений-лидеров К-167 и К-248 проведено исследование цитотоксичности *in vitro* на первичных клетках животных в зависимости от конечной концентрации.

Для тестирования цитотоксических свойств были выбраны перитонеальные первичные макрофаги, поскольку кроме наличия цитотоксических свойств, на данных клетках возможно обнаружить наличие иммунотоксических свойств веществ, а также неонатальные фибробласты сердца как клетки с высокой скоростью пролиферации.

На рисунке 3.7 представлена концентрационная кривая зависимости жизнеспособности клеток от конечной концентрации исследуемого вещества в лунке микропланшета.

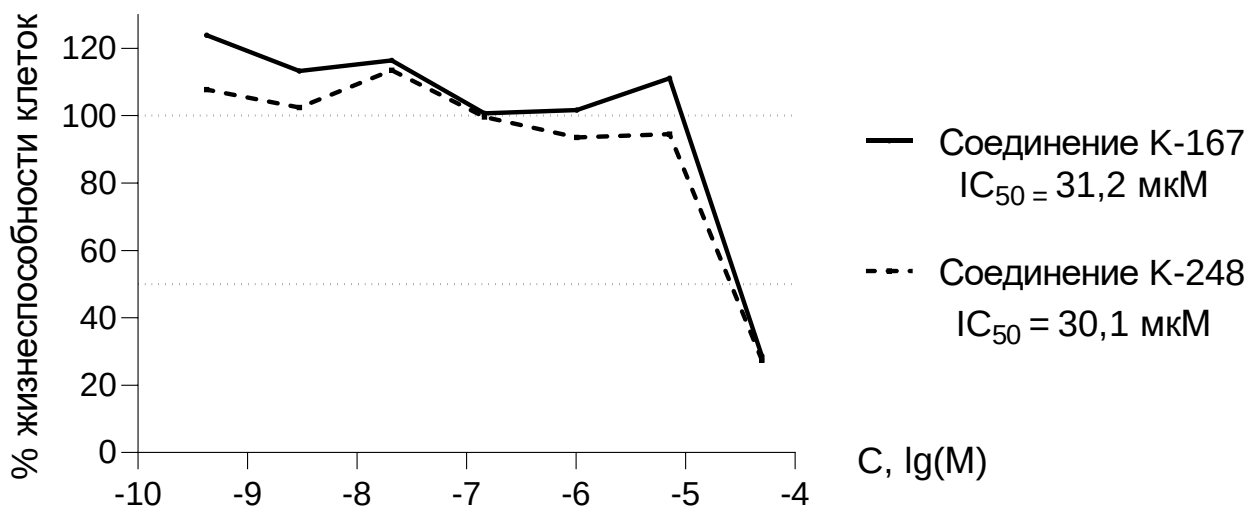


Рисунок 3.7. Влияние соединений К-167 и К-248 в зависимости от концентрации на жизнеспособность перитонеальных макрофагов мышей в МТТ-тесте ($M \pm m$)

Согласно полученным результатам, можно сделать вывод об отсутствии цитотоксического эффекта у исследуемых веществ до конечной концентрации 7 мкМ, при этом в концентрации 50 мкМ наблюдается выраженная гибель клеток (72,5 %). Рассчитанный показатель выживаемости половины клеток в лунке микропланшета для производного К-167 равен 31,2 мкМ, а для вещества К-248 – 30,1 мкМ. Для подтверждения полученных данных было проведено дополнительное тестирование соединений в лактатдегидрогеназном тесте (Рисунок 3.8).

В результате проведенного исследования подтверждено отсутствие влияния соединений на жизнеспособность клеток до конечной концентрации веществ 7 мкМ. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод об отсутствии цитотоксических и иммунотоксических свойств веществ в среднем микромолярном диапазоне концентраций, на данной клеточной линии.

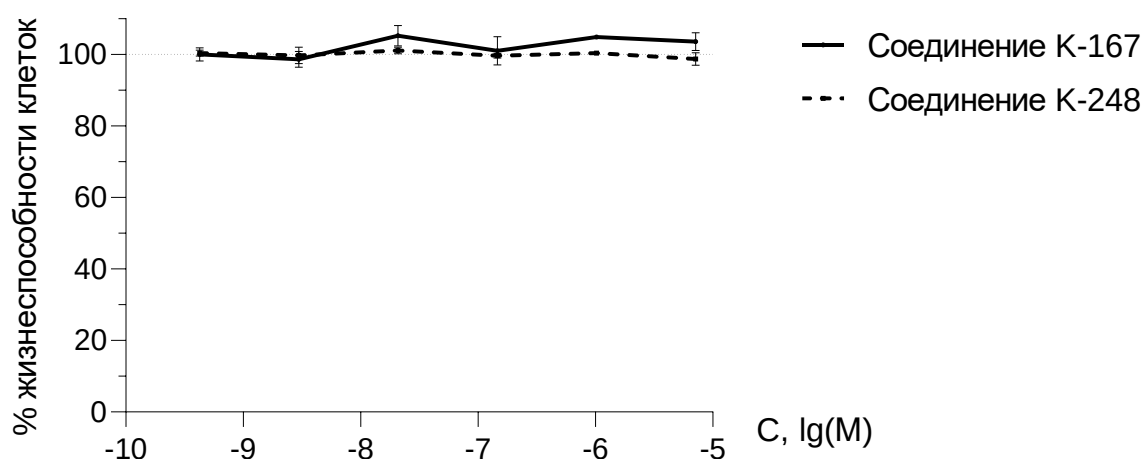


Рисунок 3.8. Влияние соединений К-167 и К-248 в зависимости от концентрации на жизнеспособность перитонеальных макрофагов мышей в лактатдегидрогеназном тесте ($M \pm m$)

На рисунке 3.9 представлен уровень жизнеспособности неонатальных сердечных фибробластов крыс при конечной концентрации исследуемых веществ 20 мкМ.

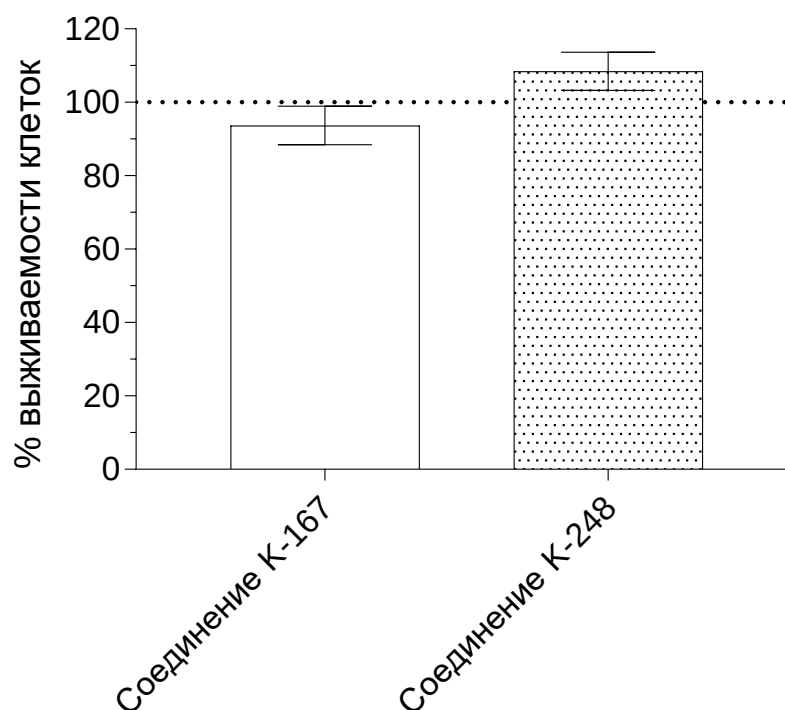


Рисунок. 3.9. Влияние соединений К-167 и К-248 в концентрации 20 мкМ на жизнеспособность неонатальных фибробластов сердца крыс в МТТ-тесте ($M \pm m$)

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод об отсутствии цитотоксического эффекта исследуемых соединений в данной концентрации на первичной линии быстро пролиферирующих клеток.

3.1.4. Заключение

Обнаружено 4 производных с выраженной ингибирующей киназу гликогенсинтаазы типа 3 бета активностью (больше 50 %), при этом одно вещество с большей активностью, чем вещество сравнения SB-216763 (93,23%). При проведении дальнейшего концентрационного исследования установлено, что одно исследуемое соединение (К-167) превосходит SB-216763 по величине IC_{50} . Выявленное ранее вещество К-248, оказывающее наибольшую противовоспалительную активность в тесте липополисахаридиндуцированного синтеза оксида азота перитонеальными макрофагами мышей, также было выбрано соединением-лидером. Сформулированы взаимоотношения «структура – активность» для изученных производных 2-оксиндола.

Выявлено, что исследуемые соединения взаимодействуют с АТФ-связывающим сайтом GSK3B, аналогично веществу сравнения SB-216763. Установлены ключевые аминокислоты фермента, участвующие в этих взаимодействиях.

Для соединений-лидеров К-167 и К-248 проведено исследование цитотоксических свойств. Обнаружено, что данные вещества не подавляют жизнеспособность первичных перитонеальных макрофагов мышей до конечной концентрации 7 мкМ и не влияют на жизнеспособность неонатальных фибробластов сердца крыс в конечной концентрации 20 мкМ.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о перспективности дальнейшего исследования фармакологических свойств соединений К-167 и К-248 на различных животных моделях, с целью подтверждения наличия антидиабетических и противовоспалительных свойств при пероральном применении, а также подтверждения обнаруженного механизма действия.

3.2. Антидиабетическая активность соединения К-167

Производное К-167 ингибирует активность GSK3B; согласно литературным данным, вещества с подобным механизмом действия оказывают выраженную антидиабетическую активность [Kim K. M., 2015; Wagman, Johnson, Bussiere, 2005]. Исследуемое соединение протестировано на клеточной модели, оценивающей влияние на утилизацию глюкозы, а также на животных моделях СД2.

3.2.1. Влияние на утилизацию глюкозы фибробластами крыс

Изучение влияния соединения К-167 на метаболическую активность проводилось на неонатальных фибробластах крыс по способности захвата глюкозы из питательной среды, в которой культивировались клетки. Полученные результаты представлены на рисунке 3.10.

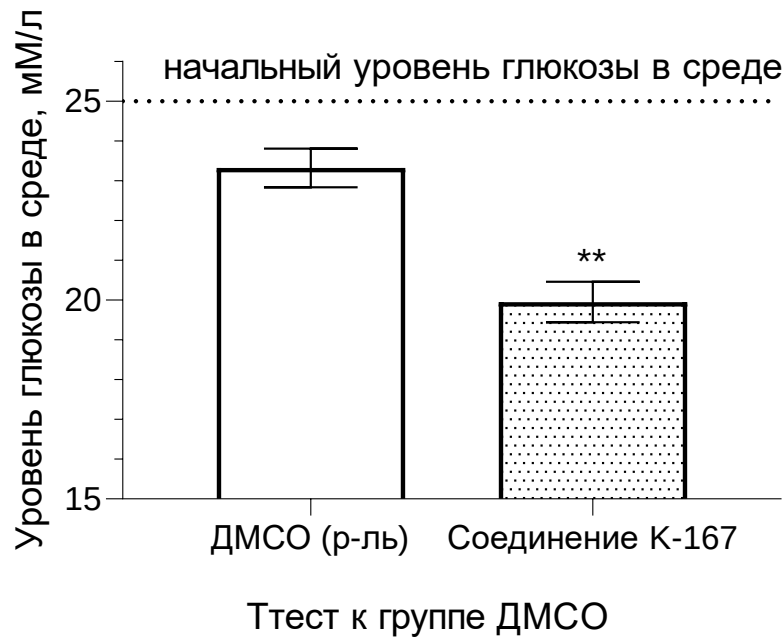


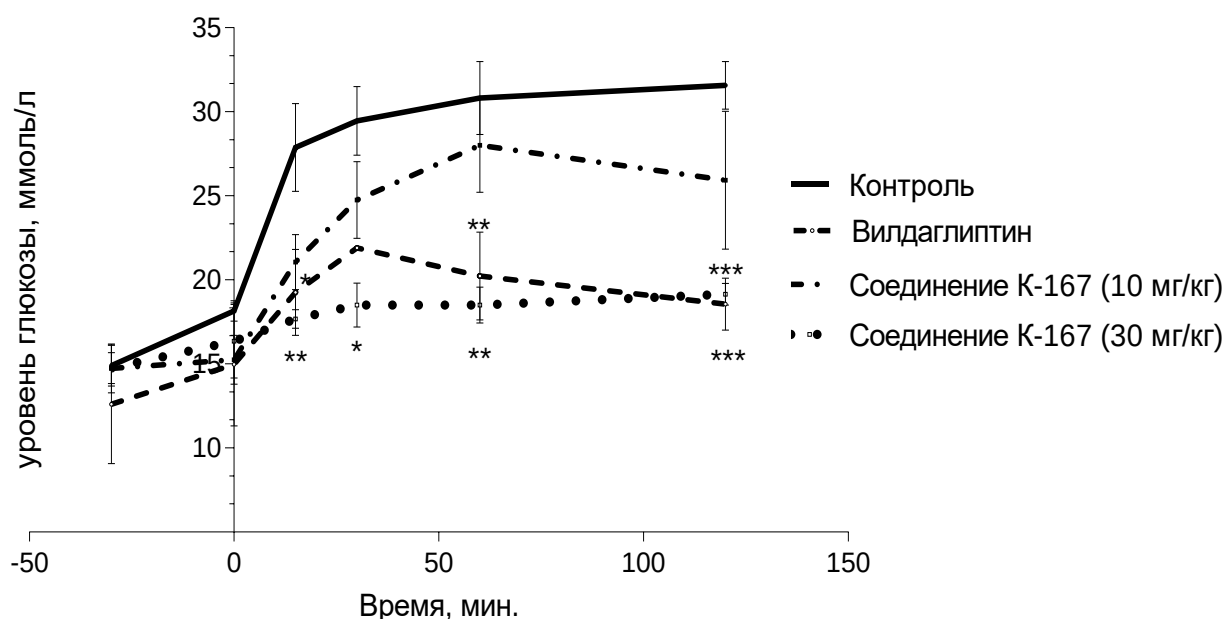
Рисунок 3.10. Влияние соединения К-167 в концентрации 20 мкМ на способность захвата глюкозы неонатальными фибробластами сердца крыс ($M \pm m$)

Исходя из результатов эксперимента, можно сделать вывод, что исследуемое производное К-167 оказывает достоверное влияние на метаболическую активность клеток, в частности улучшает захват глюкозы относительно контрольных значений на $237,8 \pm 27,82$ %. Данное влияние расширяет профиль антидиабетического действия вещества.

3.2.2. Влияние на уровень постпрандиальной гипергликемии в пероральном тесте толерантности к глюкозе

Антидиабетическая активность соединения К-167 при пероральном введении изучалась на нелинейных крысах-самцах с моделированным СД2. Животные рандомизировались на экспериментальные группы: контроль, препарата сравнения и группы изучаемого вещества. Для соединения К-167 проведено изучение антидиабетической активности в зависимости от

дозы (10, 20 и 30 мг/кг). Результаты проведенных пероральных тестов толерантности к глюкозе представлены на рисунке 3.11.



2-way ANOVA к группе Контроль, посттест Данета

Рисунок 3.11. Влияние соединения К-167 (10 и 30 мг/кг) и вилдаглиптина (10 мг/кг) на уровень глюкозы плазмы крови при пероральной нагрузке глюкозой (2 г/кг) у животных с моделированным сахарным диабетом ($M \pm m$)

У группы контроля глюкоза при пероральном введении вызывала пик гипергликемии через 120 минут, уровень глюкозы плазмы крови составил $31,57 \pm 2,85$ мМ/л. Вилдаглиптин привел к снижению максимального пика гипергликемии до $21,90 \pm 1,32$ мМ/л. Исследуемое соединение К-167 в дозе 10 мг/кг привело к понижению максимума гипергликемии до $28,00 \pm 5,60$ мМ/л, а в дозе 30 мг/кг – до $18,50 \pm 1,85$ мМ/л.

После изучения всех запланированных доз производного К-167 выявлена прямая зависимость антигипергликемической активности соединения от дозы, вводимой животным. Полученные результаты представлены на рисунке 3.12.

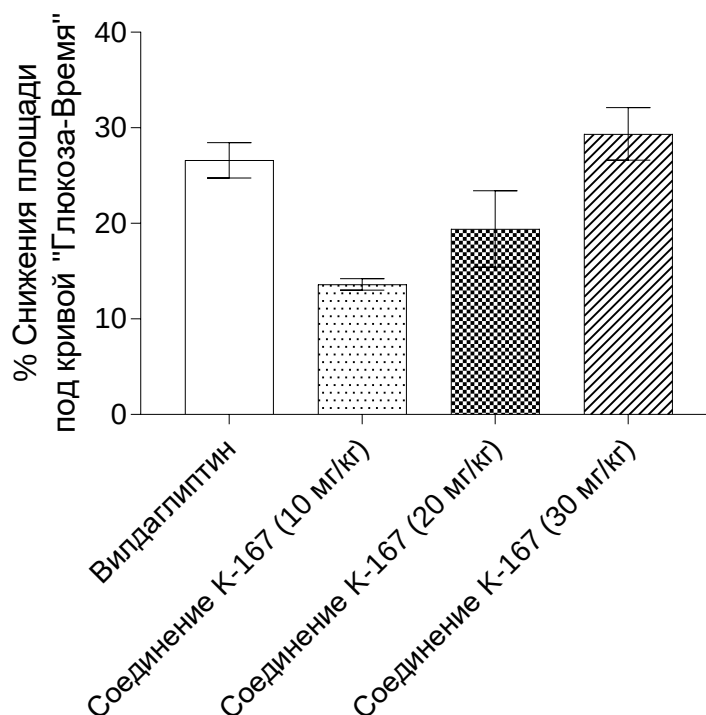


Рисунок 3.12. Влияние соединения К-167 (10, 20 и 30 мг/кг) и вилдаглиптина (10 мг/кг) на площадь под кривой «Глюкоза – Время» при пероральной нагрузке глюкозой (2 г/кг) у животных с моделированным сахарным диабетом ($M \pm m$)

Вилдаглиптин при введении в дозе 10 мг/кг снижал площадь под кривой «Глюкоза – Время» на $26,60 \pm 3,20$ %. Исследуемое соединение К-167 в дозе 10 мг/кг приводило к снижению площади на $13,6 \pm 0,84$ %; в дозе 20 мг/кг – на $19,40 \pm 5,65$ %; а в дозе 30 мг/кг – на $29,30 \pm 3,88$ %. Согласно полученным результатам, можно сделать вывод о наличии у вещества К-167 значимого влияния на уровень постпрандиальной гипергликемии в дозе 30 мг/кг, которое сопоставимо с таковым у препарата сравнения вилдаглиптина.

3.2.3. Антидиабетическая активность при курсовом введении

Соединение К-167 в дозе 30 мг/кг было выбрано для проведения курсового введения и углубленного изучения влияния на патогенез сахарного диабета. Мыши линии c57bl/6j с моделированным СД2 были рандомизированы на группы: ВЖД, ВЖД и введение препарата сравнения метформина в дозе 100 мг/кг (ВЖД + метформин), ВЖД и введение соединения К-167 в дозе 30 мг/кг (ВЖД + К-167). Также выделена группа интактных животных без моделированного сахарного диабета. Курсовое введение изучаемого производного и препарата сравнения проводилось ежедневно в течение 3 месяцев (90 дней). Для определения влияния

соединения на патогенез заболевания были выбраны следующие показатели: вес животных; уровень глюкозы натощак, результаты интраперитонеальных тестов толерантности к глюкозе (ИТТГ), уровень инсулина плазмы крови и показатель инсулинорезистентности (углеводный обмен); уровни висцеральных жировых отложений и триглицеридов печени (жировой обмен); лейкоцитарная формула крови, уровни фактора некроза опухолей α (ФНО- α) плазмы крови и оксида азота печени (воспалительный процесс); уровни ТБК-активных продуктов и восстановленного глутатиона печени (уровень оксидативного стресса).

На рисунке 3.13 представлена динамика изменения веса животных во время курсового введения. При этом не было выявлено статистически значимых изменений веса животных во всех исследовательских группах.

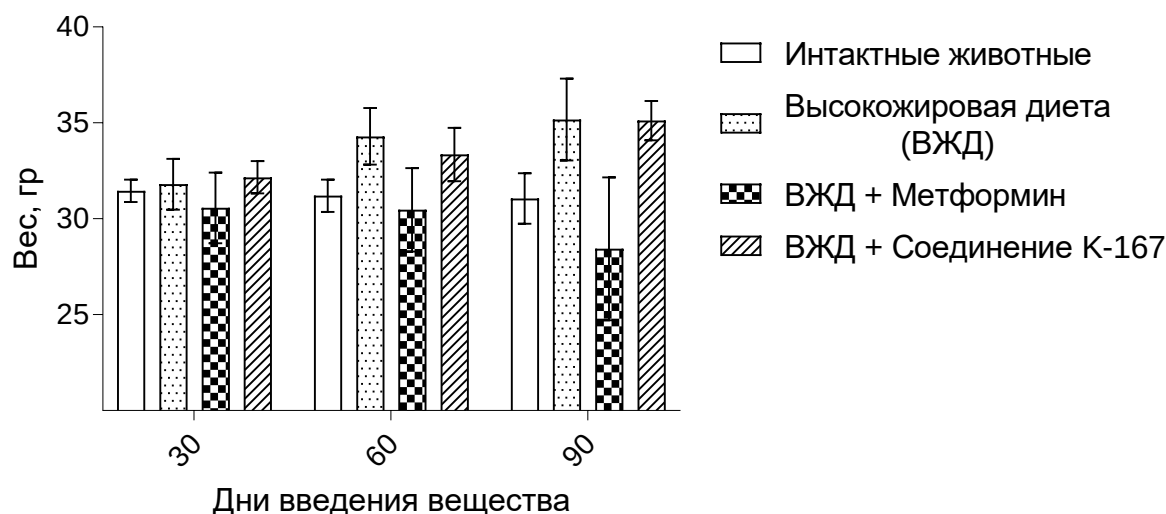
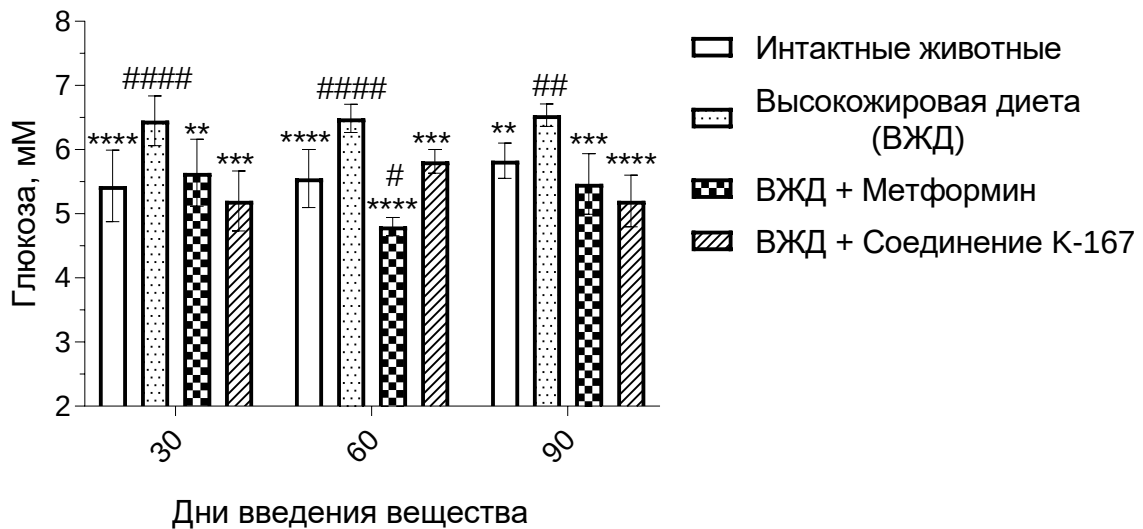


Рисунок 3.13. Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на массу тела животных с СД2 во время курсового введения ($M \pm m$)

Начальная масса животных составляла $24,00 \pm 0,40$ г. В первый день начала введения исследуемых веществ средняя масса интактных животных составила $31,0 \pm 0,59$ г, а животных, получавших высокожировую диету, $33,80 \pm 0,75$ гр. На 90-й день курсового введения веществ средний вес животных по группам составил: интактные животные $31,00 \pm 1,32$ г; ВЖД – $35,10 \pm 2,13$ г; ВЖД + метформин – $28,40 \pm 3,72$ г; ВЖД + К-167 – $35,10 \pm 1,01$ г. При этом статистически достоверных изменений между группами выявлено не было, но обнаружена тенденция к снижению массы тела в группе ВЖД + метформин.

На рисунке 3.14 представлены результаты измерения глюкозы плазмы крови животных натощак во время курсового введения.



2-way ANOVA к Интактным животным, посттест Данета

* 2-way ANOVA к группе ВЖД, посттест Данета

Рисунок 3.14. Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень глюкозы плазмы крови у животных с СД2 во время курсового введения ($M \pm m$)

В первый день начала введения исследуемых веществ средний уровень глюкозы плазмы крови интактных животных составил $5,40 \pm 0,23$ Мм, а животных, получавших ВЖД, – $6,00 \pm 0,08$ Мм. На 90-й день курсового введения веществ изменения по группам составили: интактные – $5,80 \pm 0,10$ Мм; ВЖД – $6,50 \pm 0,06$ Мм; ВЖД + метформин – $5,40 \pm 0,27$ Мм; ВЖД + К-167 – $5,20 \pm 0,16$ Мм. Выявлено значимое увеличение уровня глюкозы плазмы крови натошак под влиянием ВЖД, прирост составил 12 %. Препарат сравнения «Метформин» и соединение К-167 предотвратили развитие состояния гипергликемии. Для метформина на 60-й день курсового введения показано достоверное снижение уровня глюкозы относительно интактной группы, что не характерно для исследуемого производного.

Изменения толерантности животных к глюкозе определяли в интраперитонеальных тестах толерантности к глюкозе. Результаты экспериментов представлены на рисунках 3.15–3.17.

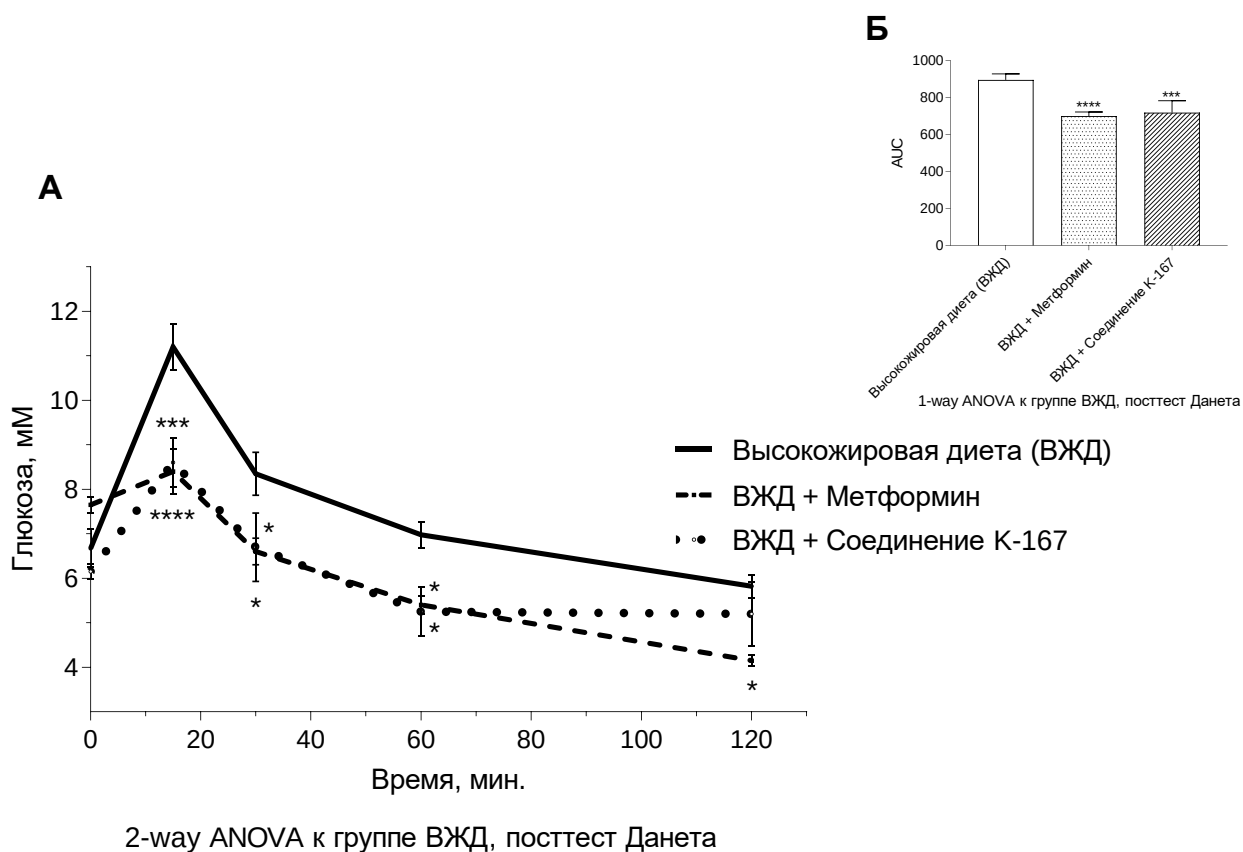


Рисунок 3.15. Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень глюкозы плазмы крови при интраперитонеальной нагрузке глюкозой (2 г/кг) (А) и площадь под кривой «Глюкоза – Время» (Б) на животных с СД2, 1-й день курсового введения ($M \pm m$)

У группы ВЖД глюкоза при интаперитонеальном введении вызывала пик гипергликемии через 15 минут, уровень глюкозы плазмы крови составил $11,20 \pm 0,52$ мМ/л. Препарат сравнения «Метформин» привел к снижению максимального пика гипергликемии до $8,40 \pm 0,51$ мМ/л, при этом площадь под кривой «Глюкоза – Время» снизилась на 21,8 % относительно группы ВЖД. Исследуемое соединение К-167 привело к понижению максимума гипергликемии до $8,60 \pm 0,54$ мМ/л и площади под кривой «Глюкоза – Время» на 19,0 %.

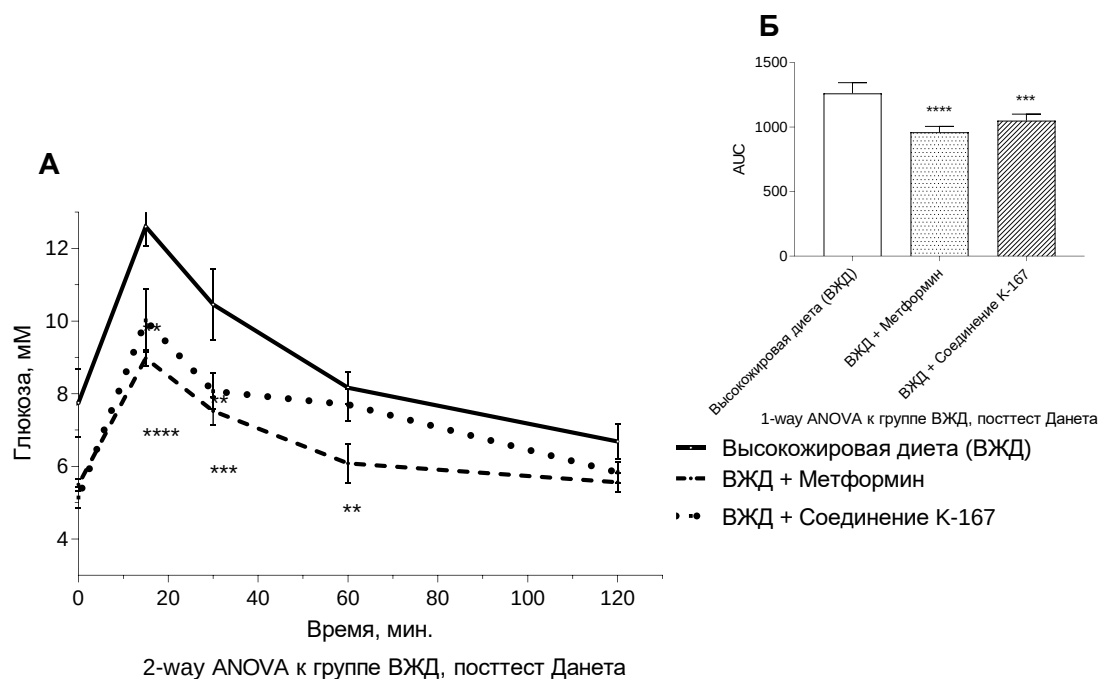


Рисунок 3.16. Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень глюкозы плазмы крови при интраперитонеальной нагрузке глюкозой (2 г/кг) (А) и площадь под кривой «Глюкоза – Время» (Б) на животных с СД2, 45-й день курсового введения ($M \pm m$)

Для группы ВЖД пик гипергликемии составил $12,60 \pm 0,53$ мМ/л на 15-й минуте после введения глюкозы. Метформин снизил максимальный уровень постпрандиальной гипергликемии до $8,90 \pm 0,22$ мМ/л, при этом площадь под кривой «Глюкоза – Время» снизилась на 23,9 % относительно группы ВЖД. Соединение К-167 оказало значимое влияние на уровень гипергликемии, понижая его до $10,00 \pm 0,85$ мМ/л и площади под кривой «Глюкоза – Время» на 16,8 %.

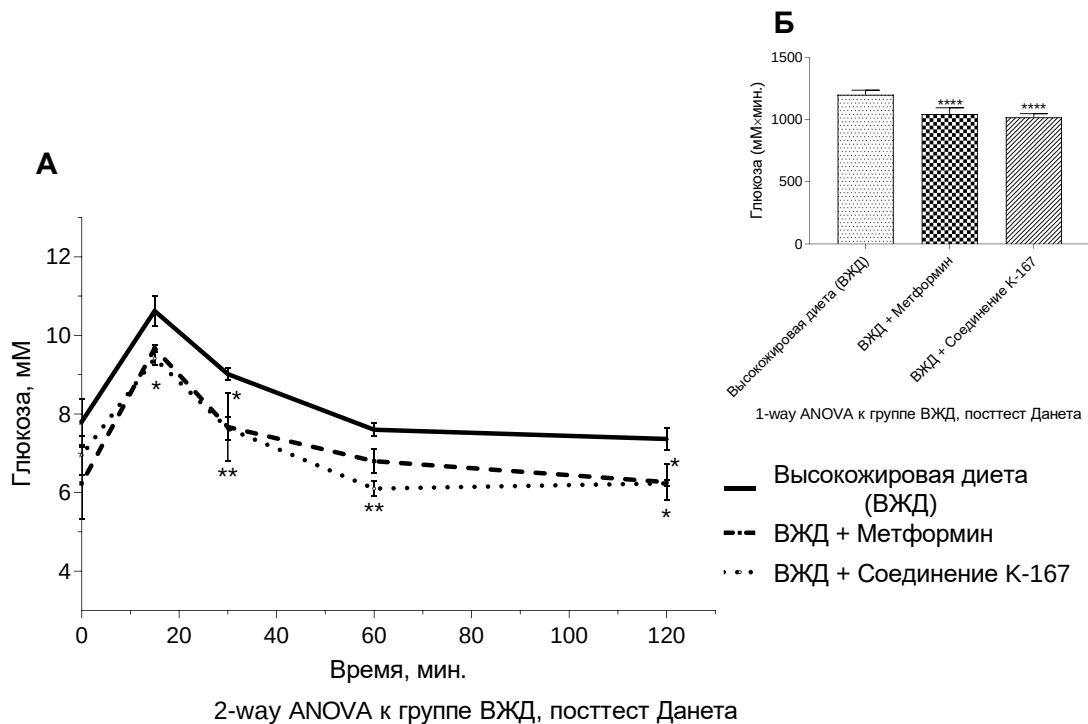


Рисунок 3.17. Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень глюкозы плазмы крови при интраперитонеальной нагрузке глюкозой (2 г/кг) (А) и площадь под кривой «Глюкоза – Время» (Б) на животных с СД2, 90-й день курсового введения ($M \pm m$)

Глюкоза у группы ВЖД вызвала максимальный пик гипергликемии через 15 мин до значений $10,60 \pm 0,37$ мМ/л. Метформин снижал выраженность данного пика, при этом значения глюкозы плазмы крови составили $9,60 \pm 0,08$ мМ/л, а снижение площади под кривой «Глюкоза – Время» 12,9 %. Соединение К-167 вызывало уменьшение максимального значения уровня глюкозы плазмы крови до $9,40 \pm 0,17$ мМ/л, а уровня кривой на 15,0 %.

На рисунке 3.18 представлены результаты проведенной морфометрии жировой ткани животных.

Выявлено достоверное увеличение всех типов жировых отложений у группы, получавшей ВЖД относительно интактных животных: мезентериальных на 84,2 %, эпидидимальных на 70,9 % и ретроперитонеальных на 72,2 %. Препарат сравнения «Метформин» нормализовал количество мезентериальных и эпидидимальных жировых отложений, снижение относительно группы ВЖД составило 43,5 и 38,7 % соответственно, при этом значимого влияния на ретроперитонеальные (снижение на 11,5%) выявлено не было. Исследуемое вещество К-167 привело к значимым изменениям всех типов абдоминальных жиров, снижая их до уровня интактных животных (снижение на 33,54; 34,9 и 36,9 % от группы ВЖД).

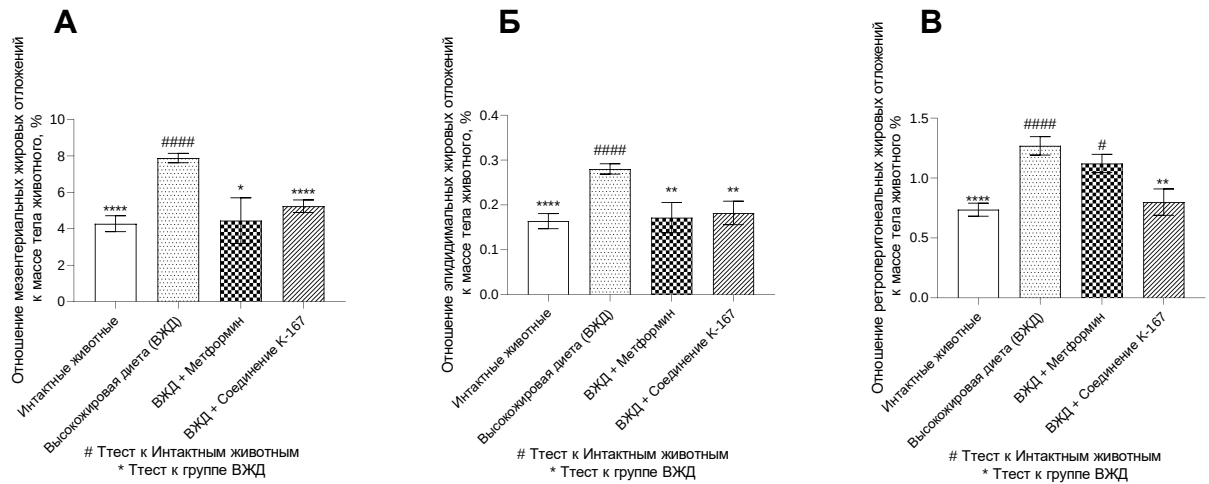


Рисунок 3.18. Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень мезентериальных (А), эпидидимальных (Б) и ретроперитонеальных (В) жировых отложений у животных с СД2 ($M \pm m$)

На рисунке 3.19 приведены уровни глюкозы и инсулина плазмы крови, а также рассчитанный индекс инсулинорезистентности.

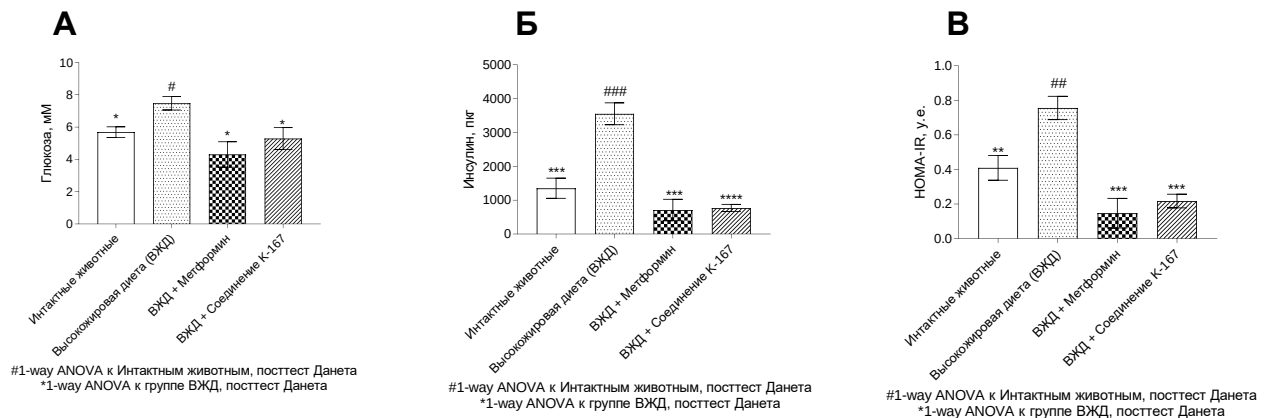


Рисунок 3.19. Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень глюкозы (А) и инсулина (Б) плазмы крови, а также рассчитанный показатель инсулинорезистентности HOMA-IR (В) животных с СД2 ($M \pm m$)

Интakтные животные, получавшие стандартную диету, имели соответствующие литературе уровни глюкозы и инсулина для данной линии животных [Reuter, 2007]. Содержание животных на ВЖД привело к значимому увеличению уровня глюкозы плазмы крови на 31,3 %, инсулина в 2,6 раза, а индекса инсулинорезистентности на 84 %. Метформин нормализовал данные показатели до уровня интактных животных, снижая их относительно группы ВЖД на 42,3; 80,0 и 80,5 % соответственно. Соединение К-167 достоверно

корректировало данные показатели до уровня интактных животных, снижение показателей относительно группы ВЖД составило 29,1; 78,3 и 71,2 %.

Высокожировая диета привела к увеличению уровня триглицеридов печени на 23 % (Рисунок 3.20). Метформин не оказал значимого влияния на данный показатель, снижение относительно группы ВЖД составило 17,3 %. Производное К-167 нормализовало значения данного параметра до уровня интактных животных, снижение его относительно группы ВЖД на 24,1 %.

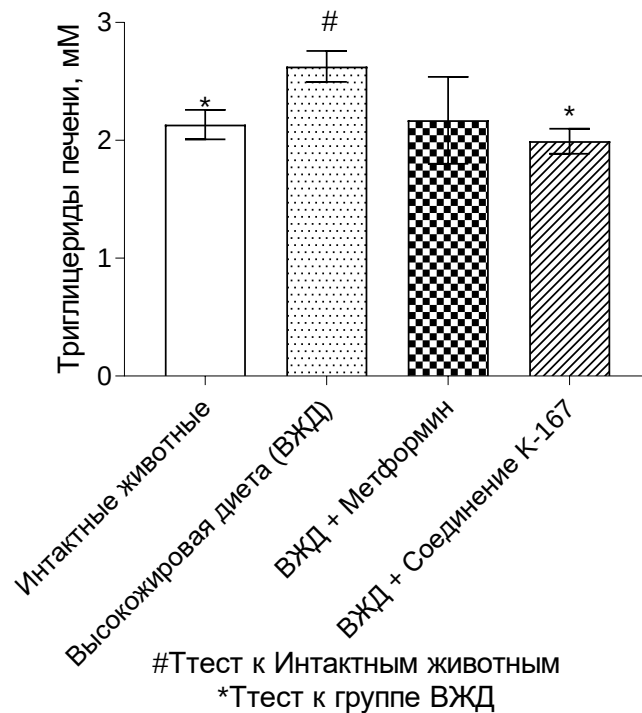


Рисунок 3.20. Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень триглицеридов печени у животных с СД2 ($M \pm m$)

Согласно полученным результатам, можно сделать вывод, что соединение К-167 оказывает выраженный антидиабетический эффект с первого дня введения, нормализуя показатели углеводного и жирового обмена животных и препятствуя прогрессированию заболевания.

3.2.4. Влияние на воспалительный статус животных с моделью сахарного диабета 2-го типа

Для выявления различий в воспалительном статусе животных было проведено определение лейкоцитарной формулы крови (Рисунок 3.21), а также ранних медиаторов

воспаления: уровня оксида азота в печени и фактора некроза опухолей α (ФНО- α) плазмы крови (Рисунок 3.22).

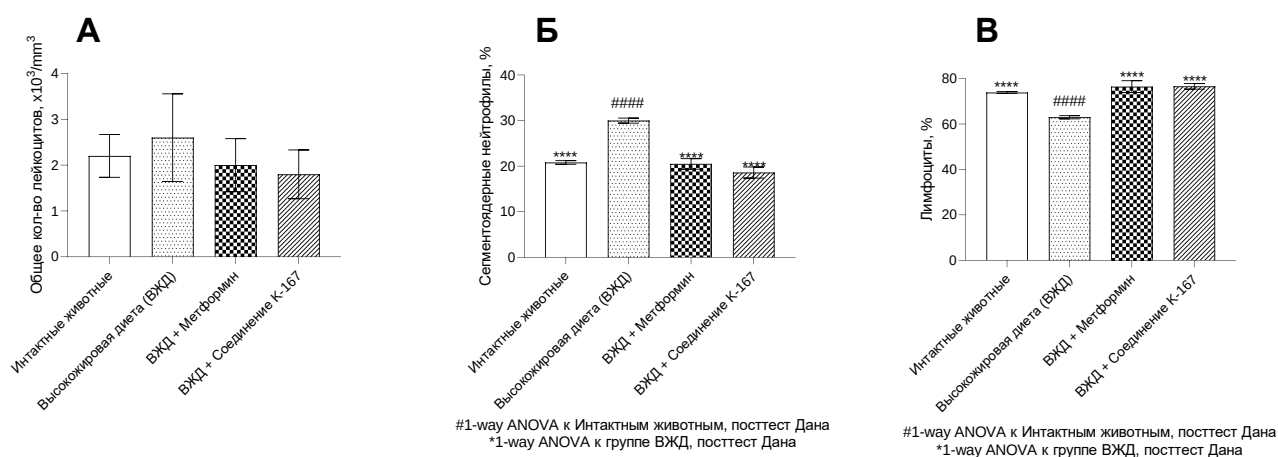


Рисунок 3.21. Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на общее количество лейкоцитов (А), уровень сегментоядерных нейтрофилов (Б) и лимфоцитов (В) у животных с СД2 ($M \pm m$)

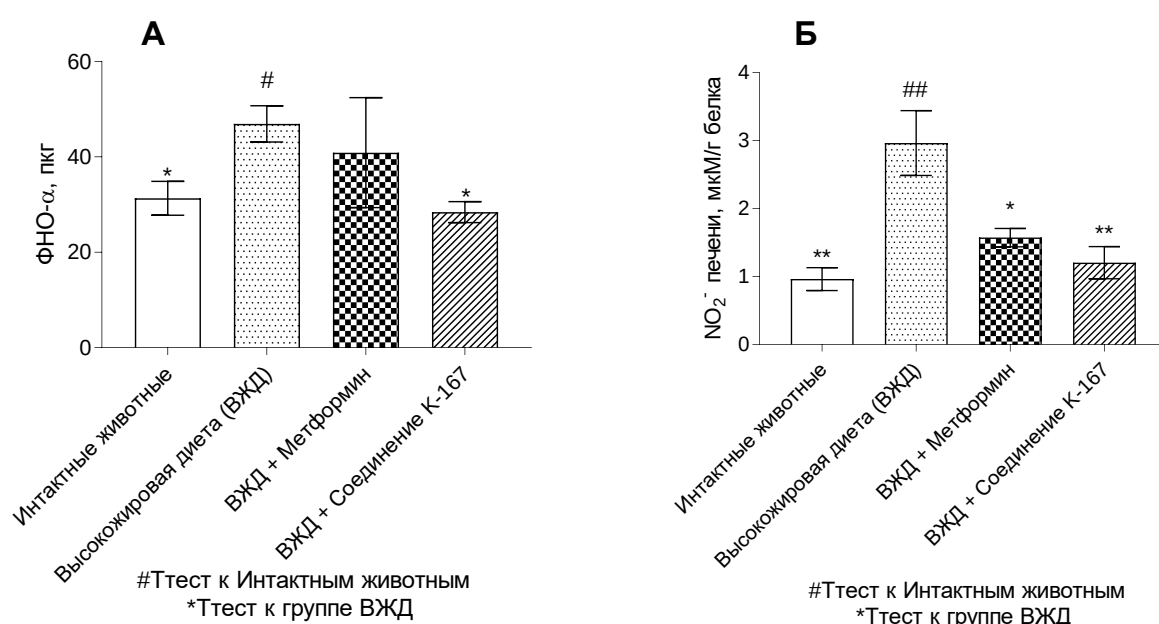


Рисунок 3.22. Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень ФНО-альфа плазмы крови (А) и оксида азота печени (Б) у животных с СД2 ($M \pm m$)

Содержание животных на ВЖД не изменило общего количества лейкоцитов, при этом выявлено значимое увеличение сегментоядерных нейтрофилов на 44,2 % и снижение количества лимфоцитов на 14,7 % от группы интактных животных. Препарат сравнения

«Метформин» нормализовал данные показатели до значений интактной группы животных, изменения относительно группы ВЖД составили 31,6 и 21,5 % соответственно. Производное К-167 достоверно корректировало влияние ВЖД на лейкоцитарную формулу, изменяя показатели на 38,0 и 21,5 % от группы ВЖД.

Высокожировая диета привела к достоверному увеличению уровня ФНО- α на 49,7 % и оксида азота печени в 3 раза относительно интактных животных. Метформин не оказал достоверного воздействия на уровень ФНО- α , но при этом нормализовал уровень оксида азота печени; изменения относительно группы ВЖД составили 12,8 и 46,9 % соответственно. Соединение К-167 оказало достоверное влияние на оба параметра, снижая их до уровня интактных животных (39,4 и 59,3 % от группы ВЖД).

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что ВЖД приводит к развитию хронического подострого воспаления: сохранению общего уровня лейкоцитов при изменении числа сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, а также повышению уровня фактора некроза опухолей и оксида азота. При этом противодиабетический препарат «Метформин» и соединение К-167 препятствовали его развитию.

На рисунке 3.23 представлены результаты определения уровней ТБК-активных продуктов и восстановленного глутатиона печени. Согласно литературным данным, состояние антиоксидантной и антирадикальной систем организма оказывает большое влияние на развитие инсулинорезистентности и прогрессирование осложнений сахарного диабета [Goh, Cooreg, 2008; Hirata и др., 2018].

Высокожировая диета вызывала нарушения в антирадикальной системе, приводя к увеличению уровня ТБК-активных продуктов в 5,2 раза и снижая уровень восстановленного глутатиона на 41,7 % относительно интактных животных. Метформин предотвратил увеличение количества ТБК-активных продуктов, снижение от группы ВЖД составило 77,5 %, но не восстанавливал запасы глутатиона, снижение относительно интактных животных 71,6 %. Соединение К-167 оказало влияние на оба показателя, предотвращая развитие оксидативного стресса и повышая уровень основного антирадикального компонента организма; снижение уровня ТБК-активных продуктов составило 71 % от группы ВЖД, при этом уровень восстановленного глутатиона увеличился на 97 % относительно интактных животных.

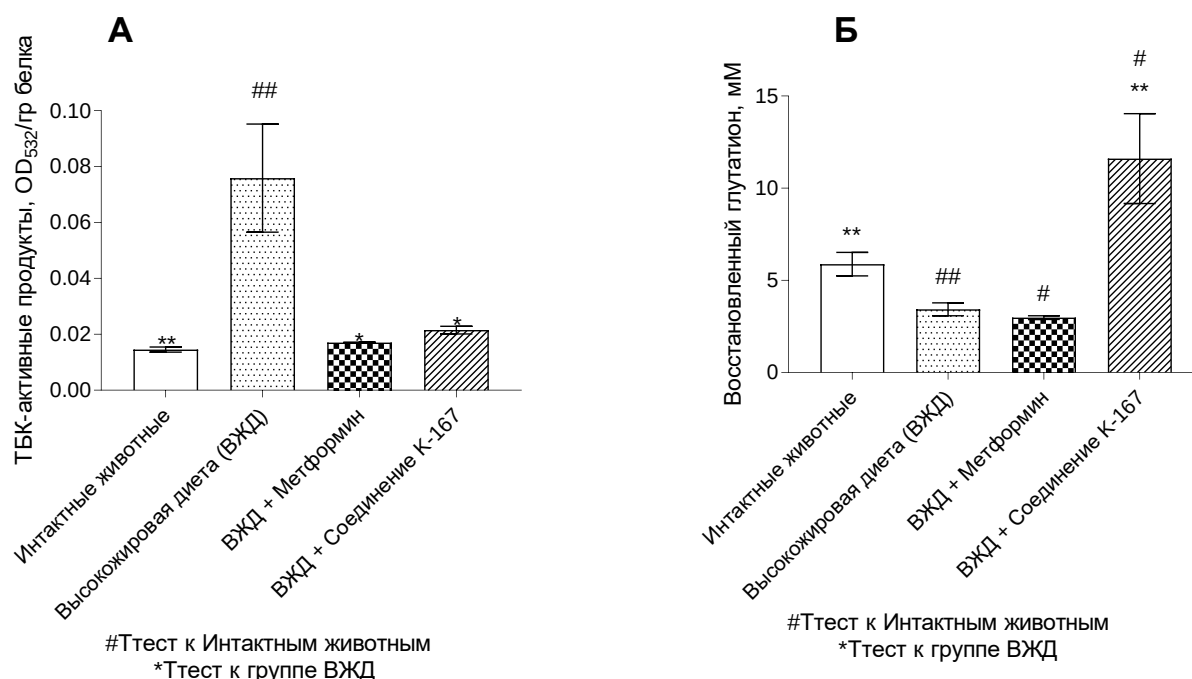


Рисунок 3.23. Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень ТБК-активных продуктов (А) и восстановленного глутатиона (Б) печени у животных с СД2 ($M \pm m$)

Выявлено, что вещество К-167 оказывает выраженное противовоспалительное действие, что отражает снижение развивающегося хронического подострого воспаления – одного из главных факторов инсулинорезистентности при СД2.

3.2.5. Влияние на поведенческую активность животных с моделью сахарного диабета 2-го типа

По литературным данным известно о неблагоприятном влиянии СД2 на когнитивные способности животных, поисковую активность, а также развитие выраженного стрессового состояния [Daniell, Bartlett, Siegel, 2013; Setti и др., 2015]. Для выявления подобных изменений и влияния на поведенческую активность ВЖД проведены тесты «Открытое поле» и «Распознавание нового объекта».

На рисунке 3.24 представлены результаты теста «Распознавание нового объекта».

У животных, содержащихся на ВЖД, отмечено достоверное снижение интереса к изучению нового объекта на 35,7 %. Препарат сравнения «Метформин» и соединение К-167 приводили к восстановлению данного показателя до уровня интактных животных, увеличение интереса к изучению нового объекта составило 67,9 и 63,9 % соответственно.

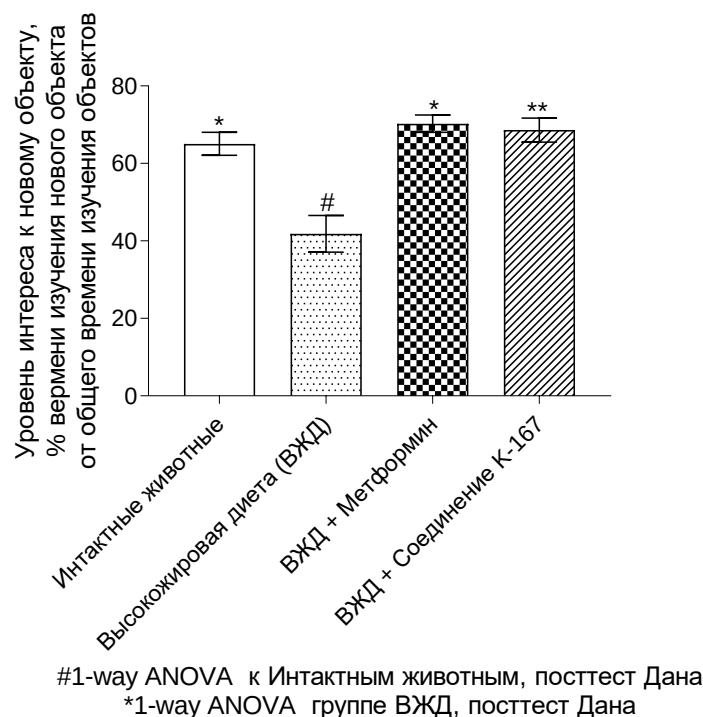


Рисунок 3.24. Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень интереса к новому объекту в тесте «Распознавание нового объекта» у животных с СД2 ($M \pm m$)

На рисунке 3.25 представлены результаты двигательной активности животных в тесте «Открытое поле».

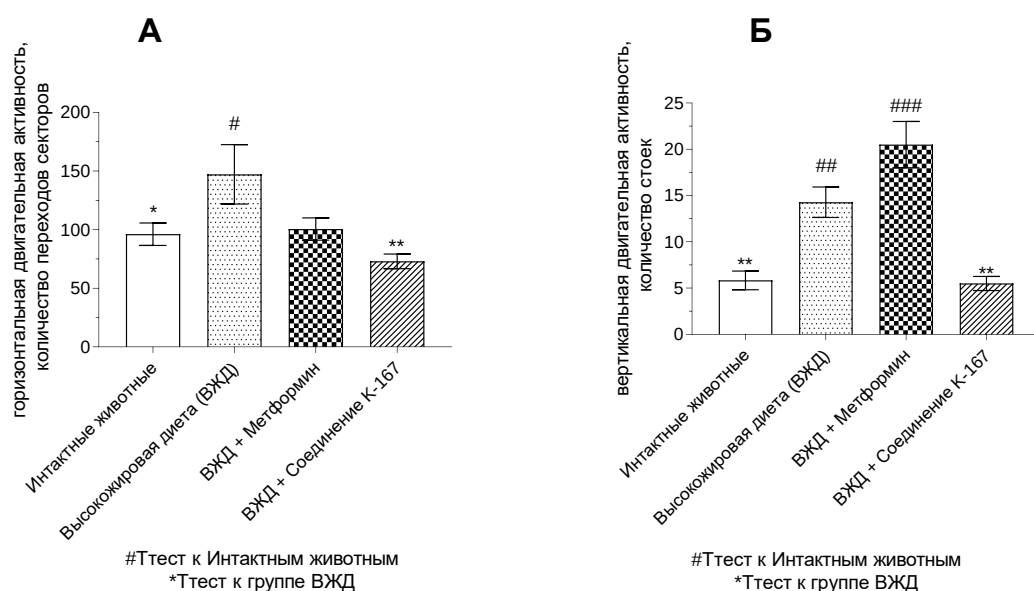


Рисунок 3.25. Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень горизонтальной (А) и вертикальной (Б) двигательной активности в тесте «Открытое поле» у животных с СД2 ($M \pm m$)

Показано повышение вертикальной (53 %) и горизонтальной (244,8 %) двигательной активности под влиянием ВЖД, подобная активность согласуется с данными литературы и соответствует повышению стрессового состояния животных [Reddy, 2015]. Метформин недостоверно снижал горизонтальную двигательную активность на 31,7 % от группы ВЖД, при этом влияние ВЖД на вертикальную двигательную активность не корректировалось метформином, увеличение от интактной группы составило 351,4 %. Исследуемое соединение К-167 вызывало стабилизацию данных показателей до уровня интактных животных, снижение показателей от группы ВЖД составило 50,4 и 61,5 % соответственно.

3.3. Противовоспалительные свойства соединения К-167

В результате проведенного хронического введения производного К-167 выявлено, что оно оказывает противовоспалительную активность, характерную как для ингибиторов GSK3B, так и для производных 2-оксиндола [Chen и др., 2014], для уточнения свойств соединения проведены дополнительные исследования.

Влияние на воспалительный ответ животных при введении липополисахарида

Наличие противовоспалительной активности у исследуемого вещества изучалось в тесте липополисахаридиндуцированного отека задней лапы. Липополисахарид является избирательным лигандом Tlr-4 (Toll-like 4) рецепторов, активация которых запускает воспалительный процесс, характеризующийся повышением объема отека в месте введения и выработкой медиаторов воспаления [Jerala, 2007]. На рисунке 3.26 представлено влияние соединения К-167 и препарата сравнения «Целекоксиба» на изменение объема липополисахаридиндуцированного отека.

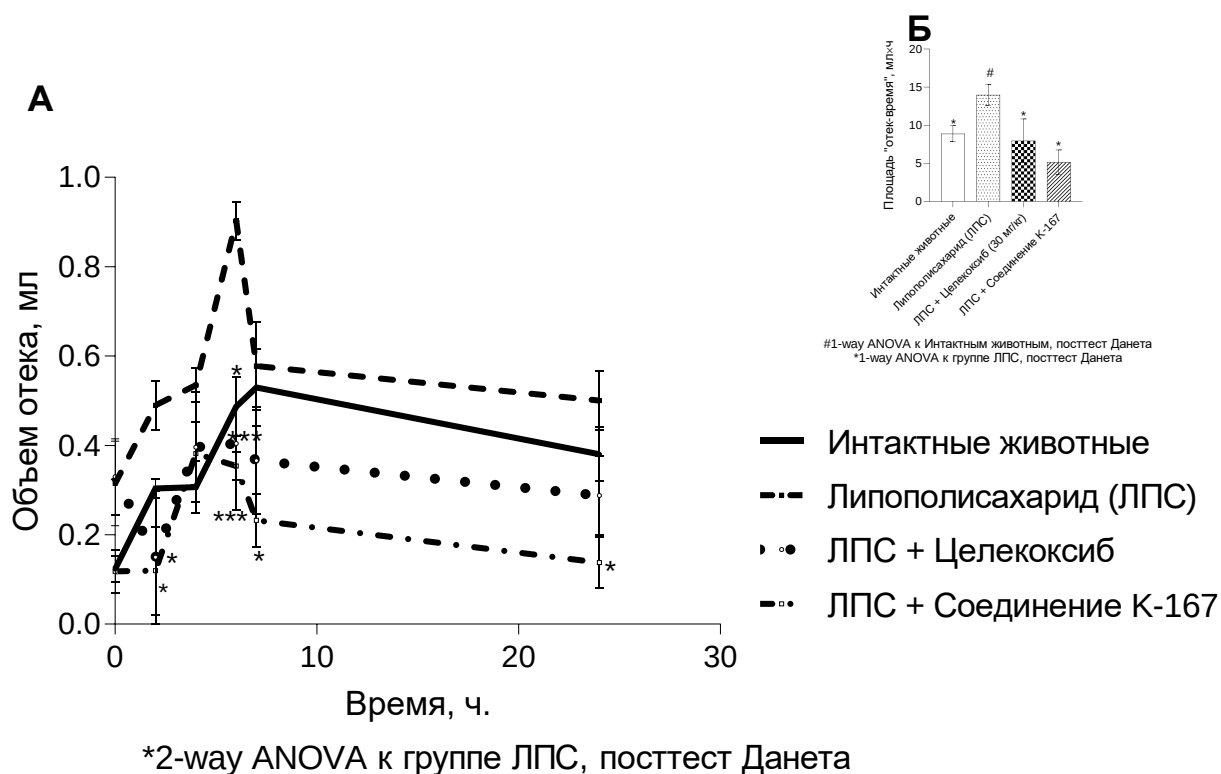


Рисунок 3.26. Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и целекоксиба (30 мг/кг) на объем (А) и площадь под кривой «Отек – Время» (Б) при липополисахаридиндуцированном отеке задней лапы крыс ($M \pm m$)

После интраплатантарного введения липополисахарида пик объема отека приходился на 6-й час эксперимента и составил $0,902 \pm 0,043$ мл, увеличение площади под кривой «Отек – Время» составило 57,5 %. Целекоксиб сглаживал максимальный пик отека до $0,404 \pm 0,148$ мл, снижение площади под кривой относительно группы ЛПС составило 43,0%. Соединение К-167 значительно снижает пик объема отека до $0,382 \pm 0,070$ мл, снижение площади под кривой составило 63,2 % от группы ЛПС.

На рисунке 3.27 представлены результаты влияния целекоксиба и производного К-167 на уровень выработки ранних медиаторов воспаления: оксида азота и фактора некроза опухолей α (ФНО- α).

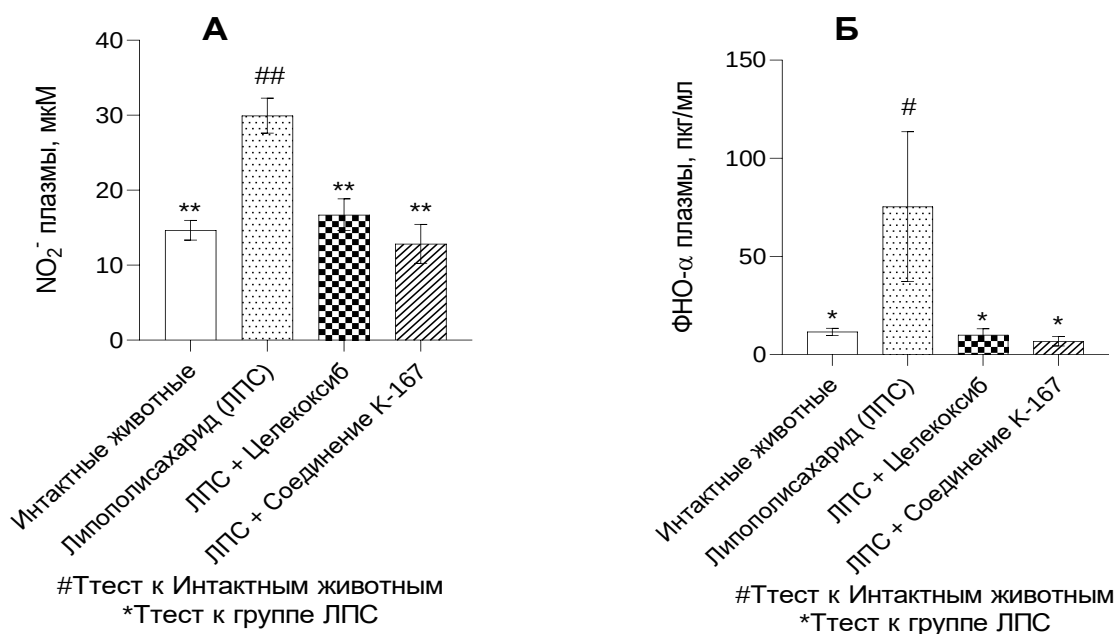


Рисунок 3.27. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и целекоксиба (30 мг/кг) на уровень оксида азота (А) и ФНО-α (Б) плазмы крови при интраплатарном введении липополисахарида интактным животным ($M \pm m$)

Липополисахарид при интраплатарном введении привел к увеличению уровня выработки оксида азота в 2 раза и ФНО-α в 6,5 раз. Целекоксиб нормализовал оба показателя до уровня интактных животных, снижение от группы ЛПС составило 44,2 и 86,7 % соответственно. Соединение К-167 препятствовало развитию изменений под влиянием липополисахарида, снижение относительно группы ЛПС составило 57,1 и 90,9 % соответственно.

Влияние на активацию макрофагов

Развитие хронического подострого воспаления при сахарном диабете посредством активации каскада Tlr4 рецепторов макрофагов жировой ткани свободными жирными кислотами приводит к постоянной гиперпродукции медиаторов воспаления, к развитию инсулинорезистентности, к снижению иммунитета и развитию оппортунистических инфекций [Gordon, 2007; Reddy, 2015]. В данном эксперименте моделировалось развитие активации макрофагов различными стимулами: липополисахарид – селективный активатор каскада Tlr4 рецепторов (соответствует влиянию сводных жирных кислот) [Strekalova и др., 2015]; Зимозан – полисахарид стенки грибов, селективно влияет на каскад Tlr2 рецепторов (соответствует влиянию присоединяющейся оппортунистической инфекции) [Lu, 2008].

Степень активации макрофагов под воздействием каждого из стимулов оценивалась в НСТ-тесте. Результаты проведенного эксперимента представлены на рисунке 3.28.

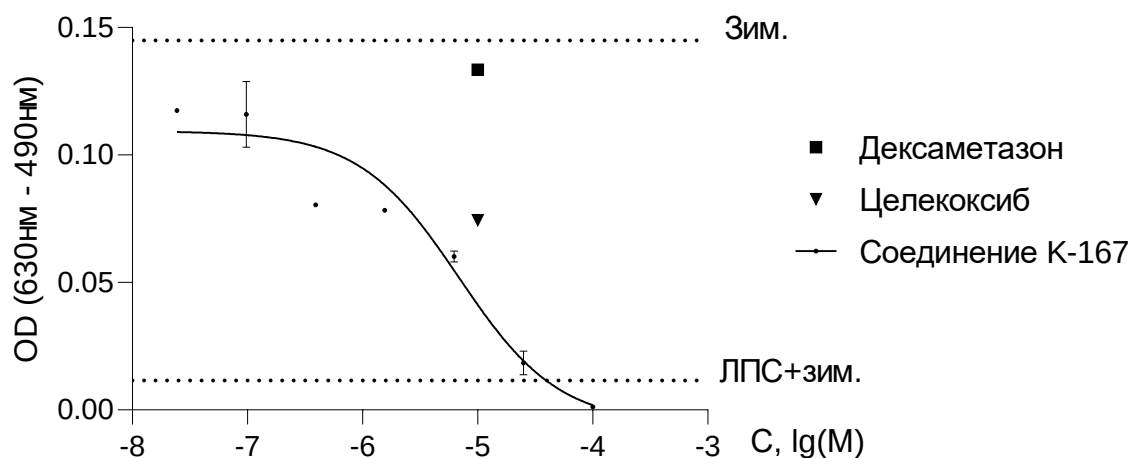


Рисунок 3.28. Влияние соединения К-167, дексаметазона и целекоксиба на уровень активации макрофагов липополисахаридом и неопсонизированным зимозаном в НСТ-тесте ($M \pm m$)

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что стимуляция клеток липополисахаридом за 24 ч до внесения зимозана приводила к отсутствию активации на повторный стимул. При этом клетки, стимулированные только зимозаном, были способны к активации. Противовоспалительные препараты «Целекоксиб» и «Дексаметазон» в конечной концентрации 10 мкМ оказывали влияние на степень активации клеток липополисахаридом, сохраняя внутренние запасы для последующей активации зимозаном, при этом клетки под воздействием дексаметазона продемонстрировали уровень активации, соответствующий клеткам, стимулированным только зимозаном. Соединение К-167 было исследовано в широком диапазоне концентраций, что позволило сделать вывод о зависимости характера его действия от концентрации, также показано сохранение воздействия вещества на клетки более 24 ч. В высоких микромолярных концентрациях производное К-167 предотвращало активирование клеток как липополисахаридом, так и зимозаном через 24 ч. При использовании наномолярных концентраций выявлено активирование клеток при стимуляции зимозаном. Показано, что К-167 в конечной концентрации 24,4 нМ приводит к сохранению уровня активации клеток, соответствующего зимозану.

Проведено изучение влияния соединения К-167 в зависимости от концентрации на выработку оксида азота и ИЛ-6 перитонеальными макрофагами мышей под воздействием липополисахарида. Результаты представлены на рисунке 3.29.

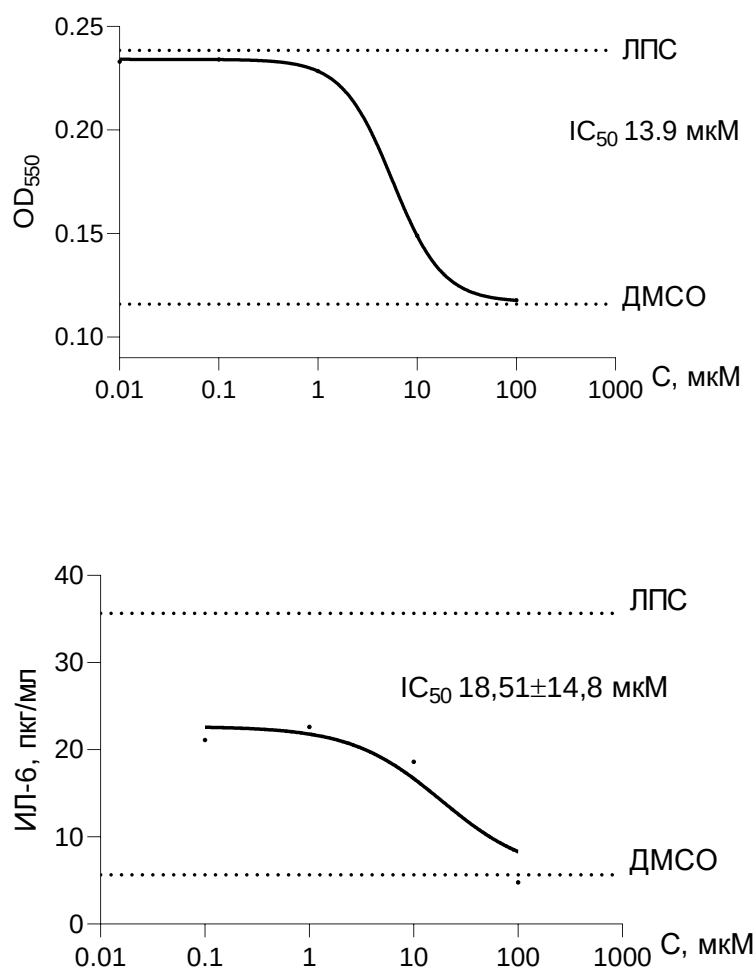


Рисунок 3.29. Влияние соединения К-167 на выработку оксида азота и ИЛ-6 перитонеальными макрофагами под воздействием липополисахарида.

По результатам эксперимента, введение липополисахарида увеличивало синтез оксида азота первичными перитонеальными макрофагами мышей в 2 раза. Исследуемое соединение К-167 достоверно снижало его уровень, показатель IC₅₀ составил 13,9 мкМ.

В проведенном эксперименте базальный уровень выработки ИЛ-6 макрофагами составил $5,65 \pm 2,70$ пкг/мл, под воздействием липополисахарида он был увеличен до $35,63 \pm 7,19$ пкг/мл. Соединение К-167 в конечной концентрации 100 мкМ полностью препятствовало активации макрофагов и выработке ИЛ-6, при этом конечная концентрация полуингибирования составила $18,51 \pm 14,80$ мкМ.

Влияние на фагоцитарную активность

Для изучения влияния на фагоцитарную активность макрофагов проведен НСТ-тест при дополнительной активации клеток липополисахаридом. Активация фагоцитоза

проводилась опсонизированным комплементом зимозаном. Опсонизация зимозана приводит к тому, что макрофаги фагоцитируют его частицы и внутриклеточно стимулируется белок семейства лектинов типа С (дектин-1), который вызывает активацию ядерного фактора «каппа-би» (выработка воспалительных цитокинов, оксидативный стресс, активация каскада арахидоновой кислоты и активация фагоцитоза) и противогрибкового иммунитета (активация фагоцитоза, оксидативного стресса, образование противогрибковых цито- и хемокинов) [Thomas и др., 2008].

Результаты проведенного эксперимента представлены на рисунках 3.30 и 3.31.

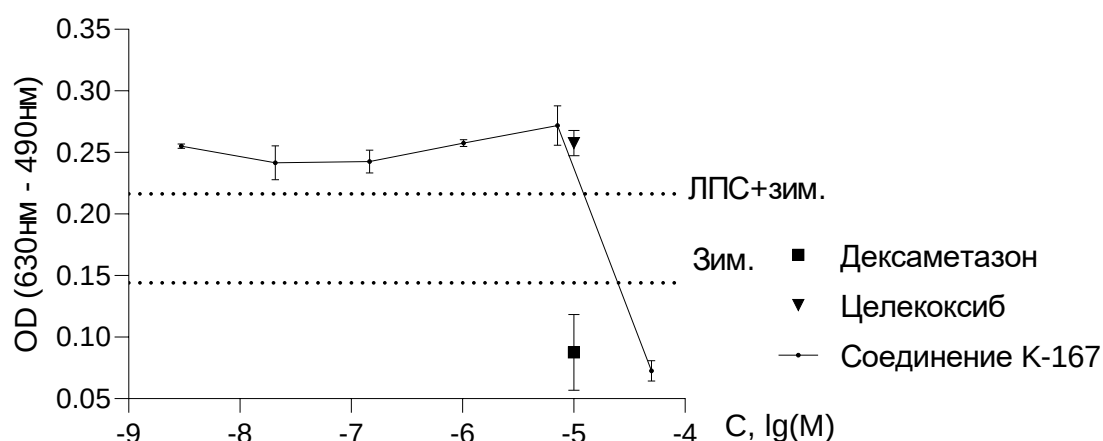


Рисунок 3.30. Влияние соединения К-167, дексаметазона и целекоксиба на уровень фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов интактных мышей в НСТ-тесте ($M \pm m$)

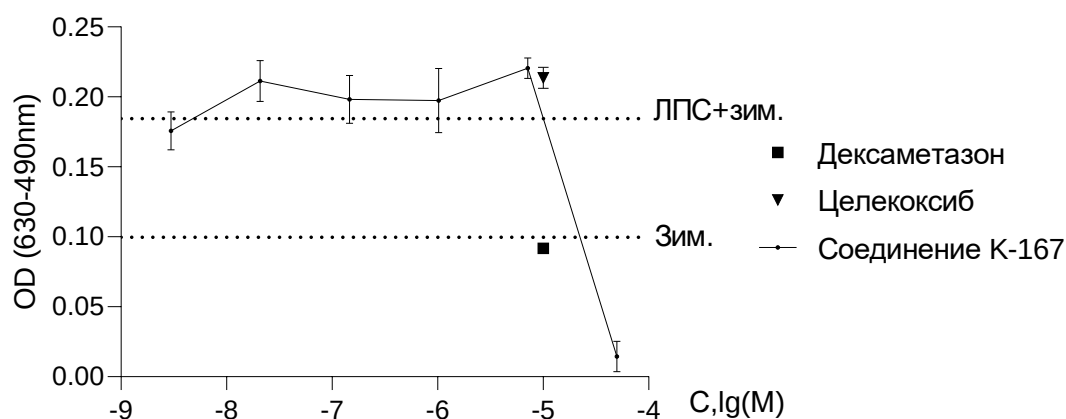


Рисунок 3.31. Влияние соединения К-167, дексаметазона и целекоксиба на уровень фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мышей с сахарным диабетом в НСТ-тесте ($M \pm m$)

Согласно данным проведенного эксперимента, можно сделать вывод о повышении фагоцитарной активности первичных перитонеальных макрофагов при совместном стимулировании липополисахаридом и опсонизированным зимозаном на 50,2 % для клеток, выделенных из интактных животных, и на 83,5 % для животных с моделированным СД». Целекоксиб не оказывал достоверного воздействия на фагоцитарную активность макрофагов, уровень ответа соответствовал результатам группы ЛПС + зимозан. Дексаметазон нивелировал повышение фагоцитарной активности под влиянием липополисахарида. Исследуемое вещество К-167 не оказывало значимого эффекта на фагоцитарную активность вплоть до конечной концентрации 7,1 мкМ.

Для подтверждения полученных результатов проведена микроскопическая оценка фагоцитарной активности, а также влияния на активацию клеток при их окраске по Романовскому. Полученные микрофотографии представлены в таблице 3.4. На рисунке 3.32 приведены результаты определения основных показателей фагоцитарной активности и степени распастанности макрофагов.

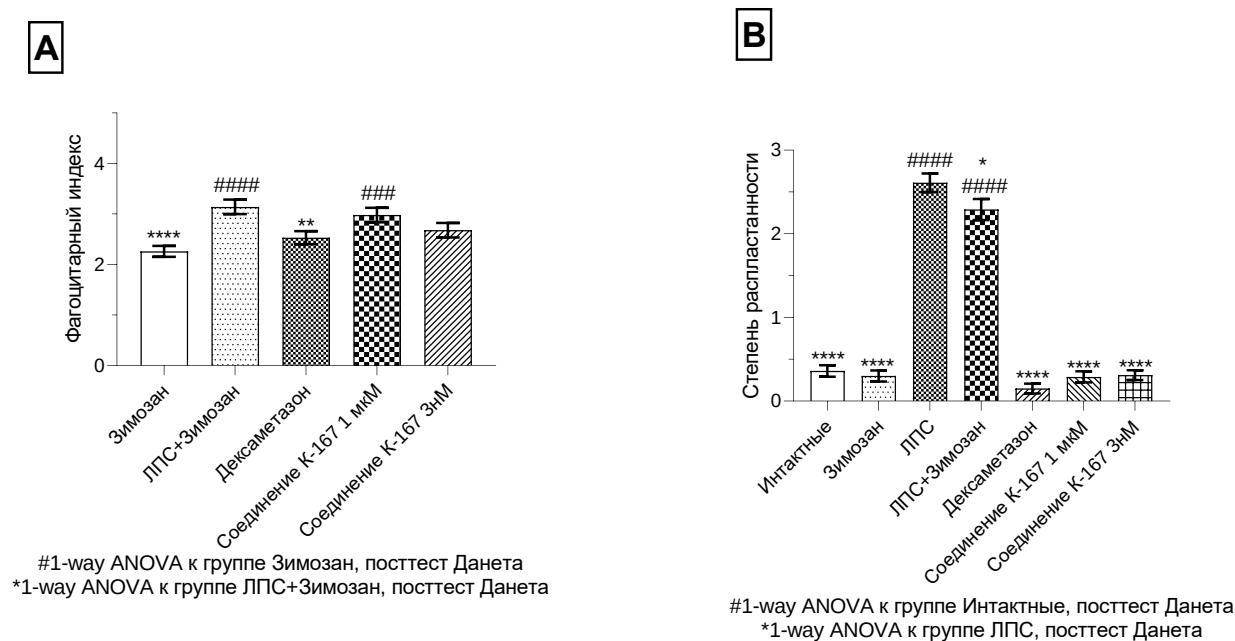
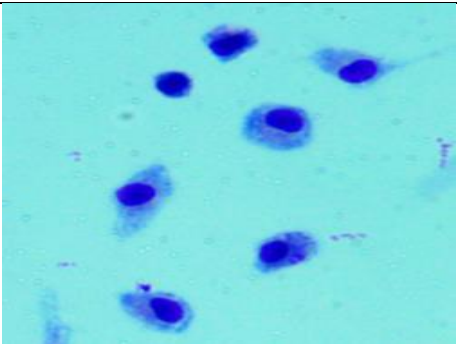
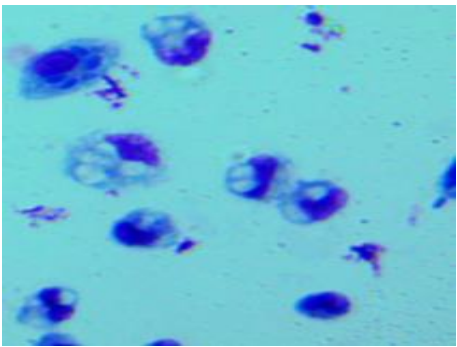
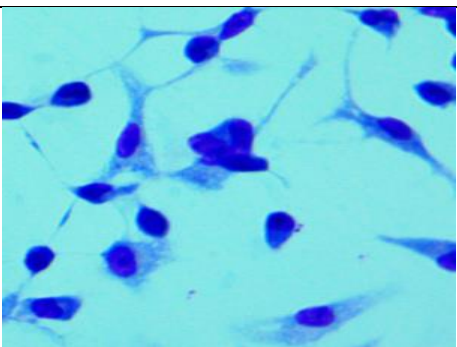
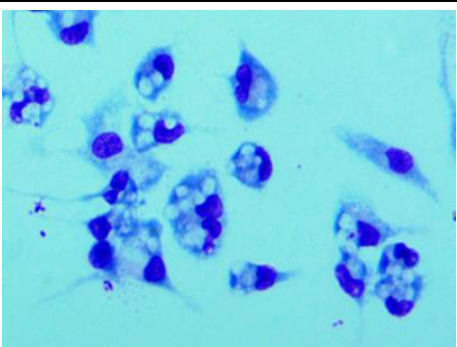
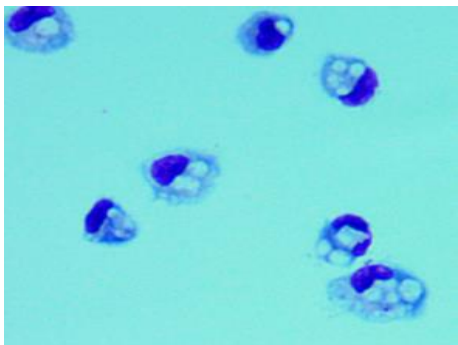
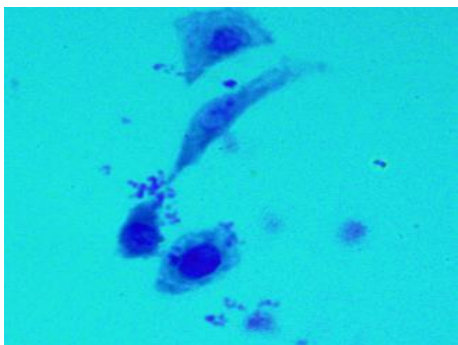
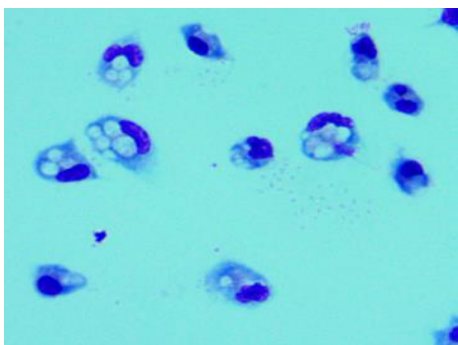
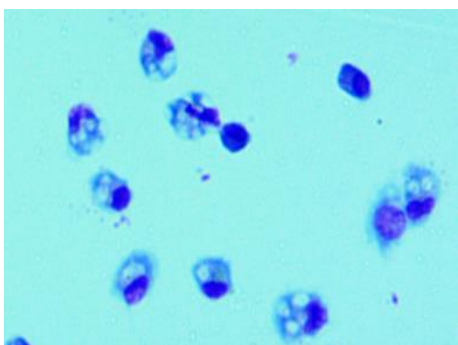


Рисунок 3.32. Влияние дексаметазона и соединения К-167 в зависимости от концентрации на количество зерен зимозана (А) и степень распастанности (В) перитонеальных макрофагов (M ± m)

Влияние соединения К-167 и дексаметазона на фагоцитарную активность
перитонеальных макрофагов, окраска по Романовскому

Группа	Конечная концентрация вещества	Фагоцитарный индекс, $M \pm m$	Микрофотография
		Показатель распластанности, $M \pm m$	
1	2	3	4
Интактные клетки		—	
		$0,360 \pm 0,068^*$	
Зимозан		$2,260 \pm 0,108^*$	
		$0,300 \pm 0,065^*$	
Липополисахарид (ЛПС)		—	
		$2,610 \pm 0,111^\#$	
Липополисахарид (ЛПС) + зимозан		$3,140 \pm 0,143^\#$	
		$2,290 \pm 0,126^\#*$	

1	2	3	4
Дексаметазон	10 мкМ	$2,530 \pm 0,129^*$	
		$0,150 \pm 0,068^*$	
Соединение К-167	50 мкМ	—	
		—	
	1 мкМ	$2,980 \pm 0,144\#$	
		$0,29 \pm 0,065^*$	
	3 нМ	$2,680 \pm 0,144$	
		$0,310 \pm 0,059^*$	

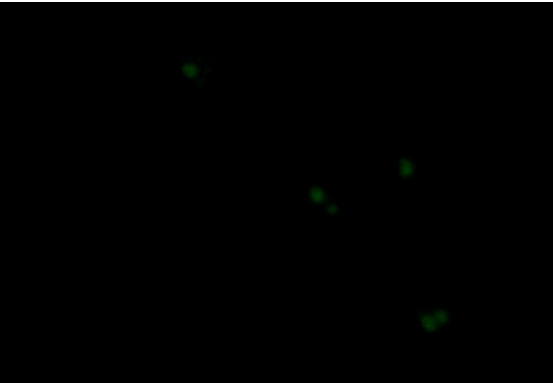
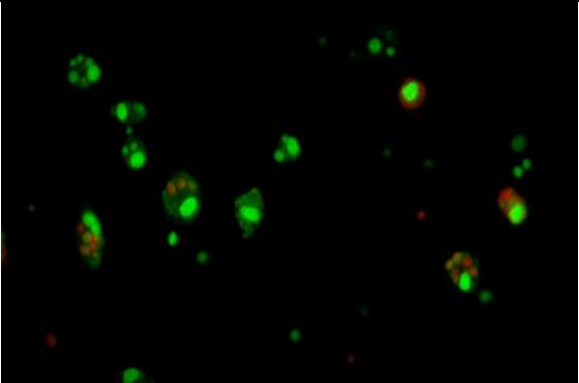
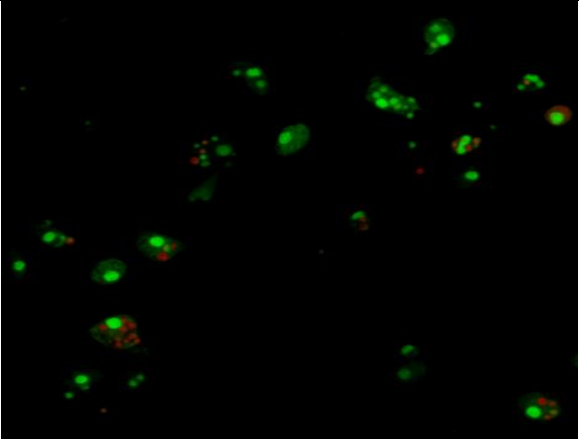
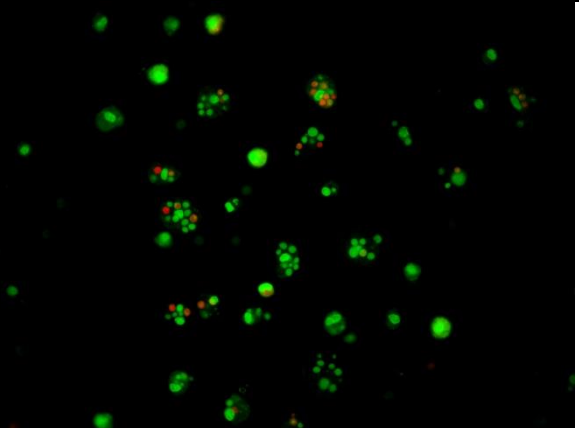
Примечание: Фагоцитарный индекс – # – 1-way ANOVA к группе «Зимозан», пост-тест Даннета; * – 1-way ANOVA к группе ЛПС + Зимозан, пост-тест Даннета. Показатель распластанности: # – 1-way ANOVA к группе «Интактные», пост-тест Даннета; * – 1-way ANOVA к группе ЛПС, пост-тест Даннета.

Интактная группа в большинстве представлена неактивированными клетками округлой формы без включений, представлено небольшое количество вытянутых активированных клеток (показатель распластанности $0,36 \pm 0,068$). Группа клеток с добавленным опсонированным зимозаном имеет округлую форму (показатель распластанности $0,300 \pm 0,065$) и заметные включения фагоцитированного зимозана (зерен зимозана $2,260 \pm 0,129$). Группа липополисахарида представлена активированными клетками с выпячиваниями цитоплазмы (показатель распластанности $2,610 \pm 0,118$), без заметных включений зимозана. Клетки, обработанные опсонизированным зимозаном и липополисахаридом, имели вытянутую форму (показатель распластанности $2,290 \pm 0,126$) с заметными включениями зимозана (зерен зимозана $3,140 \pm 0,143$). Препарат сравнения «Дексаметазон» предотвратил активацию макрофагов (показатель распластанности $0,150 \pm 0,057$), но при этом достоверно снизил их уровень фагоцитарной активности (зерен зимозана $2,530 \pm 0,129$). Исследуемое соединение К-167 в концентрации 50 мкМ привело к значительной гибели клеток; в концентрациях 1 мкМ и 3 нМ предотвратило активацию макрофагов (показатель распластанности $0,290 \pm 0,065$ и $0,310 \pm 0,059$), сохранив фагоцитарную активность на уровне группы ЛПС + Зимозан (зерен зимозана $2,980 \pm 0,144$ и $2,680 \pm 0,144$).

Также для оценки фагоцитарной активности проведен тест с дрожжами, меченными акридиновым оранжевым, полученные микрофотографии представлены в таблице 3.5.

Интактная группа представлена клетками без заметных включений. Группа контроля представлена клетками с включениями дрожжей на разных стадиях фагоцитоза (дрожжей на клетку $2,530 \pm 0,132$). Препарат сравнения дексаметазон и исследуемое соединение К-167 не оказали значимого влияния на фагоцитарную активность клеток (дрожжей на клетку $2,620 \pm 0,137$ и $2,690 \pm 0,140$ соответственно), в каждой из групп присутствуют клетки с поглощенными окрашенными дрожжами на разных стадиях фагоцитоза (ярко зеленые – начальные стадии, красные – завершение фагоцитоза).

Влияние соединения К-167 и дексаметазона на фагоцитарную активность перитонеальных нейтрофилов с дрожжами, меченными акридиновым оранжевым

Группа	Фагоцитарный индекс, $M \pm m$	Микрофотография
Интактные клетки	—	
Клетки, инкубированные с дрожжами	$2,530 \pm 0,132$	
Дексаметазон	$2,620 \pm 0,137$	
Соединение К-167	$2,690 \pm 0,140$	

Влияние на зимозан-опосредованную хемилюминесценцию

При фагоцитозе чужеродных для организма частиц фагоциты вырабатывают активные формы кислорода (АФК) для борьбы с ними. Выработка АФК в них происходит за счет содержащегося в мембранах фермента НАДФН-оксидазы [Ushio-Fukai, 2006]. Для изучения влияния соединения К-167 на выработку АФК проведено исследование на двух типах клеток: макрофагах и нейтрофилах. Первичные клеточные линии инкубировались с опсонизированным комплементом зимозаном при последующем добавлении люминола. Люминол является детектирующим агентом для АФК, переходя при взаимодействии с ними в радикальную форму и излучая при этом квант света, что возможно детектировать при измерении люминесценции [Kobayashi и др., 2001; Vilim, 1989]. Полученные результаты влияния производного К-167 на продукцию АФК макрофагами и нейтрофилами в зависимости от конечной концентрации соединения представлены на рисунках 3.33 и 3.34.

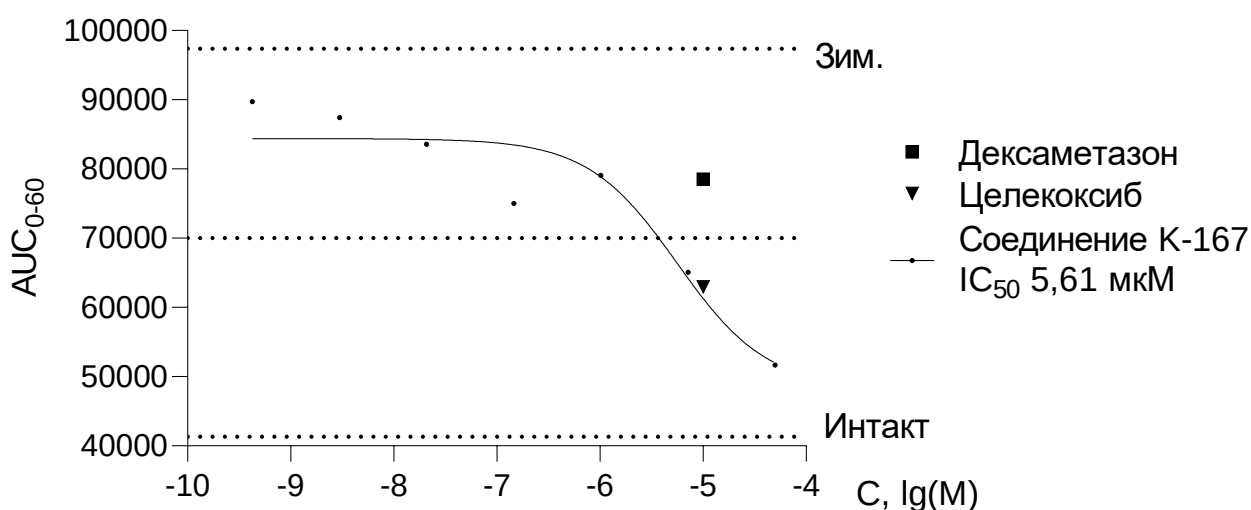


Рисунок 3.33. Влияние соединения К-167, дексаметазона и целекоксиба на уровень зимозан-опосредованной хемилюминесценции перитонеальных макрофагов мышей ($M \pm m$)

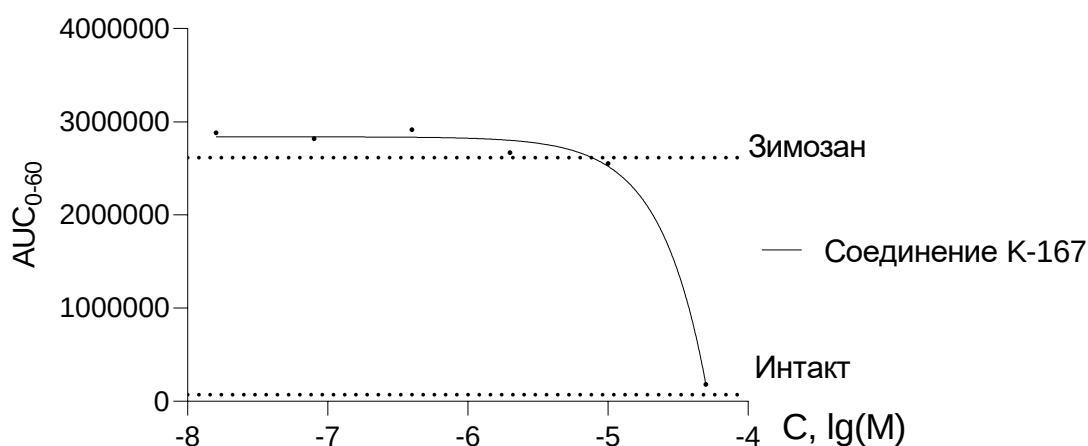


Рисунок 3.4. Влияние соединения К-167 на уровень зимозан-опосредованной хемилюминесценции перитонеальных нейтрофилов мышей ($M \pm m$)

Согласно полученным результатам можно сделать вывод, что препараты сравнения дексаметазон и целекоксиб снижают уровень генерации АФК первичными макрофагами мышей на 19,3 и 35,3 % соответственно. Оказываемое соединением К-167 влияние на выработку АФК макрофагами зависело от конечной концентрации (показатель IC_{50} 5,61 мкМ). При этом исследуемое производное не оказывает влияния на уровень респираторного взрыва нейтрофилов (конечная концентрация 50 мкМ вещества К-167 является цитотоксичной для нейтрофилов) в диапазоне концентраций до 10 мкМ.

3.4. Антиагрегантная и антитромботическая активность соединения К-167

Прогрессирование СД2 приводит к развитию большого количества осложнений [Cade, 2008; Santos Dos, 2019]. Основные из них взаимосвязаны с системой крови, в частности повышенная агрегационная активность и частота образования тромбов [Vazzana и др., 2012; Yin и др., 2017]. В связи с этим актуальной задачей является определение антиагрегантных и антитромботических свойств потенциальных противодиабетических веществ.

3.4.1. Антиагрегантная активность *in vitro*

Для изучения антиагрегантной активности производного К-167 было использовано два индуктора агрегации тромбоцитов: АДФ, для выявления собственной атиагрегантной

активности соединения, и коллаген. Согласно литературным данным, активация тромбоцитов коллагеном через GPIV и GPIb-IX-V осуществляется с участием каскада PI3K/АКТ/GSK3B [Estevez, Du, 2017]. Результаты проведенных исследований представлены в таблицах 3.6 и 3.7.

Таблица 3.6

Влияние ацетилсалициловой кислоты и соединения К-167 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ (5 мкМ)

Тестируемый образец	Δ% ингибирования агрегации тромбоцитов, М ± m			IC50, мкМ
	100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
Ацетилсалициловая кислота	52,1 ± 4,2*	20,8 ± 3,5	4,6 ± 1,7	104,0
Соединение К-167	68,2 ± 6,8*	36,0 ± 13,5	24,7 ± 6,0	21,0

Примечание: * – Ттест к группе контроля (p < 0,05).

Выявлено наличие выраженной антиагрегантной активности у производного 2-оксиндола К-167, превышающей по активности кислоту ацетилсалициловую в 5 раз.

Таблица 3.7

Влияние ацетилсалициловой кислоты и соединения К-167 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную коллагеном (15 мкг/мл)

Образец	Δ% ингибирования агрегации, М ± m			IC50, мкМ
	100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
Ацетилсалициловая кислота	95,52 ± 4,99*	13,75	7,64 ± 3,42	49,3
Соединение К-167	99,83 ± 0,11*	94,45 ± 4,07*	18,81	3,02

Примечание: * – Ттест к группе контроля (p < 0,05).

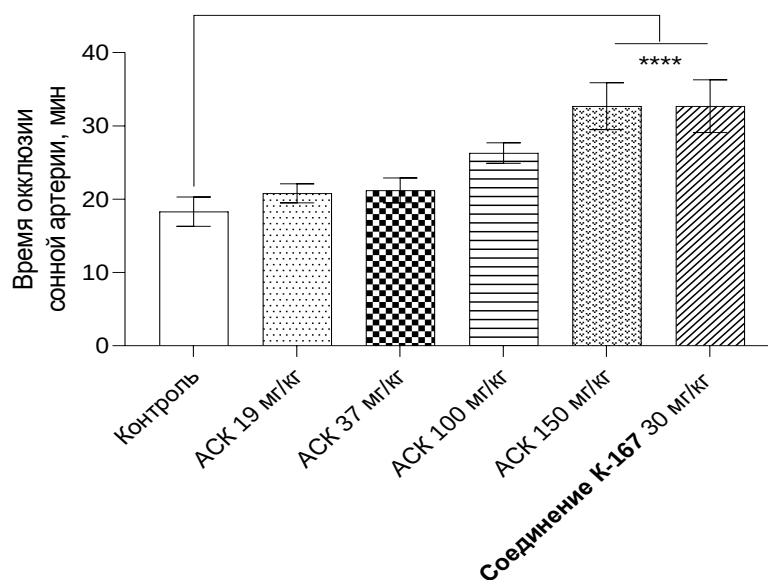
Исследуемое вещество К-167 оказывает выраженную антиагрегантную активность при использовании коллагена в качестве индуктора агрегации, превышая по активности кислоту ацетилсалициловую в 16 раз.

Исходя из проведенных тестов, наличие у соединения К-167 антиагрегантной активности является положительным признаком, позволяющим использовать его для коррективки осложнений сахарного диабета.

3.4.2. Антитромботическая активность *in vivo*

В качестве модели для исследования антитромботической активности было выбрано исследование времени окклюзии сонной артерии крыс, индуцированной аппликацией 50%-м раствором хлорида железа (III). Формирование тромба и закупорка сосуда происходят под влиянием образующихся свободных радикалов и прогрессирующей артериальной дисфункции, что во многом схоже с патологическим процессом, наблюдаемым при СД2 [Vazzana и др., 2012]. Согласно литературным данным, ингибирование GSK3B оказывает протективное действие на эндотелий сосудов, а также активирует антирадикальную и антиоксидантную системы организма [Li, 2008; Wang и др., 2018]. Результаты проведенного эксперимента представлены на рисунке 3.35.

Согласно полученным результатам исследований можно сделать вывод, что соединение К-167 оказывает выраженную антитромботическую активность на модели тромбоза, индуцированного аппликацией 50%-м раствором хлорида железа (III). Исследуемая доза производного К-167 30 мг/кг по развивающемуся эффекту (уровень пролонгирования времени окклюзии сонной артерии $+78,51 \pm 19,48$ %) соответствовала дозе 150 мг/кг ацетилсалициловой кислоты (уровень пролонгирования времени окклюзии сонной артерии $+68,4 \pm 16,4\%$). Исходя из того, что данная модель схожа по развивающейся патологии с наблюдаемой при сахарном диабете, можно говорить о его высоком потенциале предотвращения развития его поздних осложнений.



1-way ANOVA к группе Контроль, посттест Данета

Рисунок 3.35. Влияние соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты на время окклюзии сонной артерии, индуцированной аппликацией 50%-м раствором хлорида железа (III) интактным животным ($M \pm m$)

3.5. Оценка лекарственного подобия основных фармакокинетических и токсикологических свойств соединения К-167 по показателям ADMET

Для уточнения перспективности дальнейшего фармакологического изучения соединения К-167 проведен прогноз фармакокинетических и токсикологических свойств *in silico*, используя 5 наиболее распространенных интернет-сервисов ADMET. В связи с отсутствием используемых в клинической практике лекарственных препаратов с подобным механизмом действия, препарат сравнения отсутствует. Полученные результаты представлены в таблице 3.8.

Таблица 3.8

Результаты прогноза ADMET показателей соединения К-167

Показатель	Результат прогноза
	Соединение К-167
Лекарственное подобие	
Коэффициент лекарственного подобия	2,702
Фармакокинетические показатели	
Проницаемость в линии клеток Сасо-2	Проницаем
Локализация в клетке	Митохондрии
Абсорбция в ЖКТ	93,42%
Проницаемость в ГЭБ	Проникает через ГЭБ
Объем распределения (л/кг)	1,39
Токсикологические показатели	
Класс острой токсичности	4
Показатель LD ₅₀ острой токсичности (крысы, мг/кг)	796,81
Хроническая токсичность (крысы, мг/кг/день)	93,54
Максимальная переносимая доза (люди, мг/кг/день)	0,416
Тест Эймса	Возможна мутагенность
Канцерогенность	Не канцероген
Гепатотоксичность	Возможна токсичность
Иммунотоксичность	Возможна токсичность
Мутагенность	Не мутаген
Цитотоксичность	Не токсичен
Кожное раздражение	Не вызывает раздражения

Положительное значение коэффициента лекарственного подобия говорит о высокой перспективности дальнейшего исследования молекулы. Высокая адсорбция из ЖКТ, а также способность проникать через клеточные мембраны создает предпосылки для дальнейшего исследования вещества в виде пероральных лекарственных форм. Принадлежность к 4-му классу острой токсичности (малотоксичные вещества) говорит о возможном наличии широкого терапевтического интервала применения вещества и его низкой токсичности. Опасения вызывает возможное наличие мутагенности в тесте Эймса, гепато- и иммунотоксичности, оценка которых требует проведения дополнительных фармакологических исследований. В свою очередь, отсутствие канцерогенности, мутагенности и цитотоксичности является положительным моментом для дальнейшего углубленного изучения вещества. При планировании дальнейшего исследования необходимо проведение титрования дозы введения и определение порога, при котором могут быть выражены побочные эффекты.

3.6. Острая токсичность при пероральном введении белым мышам

Для экспериментального определения токсикологических свойств исследуемого соединения проведен тест изучения острой токсичности на белых мышах, результаты которого представлены в таблице 3.9.

Согласно полученным результатам, соединение К-167 не проявило признаков острой токсичности в дозе 2 г/кг, выживаемость животных через 2 недели после введения вещества составляла 100 %, значимых изменений в весе животных не обнаружено. При этом, согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. Миронова А.Н., а также Руководству международной организации по содружеству и развитию (OECD Guideline) при исследовании острой токсично малорастворимых веществ, максимальная исследуемая доза равняется 2 г/кг, при отсутствии токсических эффектов. В данном случае малорастворимое соединение относят к классу нетоксичных с показателем $LD_{50} > 5$ г/кг.

Влияние соединения К-167 (2 г/кг, перорально) на выживаемость интактных животных

Группа	№ животного	Выживаемость в первые 24 ч	Выживаемость через 2 нед. после введения	Вес животного			Токсичность
				День введения	1 нед. после введения	2 нед. после введения	
Контрольная группа	1	+	+	25,9	25,8	25,8	–
	2	+	+	26,7	26,5	26,7	–
	3	+	+	27,5	27,4	27,8	–
	4	+	+	20,5	21,2	21,5	–
	5	+	+	24,7	24,8	25,0	–
Соединение К-167	1	+	+	23,7	23,9	23,9	–
	2	+	+	23,3	23,5	23,6	–
	3	+	+	25,6	25,4	25,6	–
	4	+	+	25	24,8	25,2	–
	5	+	+	22,7	23,0	23,2	–

Заключение

Исходя из полученных результатов исследования, можно сделать вывод, что соединение К-167 проявило антигипергликемическую, антидиабетическую, противовоспалительную и антиагрегантную активности в тестах *in vivo*, а также противовоспалительную и антиагрегантную в тестах *in vitro*. Результаты проведенного курсового введения вещества животным с моделированным СД2 свидетельствуют о наличии высокого антидиабетического потенциала. Результаты биохимических и морфологических клеточных исследований позволяют сделать вывод, что производное К-167 предотвращает индуцированную липополисахаридом активацию макрофагов и синтез ИЛ-6, при этом не влияя на процесс фагоцитоза. Отсутствие чрезмерной поляризации макрофагов и влияния на врожденный бактериальный ответ говорит о благоприятном иммунотропном действии исследуемого

вещества. Согласно рассчитанным показателям ADMET, можно предположить перспективность дальнейшего изучения соединения-лидера, при этом некоторые показатели лекарственной безопасности требуют дальнейшего углубленного рассмотрения. При планировании предполагаемого исследования необходимо проведение титрования дозы введения и определение порога, при котором могут быть выражены побочные эффекты. Выявлено, что соединение К-167 относится к классу нетоксичных веществ с показателем $LD_{50} > 5$ г/кг.

3.8. Антидиабетическая активность соединения К-248

Производное К-248 оказывает ингибирующую GSK3B активность, в ранее проведенных исследованиях выявлена его высокая способность проникновения в клетку и наличие противовоспалительной активности, что характерно для данного класса соединений, согласно литературным данным [Kim K. М.и др., 2015; Wagman, Johnson, Bussiere, 2005]. Исследуемое соединение протестировано на наличие антидиабетической активности в клеточной модели, оценивающей влияние на утилизацию глюкозы, а также на животных моделях СД2.

3.8.1. Влияние на утилизацию глюкозы фибробластами крыс

Влияние производного 2-оксинодола К-248 на захват глюкозы изучалось на неонатальных фибробластах крыс по способности её захвата из питательной среды, в которой культивировались клетки. Результаты эксперимента представлены на рисунке 3.36.

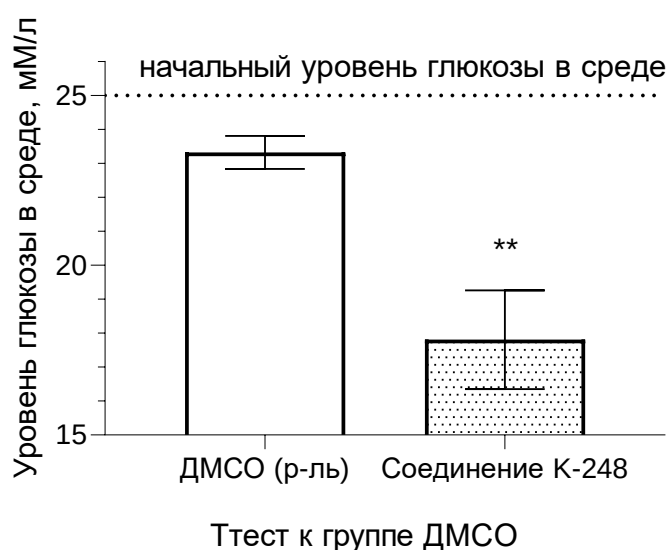


Рисунок 3.36. Влияние соединения К-248 в концентрации 20 мкМ на способность захвата глюкозы неонатальными фибробластами сердца крыс ($M \pm m$)

Исходя из полученных результатов эксперимента, можно сделать вывод, что соединение К-248 улучшает захват глюкозы неонатальными фибробластами на $272,70 \pm 48,76 \%$, относительно контрольных значений. Данное влияние расширяет профиль антидиабетического действия вещества.

3.8.2. Антидиабетическая активность при курсовом введении

Для изучения влияния соединения К-248 на патогенез сахарного диабета при курсовом введении была выбрана доза 30 мг/кг, эквивалентная изученному производному К-167 (см. подраздел 3.2). Мыши линии c57bl/6j с моделированным СД2 были рандомизированы на группы: ВЖД, ВЖД и введения препарата сравнения «Метформин» в дозе 100 мг/кг (ВЖД + метформин), ВЖД и введения соединения К-248 в дозе 30 мг/кг (ВЖД + К-248). Также выделена группа интактных животных без моделированного сахарного диабета. Курсовое введение изучаемого вещества и препарата сравнения проводилось ежедневно в течение 3 месяцев (90 дней). Для определения влияния соединения на патогенез заболевания были выбраны следующие показатели: вес животных, уровень глюкозы натощак, результаты интраперитонеальных тестов толерантности к глюкозе (ИТТГ), уровень инсулина плазмы крови и показатель инсулинорезистентности (углеводный обмен), уровни висцеральных жировых отложений и триглицеридов печени (жировой обмен), лейкоцитарная формула крови, уровни фактора некроза опухолей α (ФНО- α), плазмы крови и оксида азота печени (воспалительный процесс); уровни ТБК-активных продуктов и восстановленного глутатиона печени (уровень оксидативного стресса).

На рисунке 3.37 представлена динамика изменения веса животных во время курсового введения. При этом не было выявлено статистически значимых изменений веса животных во всех исследовательских группах.

Начальная масса животных составляла $24,00 \pm 0,40$ г. В первый день начала введения исследуемых веществ средняя масса интактных животных составила $31,00 \pm 0,59$ г, а животных, получавших ВЖД, $33,80 \pm 0,75$ гр. На 90-й день курсового введения веществ средний вес животных по группам составил: интактные животные – $31,00 \pm 1,32$ гр.; ВЖД – $35,10 \pm 2,13$ г; ВЖД + метформин – $28,40 \pm 3,72$ г; ВЖД + К-248 – $35,40 \pm 0,87$ г. При этом статистически достоверных изменений между группами выявлено не было, но обнаружена тенденция к снижению массы тела в группе ВЖД + метформин.

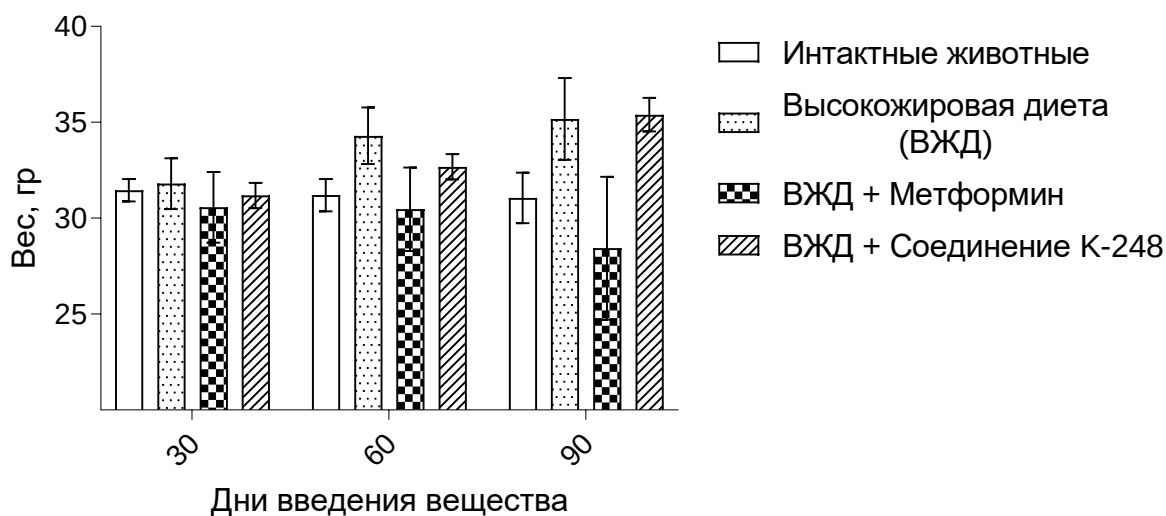
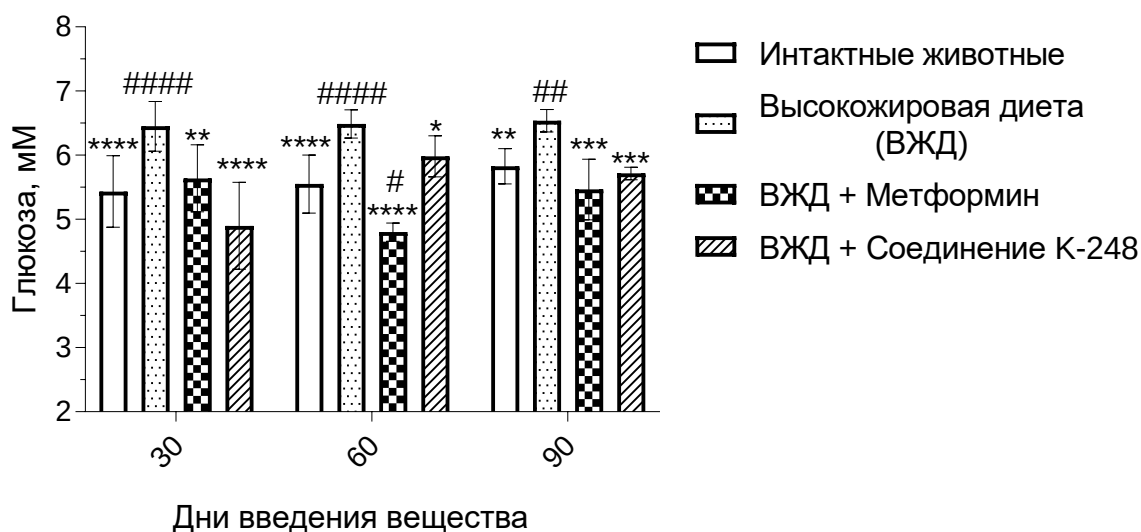


Рисунок 3.37. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на массу тела животных с СД2 во время курсового введения ($M \pm m$)

На рисунке 3.38 представлены результаты измерения глюкозы плазмы крови натощак во время курсового введения.



2-way ANOVA к Интактным животным, посттест Данета

* 2-way ANOVA к группе ВЖД, посттест Данета

Рисунок 3.38. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень глюкозы плазмы крови у животных с СД2 во время курсового введения ($M \pm m$)

В первый день введения исследуемых веществ уровень глюкозы плазмы крови интактных животных составил $5,40 \pm 0,23$ Мм, а животных, получавших ВЖД, $6,00 \pm 0,08$ Мм (Рисунок 3.39). На 90-й день курсового введения веществ изменения по группам составили:

интактные – $5,80 \pm 0,10$ Мм; ВЖД – $6,50 \pm 0,06$ Мм; ВЖД + метформин – $5,40 \pm 0,27$ Мм; ВЖД + К-248 – $5,70 \pm 0,40$ Мм. Показано значимое увеличение уровня глюкозы плазмы крови натошак под влиянием ВЖД, прирост составил 12 %. Препарат сравнения «Метформин» и соединение К-248 предотвратили развитие гипергликемии. При этом для препарата сравнения на 60-й день курсового введения выявлен гипогликемический эффект, что не характерно для исследуемого производного.

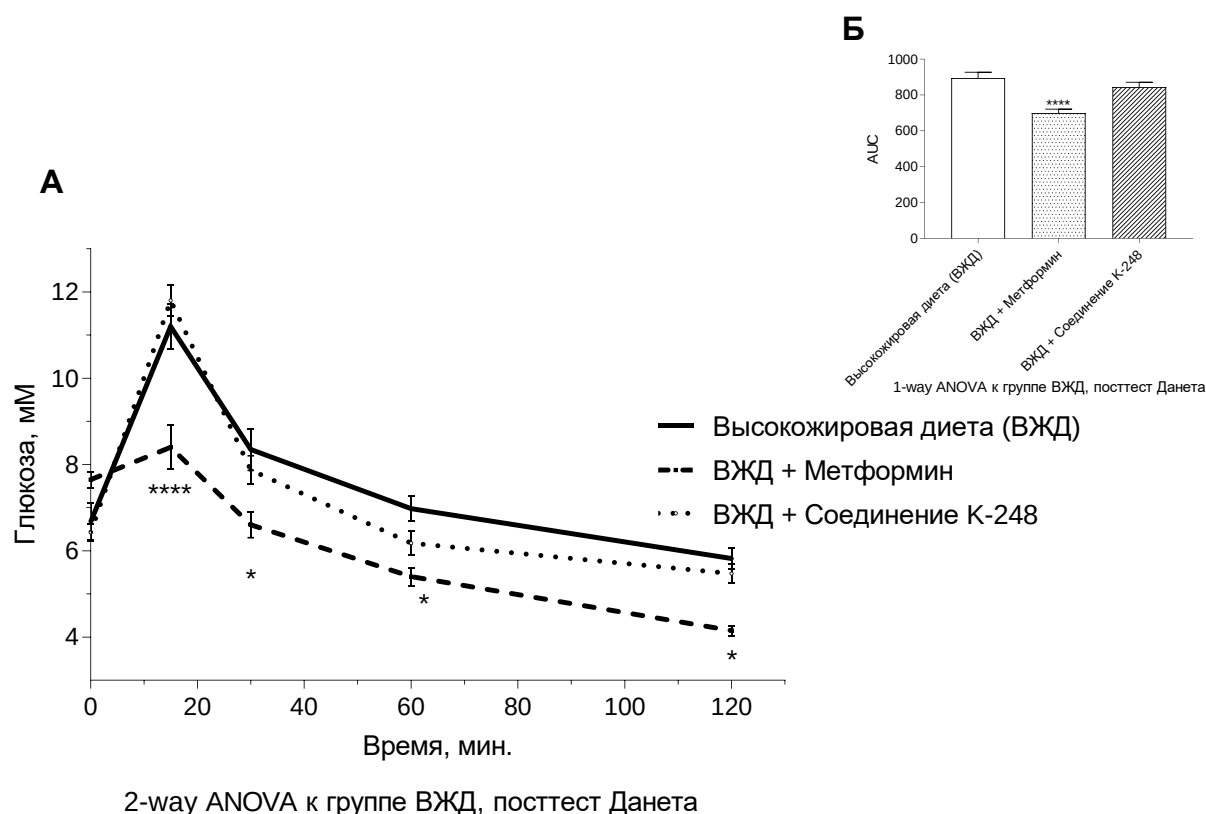


Рисунок 3.39. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень глюкозы плазмы крови при интраперитонеальной нагрузке глюкозой (2 г/кг) (А) и площадь под кривой «Глюкоза – Время» (Б) на животных с СД2, 1-й день курсового введения ($M \pm m$)

Глюкоза у группы ВЖД вызывала пик гипергликемии на 15-й минуте с максимальным уровнем глюкозы плазмы крови $11,20 \pm 0,52$ мМ/л. Метформин сглаживал максимальный пик гипергликемии до $8,40 \pm 0,51$ мМ/л, при этом площадь под кривой «Глюкоза – Время» снизилась на 21,8 % относительно группы ВЖД. Соединение К-248 не влияло на выраженность пика гипергликемии. Так, на 15-й минуте эксперимента он составил $11,80 \pm 0,37$ мМ/л, площадь под кривой «Глюкоза – Время» недостоверно снизилась на 5,6 % (Рисунок 3.40).

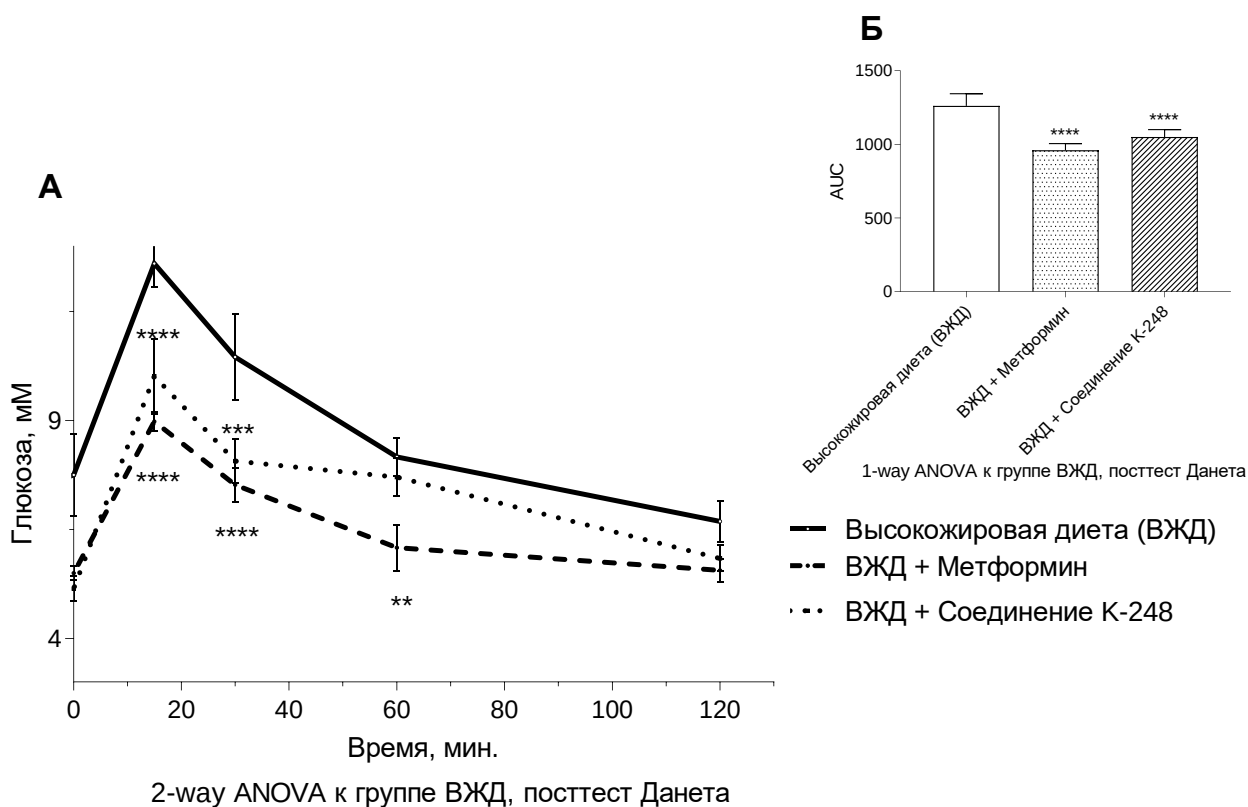


Рисунок 3.40. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень глюкозы плазмы крови при интраперитонеальной нагрузке глюкозой (2 г/кг) (А) и площадь под кривой «Глюкоза – Время» (Б) на животных с СД2, 45-й день курсового введения ($M \pm m$)

У группы ВЖД максимальный уровень глюкозы плазмы крови составил $12,60 \pm 1,20$ мМ/л на 15-й минуте после введения глюкозы. Препарат сравнения «Метформин» снижал максимальный пик гипергликемии до $8,97 \pm 0,45$ мМ/л, при этом площадь под кривой «Глюкоза – Время» снизилась на 23,9 % относительно группы ВЖД. Соединение К-248 значительно снижало пик гипергликемии, на 15-й минуте эксперимента он составил $9,04 \pm 0,58$ мМ/л. Снижение площади под кривой «Глюкоза – Время» составило 21,6 % (Рисунок 3.41).

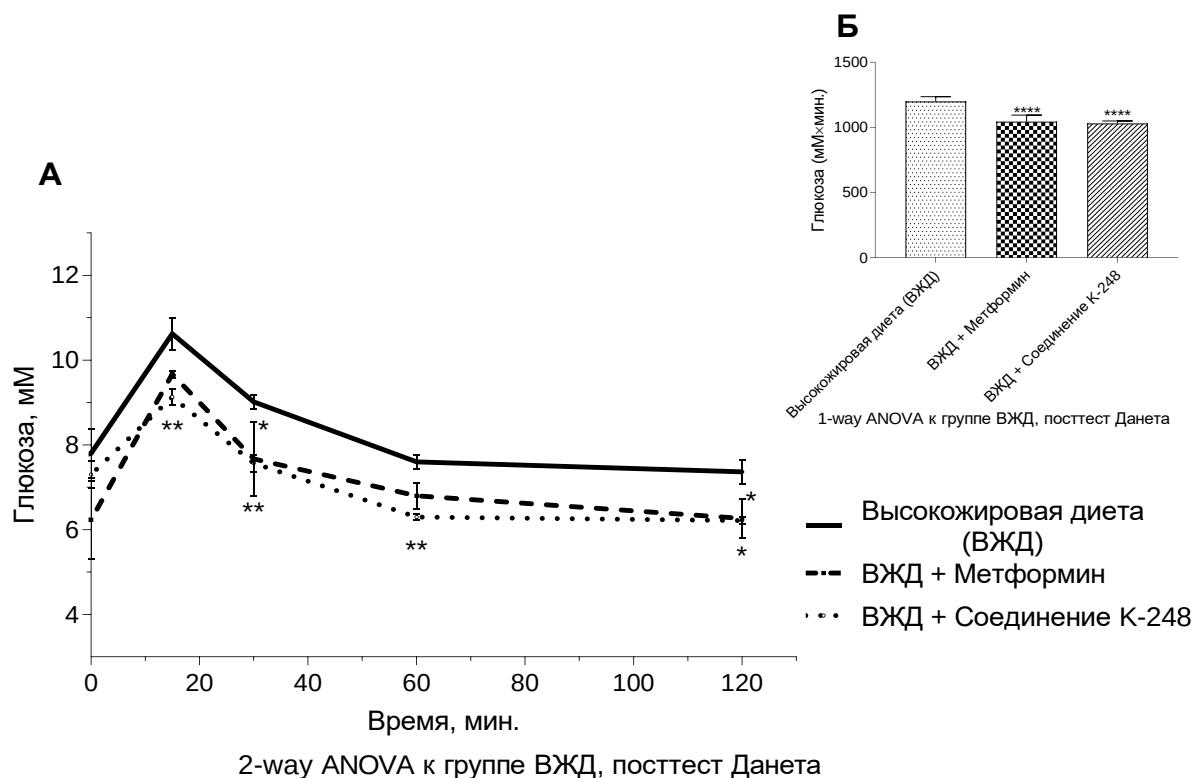


Рисунок 3.41. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень глюкозы плазмы крови при интраперитонеальной нагрузке глюкозой (2 г/кг) (А) и площадь под кривой «Глюкоза – Время» (Б) на животных с СД2, 90-й день курсового введения ($M \pm m$)

Глюкоза у группы ВЖД вызвала максимальный пик гипергликемии через 15 мин, до значений $10,60 \pm 0,37$ мМ/л. Метформин снижал выраженность данного пика, при этом значения глюкозы плазмы крови составили $9,60 \pm 0,08$ мМ/л, а снижение площади под кривой «Глюкоза – Время» 12,9 %. Производное К-248 вызывало уменьшение максимального значения уровня глюкозы плазмы крови до $9,10 \pm 0,18$ мМ/л, а уровня кривой на 14 %.

На рисунке 3.42 представлены результаты проведенной морфометрии жировой ткани животных.

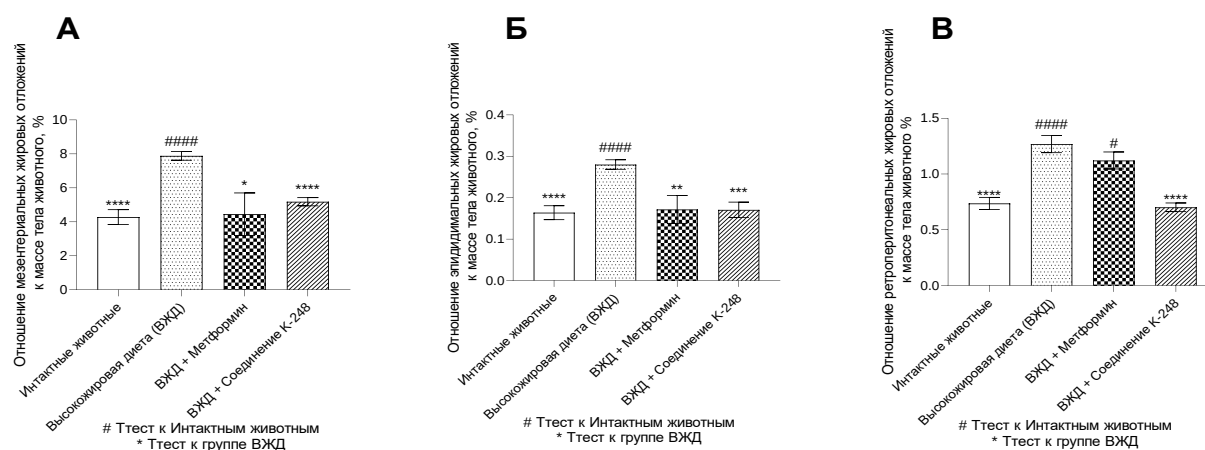


Рисунок 3.42. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень мезентериальных (А), эпидидимальных (Б) и ретроперитонеальных (В) жировых отношений у животных с СД2 ($M \pm m$)

У группы ВЖД выявлено достоверное увеличение всех типов жировых отложений относительно интактных животных: мезентериальных – на 84, 2%, эпидидимальных – на 70,9 % и ретроперитонеальных – на 72,2 %. Метформин значимо снижал количество мезентериальных и эпидидимальных жировых отложений на 43,5 и 38,7 % соответственно, относительно группы ВЖД. При этом достоверного влияния на ретроперитонеальные жировые отложения (снижение на 11,5 %) не обнаружено. Исследуемое вещество К-248 привело к значимым изменениям всех типов абдоминальных жиров, снижая их до уровня интактных животных (снижение на 34,3; 39,1 и 44,6 % соответственно от группы ВЖД).

На рисунке 3.43 приведены уровни глюкозы и инсулина плазмы крови, а также рассчитанный индекс инсулинорезистентности.

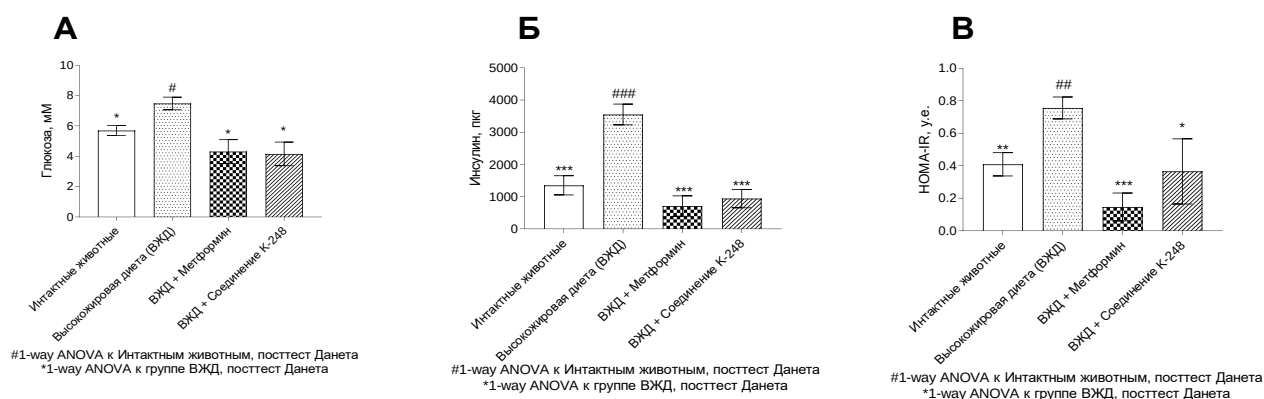


Рисунок 3.43. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень глюкозы (А) и инсулина (Б) плазмы крови, а также рассчитанный показатель инсулинорезистентности HOMA-IR (В) животных с СД2 ($M \pm m$)

Содержание животных на ВЖД привело к значимому увеличению уровня глюкозы плазмы крови на 31,3 %, инсулина в 2,6 раза, а индекса инсулинорезистентности на 84 %. Препарат сравнения «Метформин» снижал данные показатели до уровня интактных животных, изменения относительно группы ВЖД составили 42,3; 80,0 и 80,5 %. Соединение К-248 достоверно корректировало данные показатели, снижение относительно группы ВЖД составило 44,4; 73,5 и 51,6 %.

Содержание животных на ВЖД привело к значимому увеличению уровня триглицеридов печени на 23 % (Рисунок 3.44). Метформин не оказал достоверного влияния на данный показатель, снижение относительно группы ВЖД составило 17,3 %. Производное К-248 нормализовало значения данного параметра до уровня интактных животных, снижение его относительно группы ВЖД – на 15,1 %.

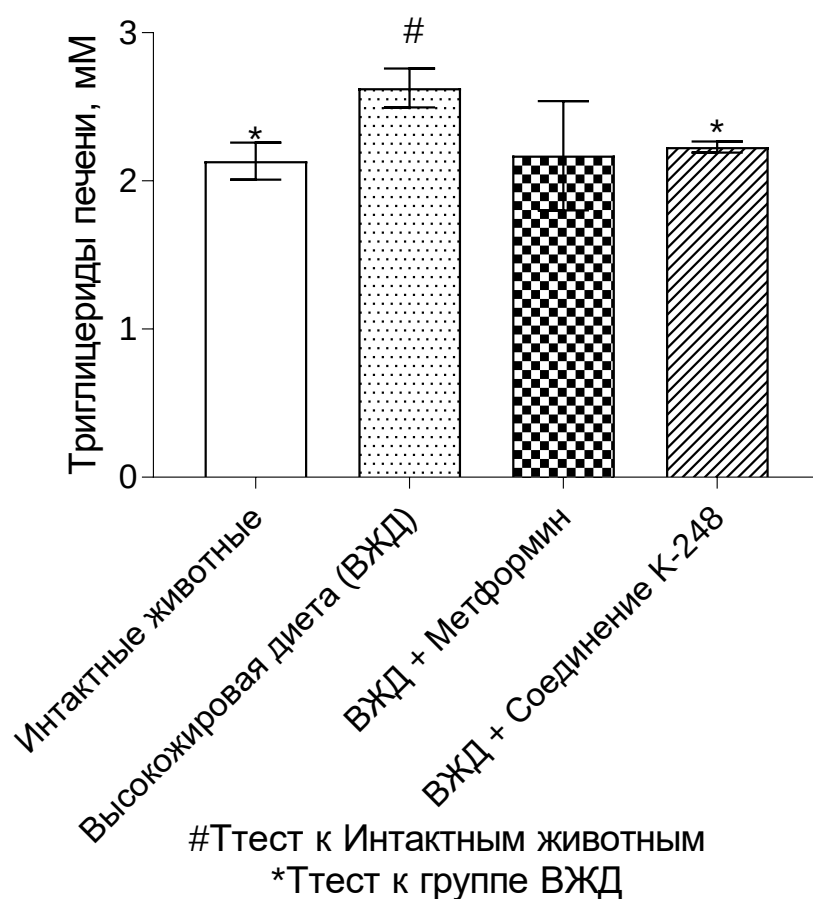


Рисунок 3.44. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень триглицеридов печени у животных с СД2 ($M \pm m$)

Согласно полученным результатам, можно сделать вывод, что производное К-248 оказывает антидиабетический эффект, увеличивающийся со временем введения соединения, нормализуя показатели углеводного и жирового обмена животных и препятствуя прогрессированию заболевания.

3.8.3. Влияние на воспалительный статус животных с моделью сахарного диабета 2-го типа

Для выявления различий в воспалительном статусе животных было проведено определение лейкоцитарной формулы крови (Рисунок 3.45), а также ранних медиаторов воспаления: уровня оксида азота в печени и фактора некроза опухолей α (ФНО- α) плазмы крови (Рисунок 3.46).

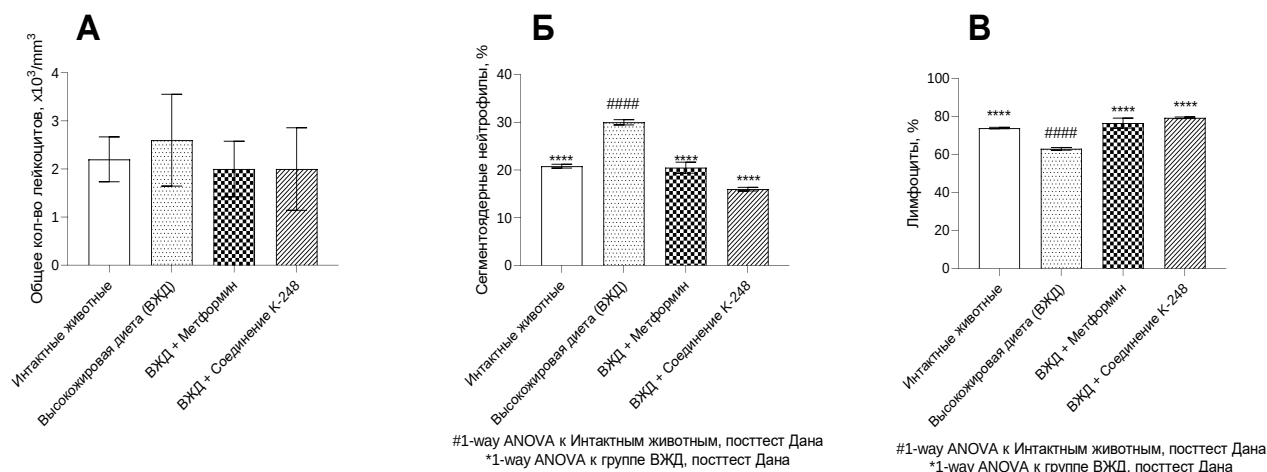


Рисунок 3.45. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на общее количество лейкоцитов (А), уровень сегментоядерных нейтрофилов (Б) и лимфоцитов (В) у животных с СД2 ($M \pm m$)

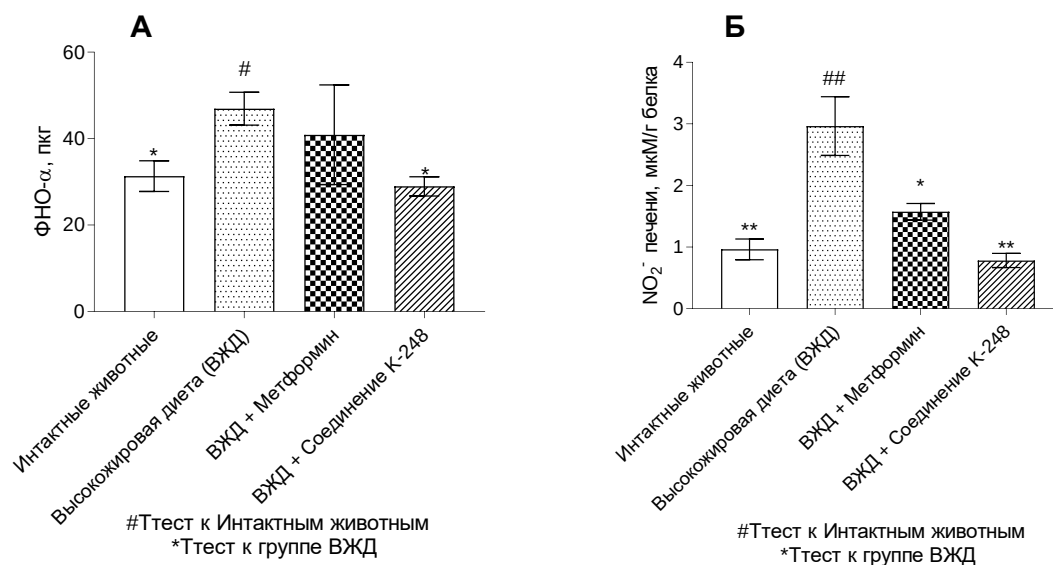


Рисунок 3.46. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень ФНО- α плазмы крови (А) и оксида азота печени (Б) у животных с СД2 ($M \pm m$)

Содержание животных на ВЖД не изменило общего количества лейкоцитов, при этом выявлено значимое увеличение сегментоядерных нейтрофилов на 44,2 % и снижение количества лимфоцитов на 14,7 % от группы интактных животных. Метформин нормализовал показатели лейкоцитарной формулы крови, изменения относительно группы ВЖД составили 31,6 и 21,5 % соответственно. Соединение К-248 достоверно корректировало влияние ВЖД на лейкоцитарную формулу, изменяя показатели на -46,6 % и 25,8 % от группы ВЖД.

Содержание животных на ВЖД достоверно увеличивало уровень ФНО- α на 49,7 % и оксида азота печени в 3 раза относительно интактных животных. Метформин не оказал достоверного воздействия на уровень ФНО- α , но при этом нормализовал уровень оксида азота печени; изменения относительно группы ВЖД составили 12,8 и 46,9 % соответственно. Соединение К-248 оказало достоверное влияние на оба параметра, снижая их до уровня интактных животных (38,2 % и 73,6 % от группы ВЖД).

Выявлено, что ВЖД приводит к развитию хронического подострого воспаления: сохранению общего уровня лейкоцитов при изменении числа сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов, а также повышению уровня фактора некроза опухолей и оксида азота. При этом противодиабетический препарат «Метформин» и производное К-248 препятствовали его развитию.

Состояние антиоксидантной и антирадикальной систем организма оказывает большое влияние на развитие инсулинорезистентности и прогрессирование осложнений сахарного диабета, согласно литературным данным [Goh, Cooper, 2008; Hirata и др., 2018]. На рисунке 3.47

представлены результаты определения уровней ТБК-активных продуктов и восстановленного глутатиона печени.

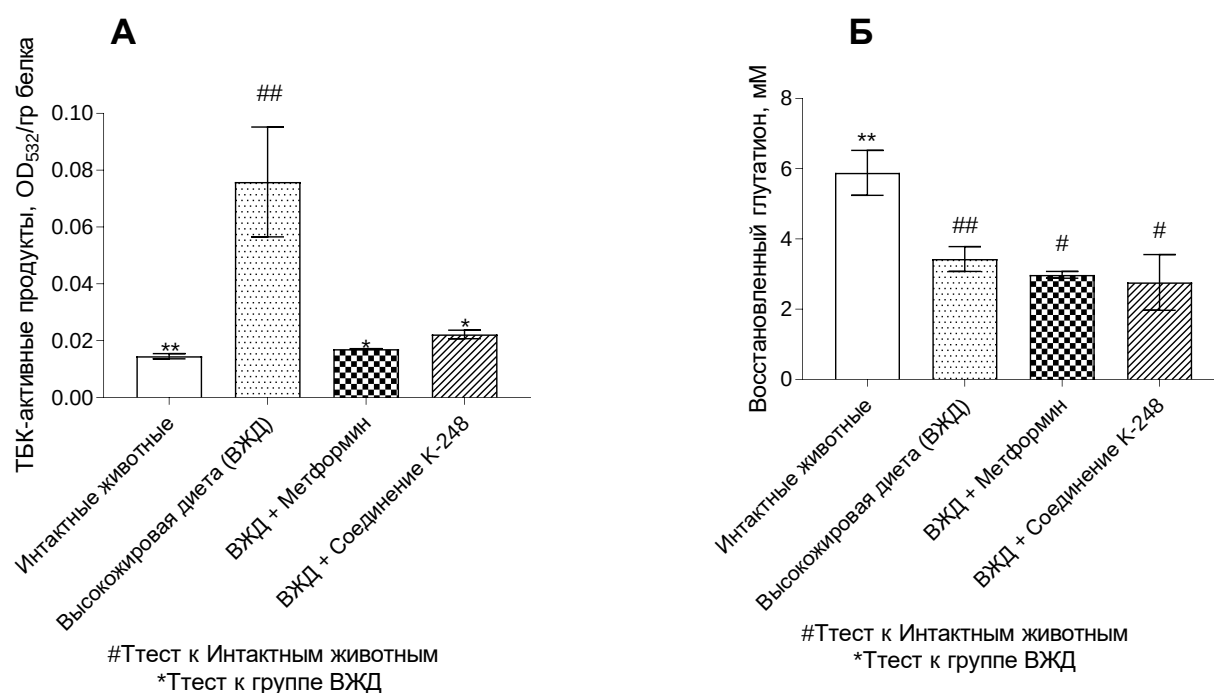


Рисунок 3.47. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень ТБК-активных продуктов (А) и восстановленного глутатиона (Б) печени у животных с СД2 ($M \pm m$)

Высокожировая диета вызывала увеличение уровня ТБК-активных продуктов в 5,2 раза и снижение уровня восстановленного глутатиона на 41,7 %, относительно интактных животных. Метформин предотвратил увеличение количества ТБК-активных продуктов (снижение от группы ВЖД составило 77,5 %), но не восстанавливал запасы глутатиона (снижение относительно интактных животных 71,6 %). Соединение К-248 предотвратило развитие оксидативного стресса, снижая уровень ТБК-активных продуктов на 70,7 % от группы ВЖД, но не оказало влияния на уровень восстановленного глутатиона (снижение на 19,4 % относительно группы ВЖД).

Выявлено, что производное К-248 оказывает выраженное противовоспалительное действие, что отражает снижение развивающегося хронического подострого воспаления – одного из главных факторов инсулинорезистентности при СД2.

3.8.4. Влияние на поведенческую активность животных с моделью сахарного диабета 2-го типа

По данным группы авторов [Daniell, Bartlett, Siegel, 2013; Setti и др., 2015], известно о неблагоприятном влиянии СД2 на когнитивные способности животных, поисковую активность, а также развитие выраженного стрессового состояния. Для выявления подобных изменений и влияния на поведенческую активность ВЖД проведены тесты «Открытое поле» и «Распознавание нового объекта».

На рисунке 3.48 представлены результаты теста «Распознавание нового объекта».

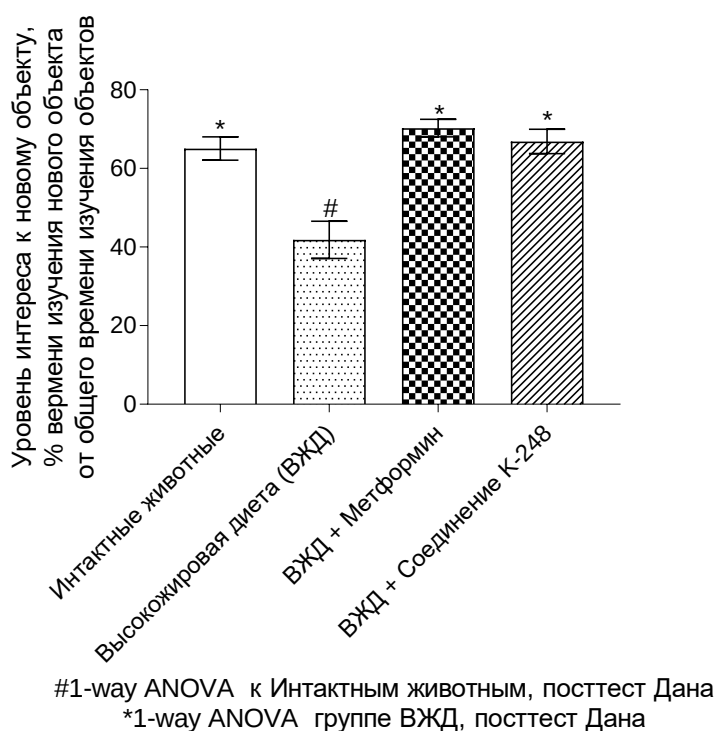


Рисунок 3.48. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень интереса к новому объекту в тесте «Распознавание нового объекта» у животных с СД2 ($M \pm m$)

Животные, содержавшиеся на ВЖД, имели сниженный интерес к изучению нового объекта на 35,7 %. Препарат сравнения «Метформин» и соединение К-248 приводили к восстановлению данного показателя до уровня интактных животных, увеличение интереса к изучению нового объекта составило 67,9 и 59,8 % соответственно.

На рисунке 3.49 представлены результаты двигательной активности животных в тесте «Открытое поле».

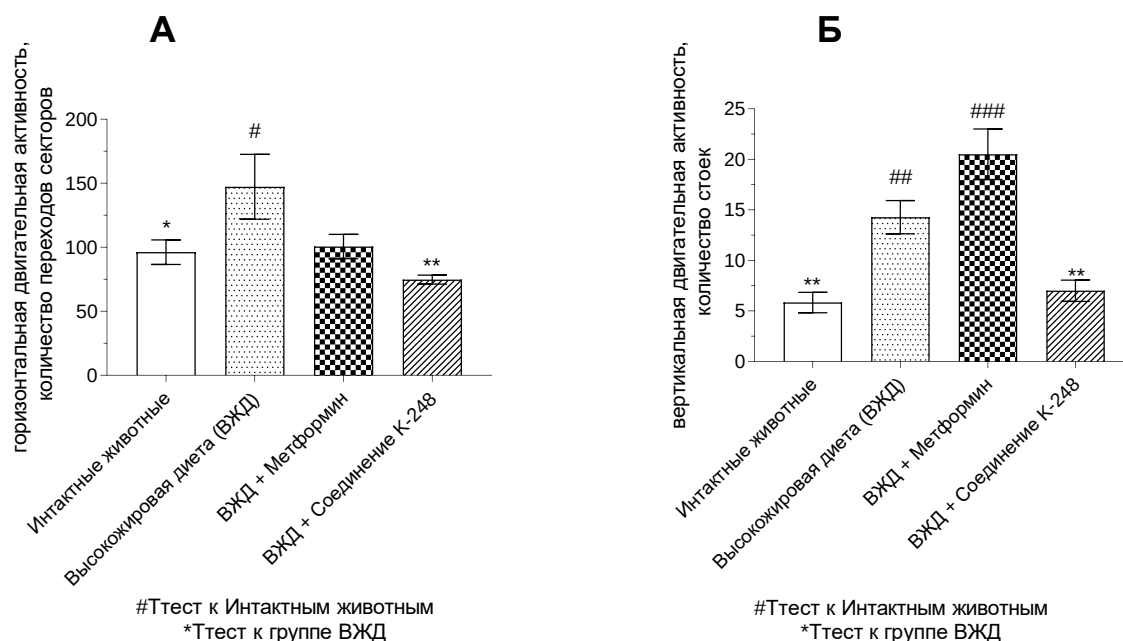


Рисунок 3.49. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень горизонтальной (А) и вертикальной (Б) двигательной активности в тесте «Открытое поле» у животных с СД2 ($M \pm m$)

Выявлено повышение вертикальной (53 %) и горизонтальной (244,8 %) двигательной активности под влиянием ВЖД. Подобная активность согласуется с данными литературы [Reddy, 2015] и объясняется повышением стрессового состояния животных. Метформин недостоверно снижал горизонтальную двигательную активность на 31,7 % от группы ВЖД, при этом не оказывая влияния на вертикальную двигательную активность; увеличение от интактной группы составило 351,4 %. Исследуемое вещество К-248 вызывало нормализацию данных показателей до уровня интактных животных, снижение показателей от группы ВЖД составило 49,2 и 51,0 % соответственно.

3.9. Противовоспалительные свойства соединения К-248

В результате проведенного хронического введения производного К-248, выявлено что оно оказывает высокую противовоспалительную активность, характерную как для ингибиторов GSK3 β , так и для производных 2-оксиндола [Chen и др., 2014]. Для уточнения свойств соединения проведены углубленные исследования.

Влияние на воспалительный ответ животных при введении липополисахарида

Наличие противовоспалительной активности у исследуемого соединения изучалось в тесте липополисахаридиндуцированного отека задней лапы. Липополисахарид (ЛПС) является избирательным лигандом Tlr-4 (Toll-like 4) рецепторов, активация которых запускает воспалительный процесс, характеризующийся повышением объема отека в месте введения и выработкой медиаторов воспаления [Jerala, 2007]. На рисунке 3.50 представлено влияние производного К-248 и препарата сравнения «Целекоксиба» на изменение объема липополисахаридиндуцированного отека.

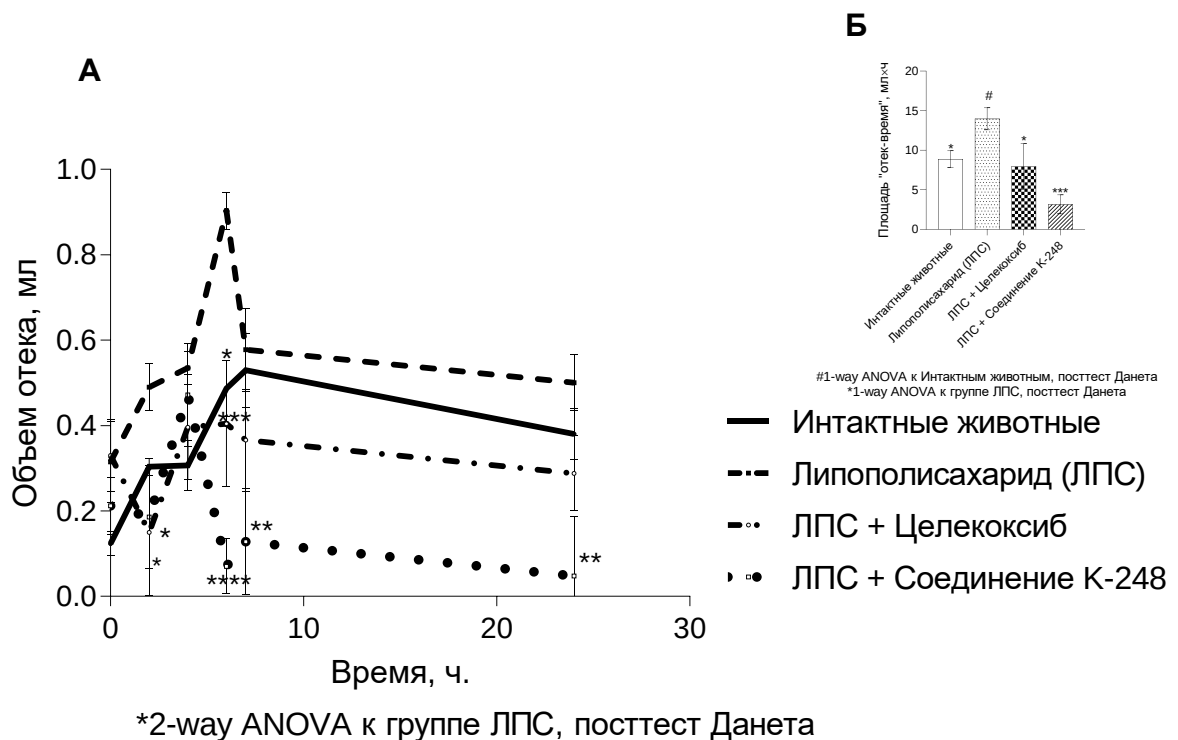


Рисунок 3.50. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и целекоксиба (30 мг/кг) на объем (А) и площадь под кривой «Отек-Время» (Б) при липополисахаридиндуцированном отеке задней лапы крыс ($M \pm m$)

Интраплантарное введение липополисахарида (ЛПС) на 6-й час эксперимента привело к формированию пика отека, объем составил $0,902 \pm 0,043$ мл, увеличение площади под кривой «Отек – Время» составило 57,5 % относительно интактных животных. Целекоксиб сглаживал максимальный пик отека до $0,404 \pm 0,148$ мл, снижение площади под кривой относительно группы ЛПС составило 43,0 %. Соединение К-248 нормализовало уровень объема отека, пик составил $0,382 \pm 0,070$ мл, снижение площади под кривой 77,4 % от группы ЛПС.

На рисунке 3.51 представлены результаты влияния целекоксиба и вещества К-248 на уровень выработки ранних медиаторов воспаления: оксида азота и ФНО- α .

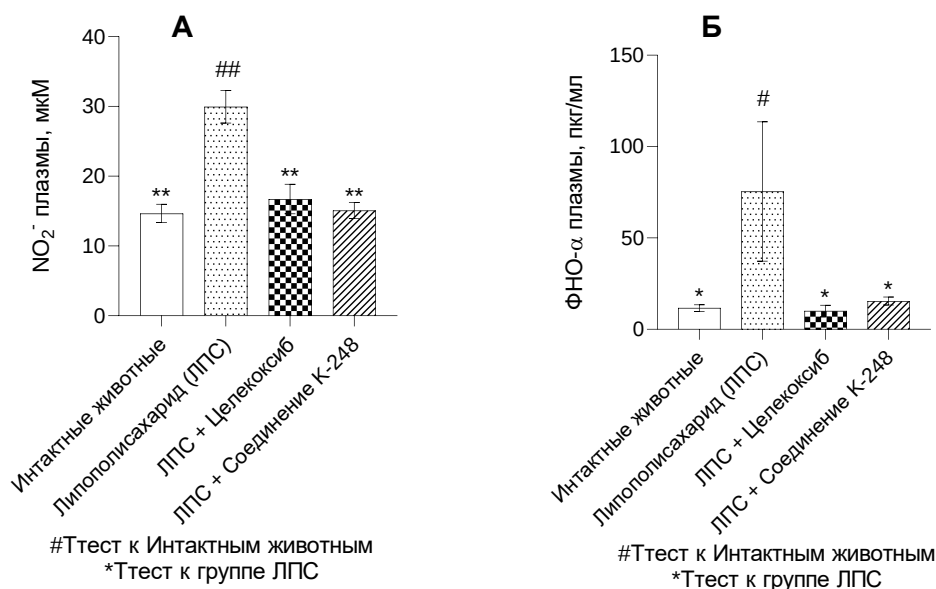


Рисунок 3.51. Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и целекоксиба (30 мг/кг) на уровень оксида азота (А) и ФНО- α (Б) плазмы крови при интраплатантарном введении липополисахарида интактным животным ($M \pm m$)

Липополисахарид (ЛПС) вызвал увеличение уровня выработки оксида азота в 2 раза и фактора некроза опухоли α в 6,5 раз. Целекоксиб нормализовал оба показателя до уровня интактных животных, снижение от группы ЛПС составило 44,2 и 86,7 % соответственно. Производное К-248 препятствовало развитию изменений под влиянием липополисахарида, снижение относительно группы ЛПС составило 49,6 и 79,5 %.

Влияние на активацию макрофагов

Хроническое подострое воспаление, характерное для СД2, вызываемое перепрофилированием макрофагов жировой ткани, является важным патологическим звеном развития инсулинорезистентности [Reddy, Zhang, Natarajan, 2015]. При этом последующее присоединение к нему оппортунистической инфекции (часто наблюдаемое явление при СД2) приводит к чрезмерной поляризации макрофагов и снижению бактерицидного ответа организма [Gordon, 2007]. Данная методика воспроизводит возникающую патологию и позволяет оценить степень влияния веществ на активацию макрофагов под воздействием различных стимулов:

липополисахарида – селективного активатора каскада Tlr4 рецептов (соответствует влиянию сводных жирных кислот) [Strekalova и др., 2015]; зимозана – полисахарида стенки грибов, селективно влияющего на каскад Tlr2 рецепторов [Lu, 2008]. Результаты проведенного эксперимента представлены на рисунке 3.52.

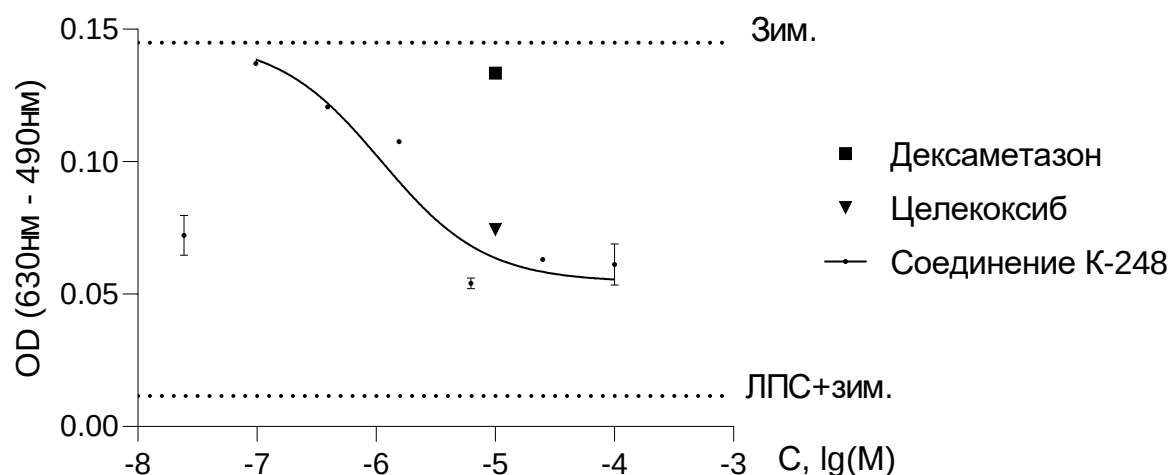


Рисунок 3.52. Влияние соединения К-248, дексаметазона и целекоксиба на уровень активации макрофагов липополисахаридом и неопсонизированным зимозаном в НСТ-тесте ($M \pm m$)

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что стимуляция клеток липополисахаридом (ЛПС) за 24 ч до внесения зимозана приводила к отсутствию активации на повторный стимул. При этом клетки, стимулированные только зимозаном, были способны к активации. Противовоспалительные препараты «Целекоксиб» и «Дексаметазон» в конечной концентрации 10 мкМ оказывали влияние на степень активации клеток липополисахаридом, сохраняя внутренние запасы для последующей активации зимозаном. При этом клетки под воздействием дексаметазона продемонстрировали уровень активации, соответствующий клеткам, стимулированным только зимозаном. Соединение К-248 было исследовано в широком диапазоне концентраций, что позволило сделать вывод о зависимости характера его действия от концентрации, также показано сохранение воздействия вещества на клетки более 24 ч. В высоких микромолярных концентрациях производное К-248 предотвращало активирование клеток как липополисахаридом, так и зимозаном через 24 ч. При использовании наномолярных концентраций выявлено активирование клеток при стимуляции зимозаном. Вещество К-248 в конечной концентрации 97,7 нМ приводит к сохранению уровня активации клеток, соответствующего зимозану.

Проведено изучение влияния соединения К-248 в зависимости от концентрации на выработку оксида азота и ИЛ-6 перитонеальными макрофагами мышей под воздействием липополисахарида, результаты представлены на рисунке 3.53.

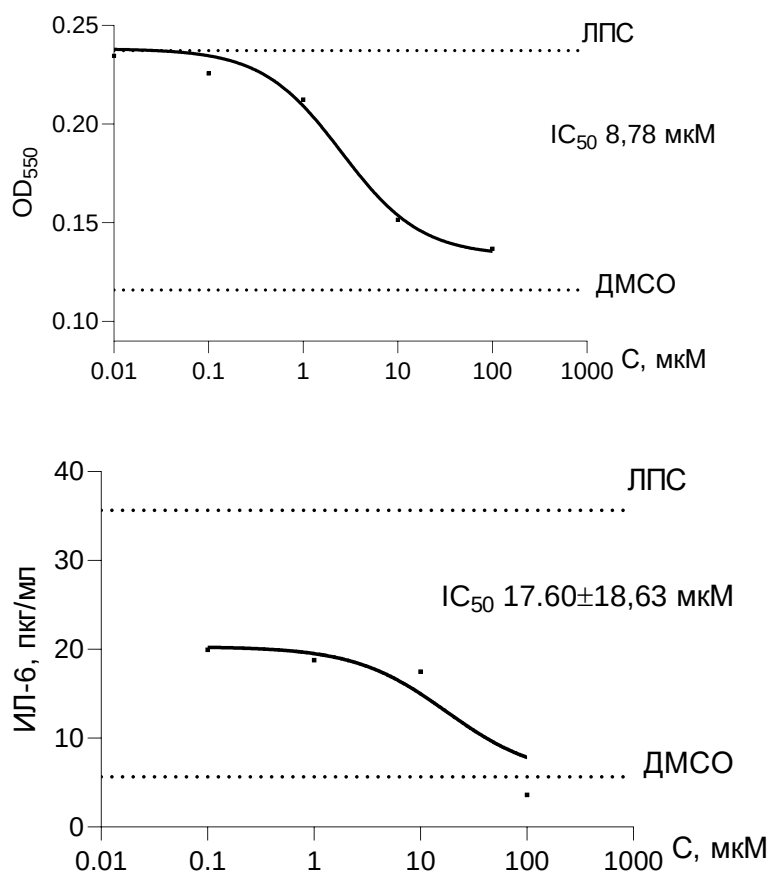


Рисунок 3.53. Влияние соединения К-248 на выработку оксида азота и ИЛ-6 перитонеальными макрофагами под воздействием липополисахарида.

По результатам эксперимента, введение липополисахарида увеличивало синтеза оксида азота первичными перитонеальными макрофагами мышей в 2 раза. Исследуемое соединение К-248 достоверно снижало его уровень, показатель IC₅₀ составил 8,78 мкМ.

В проведенном эксперименте базальный уровень выработки ИЛ-6 макрофагами составил $5,65 \pm 2,70$ пкг/мл, под воздействием липополисахарида он был увеличен до $35,63 \pm 7,19$ пкг/мл. Производное К-248 в конечной концентрации 100 мкМ полностью препятствовало активации макрофагов и выработке ИЛ-6, при этом конечная концентрация полуингибирования составила $17,60 \pm 18,63$ мкМ.

Влияние на фагоцитарную активность

Для изучения влияния на фагоцитарную активность макрофагов проведен НСТ-тест при дополнительной активации клеток липополисахаридом. Активация фагоцитоза проводилась опсонизированным комплементом зимозаном. Опсонизация зимозана приводит к тому, что макрофаги фагоцитируют его частицы, и внутриклеточно стимулируется белок семейства лектинов типа С (дектин-1), который вызывает активацию ядерного фактора «каппа-би» (выработка воспалительных цитокинов, оксидативный стресс, активация каскада арахидоновой кислоты и активация фагоцитоза) и противогрибкового иммунитета (активация фагоцитоза, оксидативного стресса, образование противогрибковых цито- и хемокинов) [Thomas и др., 2008].

Результаты проведенного эксперимента представлены на рисунках 3.54 и 3.55.

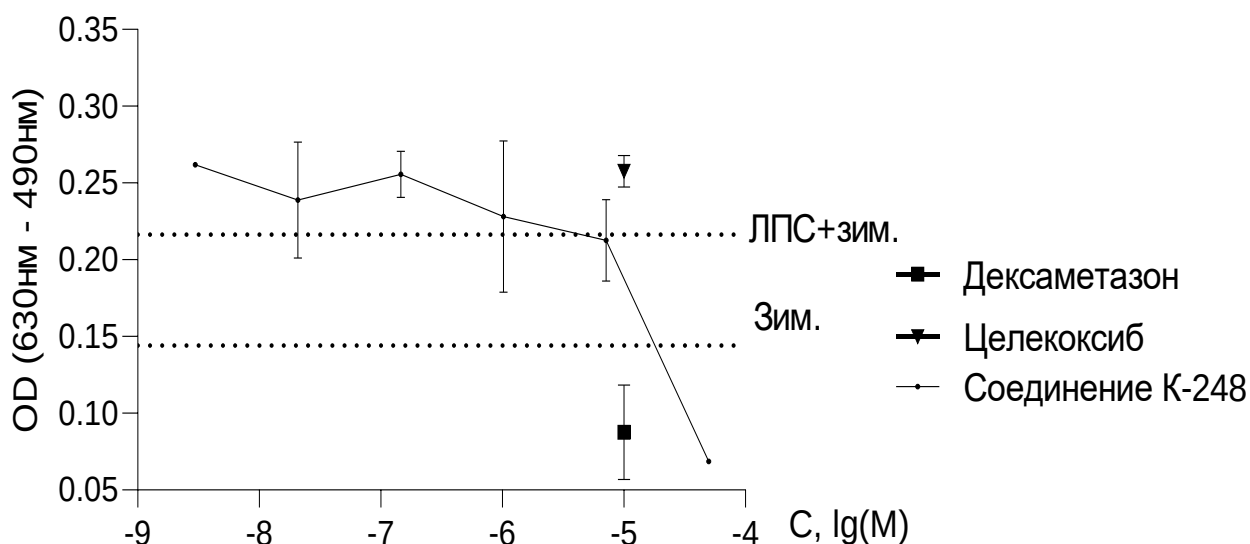


Рисунок 3.54. Влияние соединения К-248, дексаметазона и целекоксиба на уровень фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов интактных мышей в НСТ-тесте ($M \pm m$)

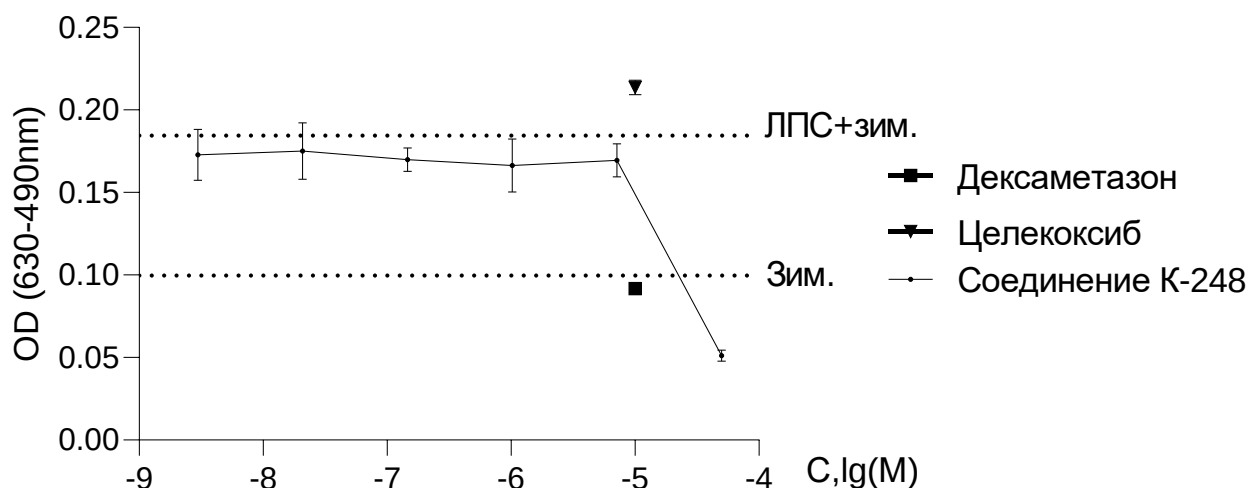
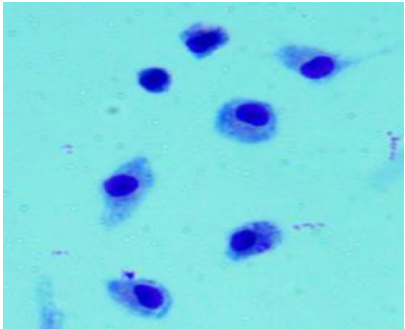
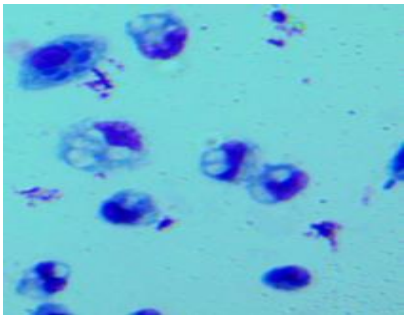
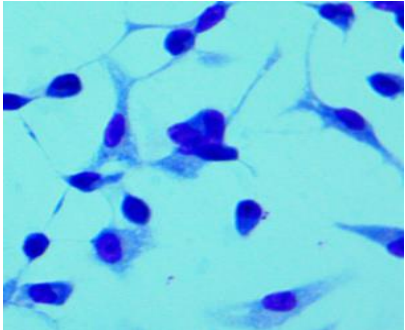
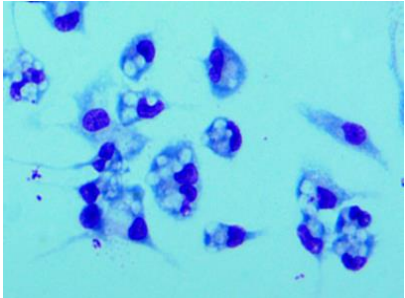


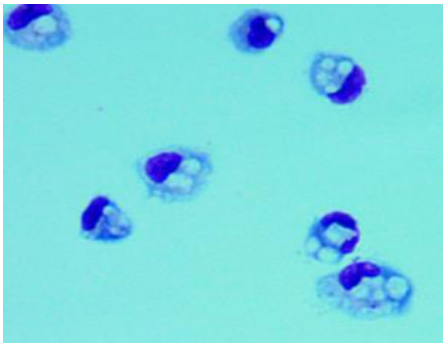
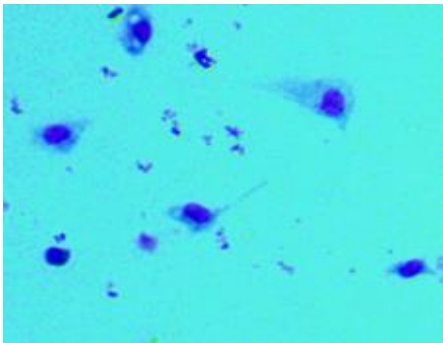
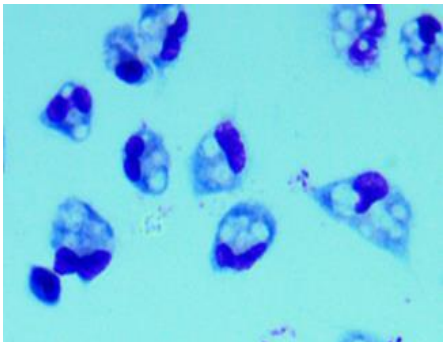
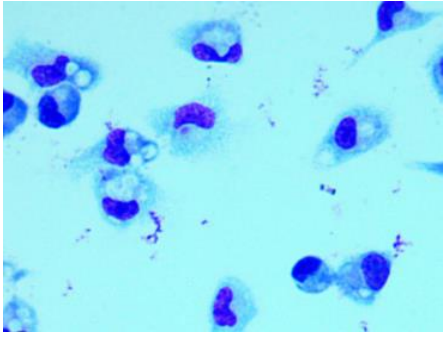
Рисунок 3.55. Влияние соединения К-248, дексаметазона и целекоксиба на уровень фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мышей с сахарным диабетом в НСТ-тесте ($M \pm m$)

Согласно данным проведенного эксперимента, можно сделать вывод о повышении фагоцитарной активности первичных перитонеальных макрофагов при совместном их стимулировании липополисахаридом (ЛПС) и опсонизированным зимозаном на 50,2 % для клеток, выделенных из интактных животных, и на 83,5 % для животных с моделированным СД2. Целекоксиб не оказывал достоверного влияния на фагоцитарную активность макрофагов, уровень клеточного ответа соответствовал результатам группы ЛПС + зимозан. Дексаметазон нивелировал повышение фагоцитарной активности под влиянием липополисахарида. Исследуемое вещество К-248 не оказывало значимого эффекта на фагоцитарную активность вплоть до конечной концентрации 7,1 мкМ.

Проведен микроскопический анализ влияния соединений на активацию макрофагов и оценка их фагоцитарной активности при окраске по Романовскому. Полученные микрофотографии представлены в таблице 3.10. На рисунке 3.56 приведены результаты определения основных показателей фагоцитарной активности и степени распластанности макрофагов.

Влияние соединения К-248 и дексаметазона на фагоцитарную активность
перитонеальных макрофагов, окраска по Романовскому

Группа	Конечная концентрация вещества	Фагоцитарный индекс, ($M \pm m$)	Микрофотография
		Показатель распластанности, ($M \pm m$)	
1	2	3	4
Интактные клетки		—	
		$0,360 \pm 0,068^*$	
Зимозан		$2,260 \pm 0,108^*$	
		$0,300 \pm 0,065^*$	
Липополисахарид (ЛПС)		—	
		$2,610 \pm 0,111\#$	
Липополисахарид (ЛПС) + зимозан		$3,140 \pm 0,143\#$	
		$2,290 \pm 0,126\#^*$	

1	2	3	4
Дексаметазон	10 мкМ	$2,530 \pm 0,129^*$	
		$0,150 \pm 0,068^*$	
Соединение К-248	50 мкМ	—	
		—	
	1 мкМ	$3,070 \pm 0,134\#$	
		$0,260 \pm 0,056^*$	
	3 нМ	$2,760 \pm 0,131\#$	
		$0,570 \pm 0,086^*$	

Примечание: Фагоцитарный индекс – # – 1-way ANOVA к группе «Зимозан», пост-тест Даннета; * – 1-way ANOVA к группе ЛПС + Зимозан, пост-тест Даннета. Показатель распластанности: # – 1-way ANOVA к группе «Интактные», пост-тест Даннета; * – 1-way ANOVA к группе ЛПС, пост-тест Даннета.

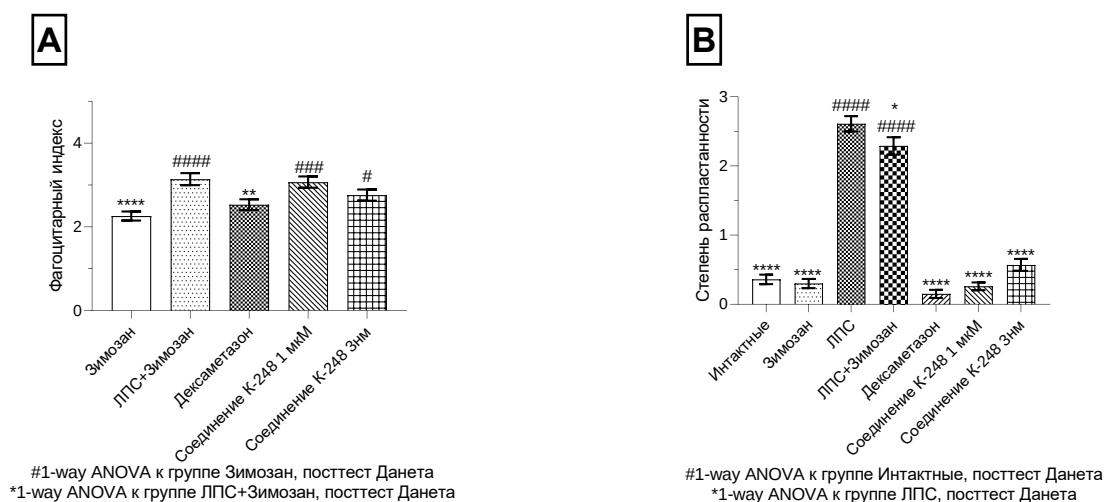
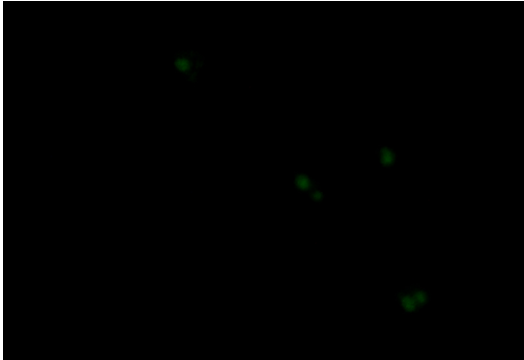
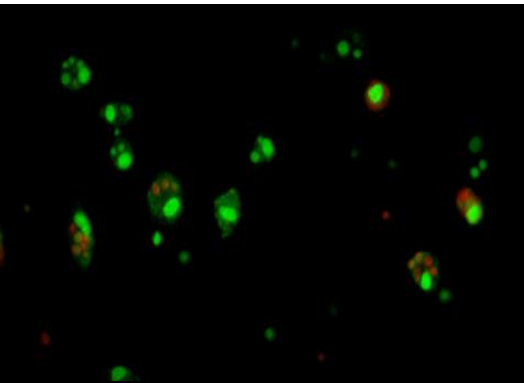
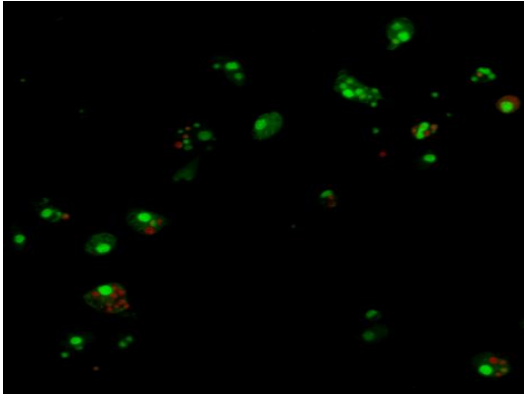
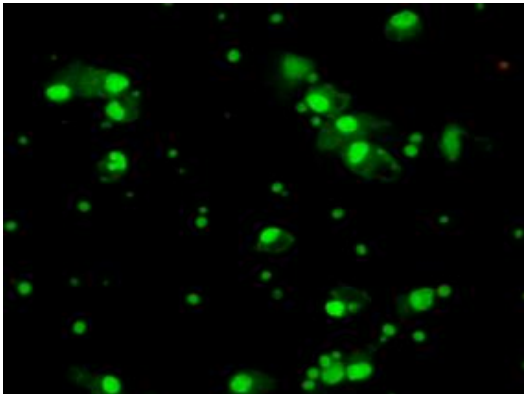


Рисунок 3.56. Влияние дексаметазона и соединения К-248 в зависимости от концентрации на количество зерен зимозана (А) и степень распластанности (В) перитонеальных макрофагов ($M \pm m$)

Интактная группа в большинстве представлена неактивированными клетками округлой формы без включений с небольшим количеством вытянутых активированных клеток (показатель распластанности – $0,360 \pm 0,068$). В группе «Зимозан» клетки имеют округлую форму (показатель распластанности – $0,300 \pm 0,065$) и заметные включения фагоцитированного зимозана (зерен зимозана – $2,260 \pm 0,129$). Группа липополисахарида (ЛПС) представлена активированными распластанными клетками (показатель распластанности – $2,610 \pm 0,118$) без заметных включений зимозана. Клетки, обработанные опсонизированным зимозаном и липополисахаридом, имели вытянутую форму (показатель распластанности – $2,290 \pm 0,126$) с заметными включениями зимозана (зерен зимозана – $3,140 \pm 0,143$). Препарат сравнения дексаметазон предотвратил активацию макрофагов (показатель распластанности – $0,150 \pm 0,057$), но при этом достоверно снизил уровень их фагоцитарной активности (зерен зимозана – $2,530 \pm 0,129$). Исследуемое соединение К-248 в концентрации 50 мкМ привело к значительной гибели клеток; в концентрациях 1 мкМ и 3 нМ предотвратило активацию макрофагов (показатель распластанности – $0,260 \pm 0,056$ и $0,570 \pm 0,086$), сохранив фагоцитарную активность на уровне группы ЛПС + Зимозан (зерен зимозана – $3,070 \pm 0,134$ и $2,760 \pm 0,131$).

Также для оценки фагоцитарной активности проведен тест с дрожжами, меченными акридиновым оранжевым. Полученные микрофотографии представлены в таблице 3.11.

Влияние соединения К-248 и дексаметазона на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов с дрожжами, меченными акридиновым оранжевым

Группа	Фагоцитарный индекс, ($M \pm m$)	Микрофотография
Интактные клетки	—	
Клетки, инкубированные с дрожжами	$2,530 \pm 0,132$	
Дексаметазон	$2,620 \pm 0,137$	
Соединение К-248	$2,810 \pm 0,140$	

Интактная группа клеток – без заметных включений. Группа контроля представлена клетками с включениями дрожжей на разных стадиях фагоцитоза (дрожжей на клетку – $2,530 \pm 0,132$). Препарат сравнения «Дексаметазон» и исследуемое соединение К-248 не оказали значимого влияния на фагоцитарную активность клеток (дрожжей на клетку – $2,620 \pm 0,137$ и $2,810 \pm 0,140$ соответственно), в каждой из групп присутствуют клетки с поглощёнными окрашенными дрожжами на разных стадиях фагоцитоза (ярко зеленые – начальные стадии, красные – завершение фагоцитоза).

Влияние на зимозан-опосредованную хемилюминесценцию

При фагоцитозе чужеродных для организма частиц фагоциты вырабатывают активные формы кислорода (АФК). Выработка АФК в них происходит за счет содержащегося в мембранах фермента НАДФН-оксидазы [Ushio-Fukai, 2006]. Для изучения влияния производного К-248 на выработку АФК проведено исследование на двух типах клеток: макрофагах и нейтрофилах. Первичные клеточные линии инкубировались с опсонизированным компонентом зимозаном при последующем добавлении люминола. Люминол является детектирующим агентом для АФК, переходя при взаимодействии с ними в радикальную форму и излучая при этом квант света, что возможно детектировать при измерении люминесценции [Kobayashi и др., 2001; Vilim, 1989]. Полученные результаты влияния соединения К-248 на продукцию АФК макрофагами и нейтрофилами в зависимости от конечной концентрации вещества представлены на рисунках 3.57 и 3.58.

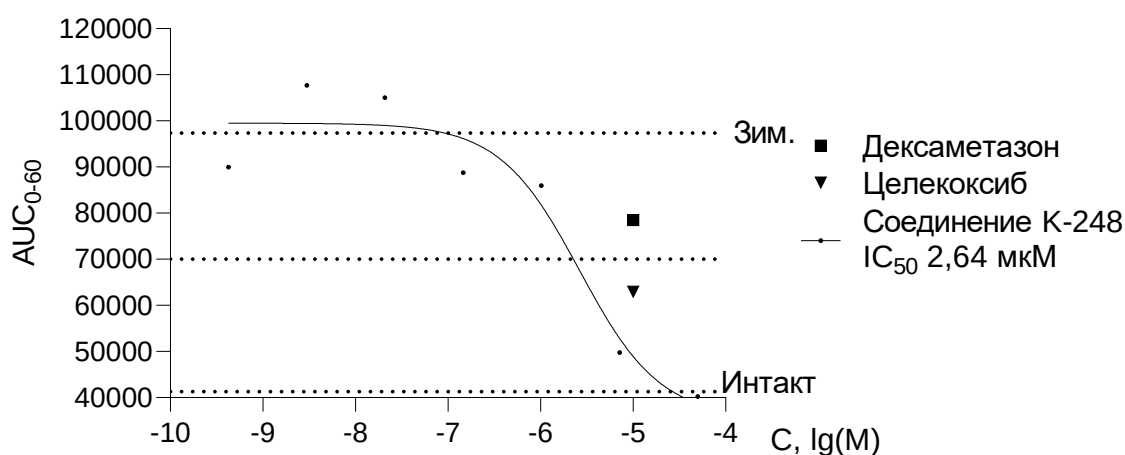


Рисунок 3.57. Влияние соединения К-248, дексаметазона и целекоксиба на уровень зимозан-опосредованной хемилюминесценции перитонеальных макрофагов мышей

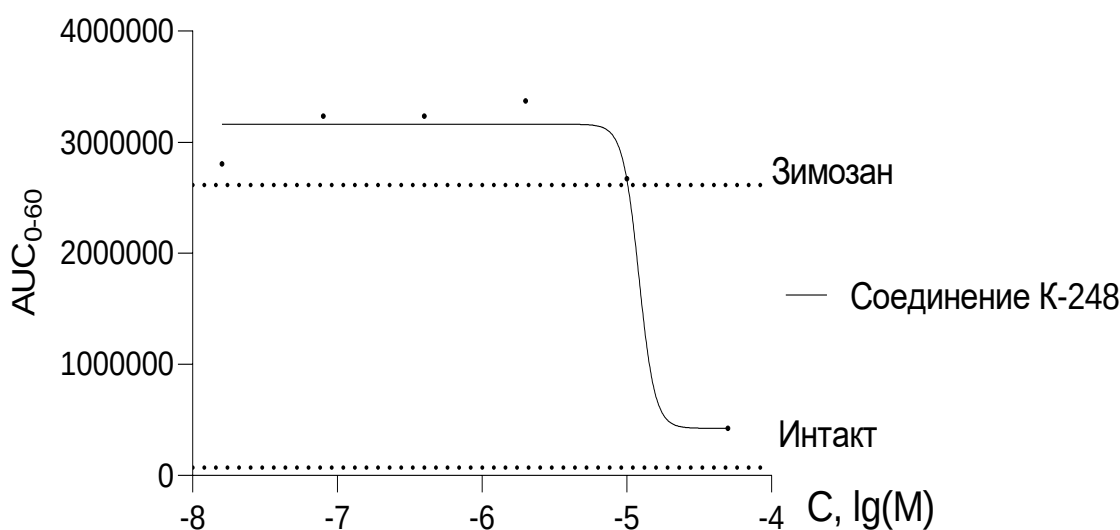


Рисунок 3.58. Влияние соединения К-248 на уровень зимозан-опосредованной хемилюминесценции перитонеальных нейтрофилов мышей

Препараты сравнения «Дексаметазон» и «Целекоксиб» снижают уровень генерации АФК первичными макрофагами мышей на 19,3 и 35,3 % соответственно. Влияние исследуемого производного К-248 на выработку АФК макрофагами зависело от конечной концентрации (показатель IC_{50} 2,64 мкМ). При этом исследуемое вещество не оказывало влияния на уровень респираторного взрыва нейтрофилов (конечная концентрация 50 мкМ соединения К-248 является цитотоксичной для нейтрофилов) в диапазоне концентраций до 10 мкМ.

3.10. Антиагрегантная активность соединения К-248

Прогрессирование СД2 приводит к развитию большого количества осложнений [Cade, 2008; Santos Dos, 2019]. Основные из них взаимосвязаны с системой крови, в частности повышенная агрегационная активности и частота образования тромбов [Vazzana и др., 2012; Yin и др., 2017]. В связи с этим актуальной задачей является определение антиагрегантных свойств потенциальных противодиабетических веществ.

Для изучения влияния исследуемого производного К-248 на агрегацию тромбоцитов в экспериментах использовали два индуктора агрегации: АДФ (для выявления собственной антиагрегантной активности вещества), и коллаген (согласно литературным данным, активация тромбоцитов коллагеном через GPIV и GPIb-IX-V осуществляется с участием каскада

PI3K/AKT/GSK3B) [Estevez, Du, 2017]. Результаты проведенных исследований представлены в таблицах 3.12 и 3.13.

Таблица 3.12

Влияние ацетилсалициловой кислоты и соединения К-248 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ (5 мкМ)

Тестируемый образец	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов, ($M \pm m$)			IC50, мкМ
	100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	
Ацетилсалициловая кислота	52,1 $\pm$ 4,2*	20,8 $\pm$ 3,5	4,6 $\pm$ 1,7	104,0
Соединение К-248	72,1 $\pm$ 5,2*	46,60 $\pm$ 17,7*	31,1 $\pm$ 14,0	10,0

Примечание: * – Т-тест к группе контроля ($p < 0,05$).

Выявлена выраженная антиагрегантная активность у соединения К-248, превышающая по активности кислоту ацетилсалициловую в 10 раз.

Таблица 3.13

Влияние ацетилсалициловой кислоты и соединения К-248 на агрегацию тромбоцитов, индуцированную коллагеном (15 мкг/мл)

Тестируемый образец	$\Delta\%$ ингибирования агрегации тромбоцитов, ($M \pm m$)				IC50, мкМ
	100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	0,1 мкМ	
Ацетилсалициловая кислота	95,52 $\pm$ 4,99*	13,75	7,64 $\pm$ 3,42	Н.а.	49,3
Соединение К-248	96,50 $\pm$ 1,47*	84,4 $\pm$ 15,8*	54,00 $\pm$ 0,12*	24,6 $\pm$ 4,9	0,79

Примечание: * – Т-тест к группе контроля ($p < 0,05$).

Исследуемое производное К-248 оказывает антиагрегантную активность при использовании в качестве индуктора агрегации коллагена, превышая по активности кислоту ацетилсалициловую в 62 раза.

Исходя из проведенных тестов, наличие у соединения К-248 высокой антиагрегантной активности является положительным признаком, позволяющим использовать его для коррективы осложнений сахарного диабета.

3.11. Оценка лекарственного подобия, основных фармакокинетических и токсикологических свойств соединения К-248 по показателям ADMET

Исследуемое производное К-248 оказало высокую фармакологическую активность в тестах *in vitro* и *in vivo*, в связи с чем осуществлен прогноз фармакокинетических и токсикологических свойств *in silico*, используя 5 наиболее распространенных интернет-сервисов ADMET, для определения его дальнейшей перспективности исследования. В настоящее время в клинической практике нет лекарственных препаратов с подобным механизмом действия, в связи с чем препарат сравнения отсутствует. Полученные результаты представлены в таблице 3.14.

Таблица 3.14

Результаты прогноза ADMET показателей соединения К-248

Показатель	Результат прогноза
	Соединение К-248
Лекарственное подобие	
Коэффициент лекарственного подобия	-1,420
Фармакокинетические показатели	
Проницаемость в линии клеток Сасо-2	Проницаем
Локализация в клетке	Митохондрии
Абсорбция в ЖКТ	91,43 %
Проницаемость в ГЭБ	Проникает через ГЭБ
Объем распределения (л/кг)	0,32
Токсикологические показатели	
Класс острой токсичности	4
Показатель LD ₅₀ острой токсичности (крысы, мг/кг)	1000,00

Показатель	Результат прогноза
	Соединение К-248
Хроническая токсичность (крысы, мг/кг/день)	300,60
Максимальная переносимая доза (люди, мг/кг/день)	0,877
Тест Эймса	Возможна мутагенность
Канцерогенность	Не канцерогенен
Гепатотоксичность	Возможна токсичность
Иммунотоксичность	Не токсичен
Мутагенность	Возможна мутагенность
Цитотоксичность	Не токсичен
Кожное раздражение	Не вызывает раздражения

Полученные значения коэффициента для производного К-248 входят в диапазон наиболее перспективных соединений в кандидаты лекарственных средств. Высокая адсорбция из ЖКТ, а также способность проникать через клеточные мембраны создает предпосылки для дальнейшего исследования вещества в виде пероральных лекарственных форм. Принадлежность к 4-му классу острой токсичности (малотоксичные вещества) говорит о возможном наличии широкого терапевтического интервала применения вещества и его низкой токсичности. Возможные опасения при дальнейшем исследовании вызывает возможное наличие мутагенности и гепатотоксичности, что требует проведения углубленных исследований токсикологических свойств. В свою очередь, отсутствие канцерогенности, цито- и иммунотоксичности является положительным моментом для дальнейшего углубленного изучения вещества. При планировании дальнейшего исследования необходимо проведение титрования дозы введения и определение порога, при котором могут быть выражены побочные эффекты.

Заключение

Соединение К-248 оказало антигипергликемическую, антидиабетическую, противовоспалительную и антиагрегантную активности в тестах *in vivo*, а также противовоспалительную и антиагрегантную в тестах *in vitro*. Результаты проведенного

курсового введения вещества животным с моделированным СД2 свидетельствуют о наличии высокого антидиабетического потенциала. Результаты биохимических и морфологических клеточных исследований позволяют сделать вывод, что соединение К-248 предотвращает индуцированную липополисахаридом активацию макрофагов и синтез ИЛ-6, при этом не влияя на процесс фагоцитоза. Отсутствие чрезмерной поляризации макрофагов и влияния на врожденный бактериальный ответ говорит о благоприятном иммунотропном действии исследуемого вещества. Согласно рассчитанным показателям ADMET, можно предположить перспективность дальнейшего изучения выявленного соединения-лидера, при этом некоторые показатели лекарственной безопасности требуют дальнейшего углубленного изучения. При планировании дальнейшего исследования необходимо проведение титрования дозы введения и определение порога, при котором могут быть выражены побочные эффекты.

ГЛАВА 4. ПОИСК ПРОИЗВОДНЫХ 2-ОКСИНДОЛА, ИНГИБИРУЮЩИХ А-ГЛЮКОЗИДАЗУ

4.1. Влияние новых производных 2-оксиндола на активность α -глюкозидазы

Среди 24 новых производных 2-оксиндола был проведен микропланшетный скрининг наличия ингибирующей α -глюкозидазу *S. cerevisiae* активности. Для проведения первичного скрининга была выбрана конечная концентрация соединений 100 мкМ. В качестве препарата сравнения была выбран противодиабетический препарат «Акарбоза» ([1S-(1 α ,4 α ,5 β ета,6 α)]-0-4,6-дидезокси-4-[[4,5,6-тригидрокси-3-(гидроксиметил)-2-циклогексен-1-ил]амино]- α -D-глюкопиранозил-(1-4)-0- α -D-глюкопиранозил-(1-4)-D-глюкоза) – олигосахарид, из класса конкурентных ингибиторов α -глюкозидазы [Kim S. J. и др., 2015]. Результаты первичного скрининга приведены в таблице 4.1.

Таблица 4.1

Влияние новых производных 2-оксиндола, в концентрации 100 мкМ,
на активность α -глюкозидазы (*in vitro*)

№	Шифр соединения	$\Delta\% \pm m$
1	K-170(1)	103,26 $\pm$ 3,19
2	K-248	92,29 $\pm$ 1,92
3	K-127	81,71 $\pm$ 4,69
4	K-246	57,91 $\pm$ 3,09
5	K-165	57,86 $\pm$ 6,29
6	K-237	52,23 $\pm$ 0,81
7	K-223	29,19 $\pm$ 2,77
8	K-166	14,87 $\pm$ 0,65
9	K-215	12,06 $\pm$ 7,83
10	OIP-Br-3	10,65 $\pm$ 0,83
11	OIP-NO₂-O	8,90 $\pm$ 4,54
12	OIP-H-3	2,08 $\pm$ 2,03

№	Шифр соединения	$\Delta\% \pm m$
13	OIP-Br-4	$-0,73 \pm 4,18$
14	OIP-H-S	$-1,25 \pm 0,76$
15	OIP-Br-2	$-1,49 \pm 1,94$
16	OIP-NO ₂ -4	$-1,71 \pm 5,24$
17	OIP-H-4	$-3,17 \pm 8,42$
18	OIP-Br-O	$-3,81 \pm 2,99$
19	K-229	$-3,94 \pm 3,36$
20	K-183(1)	$-4,01 \pm 4,44$
21	OIP-NO ₂ -3	$-7,99 \pm 1,37$
22	K-167	$-10,00 \pm 0,62$
23	OIP-Br-S	$-10,62 \pm 3,82$
24	OIP-NO ₂ -2	$-18,00 \pm 5,21$
25	Акарбоза	$45,22 \pm 2,70$

В результате, среди исследованных 24 новых производных 2-оксиндола было выявлено 6 соединений с большей ингибирующей α -глюкозиду *S. Cerevisiae* активностью, чем у препарата сравнения «Акарбоза» (45,22 %). Для 4 наиболее активных из них было проведено концентрационное исследование и определение величины полуингибирования активности фермента. Результаты исследования приведены в таблице 4.2.

Согласно проведенному исследованию, величина полуингибирующей активности для препарата сравнения «Акарбоза» составила IC₅₀ 436,7 мкМ, что согласуется с данными, представленными в литературе [Spasov и др., 2017]. При изучении новых производных 2-оксиндола было обнаружено производное К-170(1), превосходящее акарбозу по данному показателю более чем в 60 раз. На рисунке 4.1 представлено влияние соединения К-170(1) и акарбозы в зависимости от концентрации на активность α -глюкозидазы.

Величина ($IC_{50} \pm m$) полуингибирования активности α -глюкозидазы
новых производных 2-оксиндола

№	Шифр соединения	IC_{50} , мкМ
1	К-170(1)	$6,78 \pm 3,01$
2	К-127	$68,90 \pm 30,04$
3	К-165	$76,70 \pm 74,64$
4	К-248	$136,00 \pm 63,93$
5	Акарбоза	$436,70 \pm 225,8$

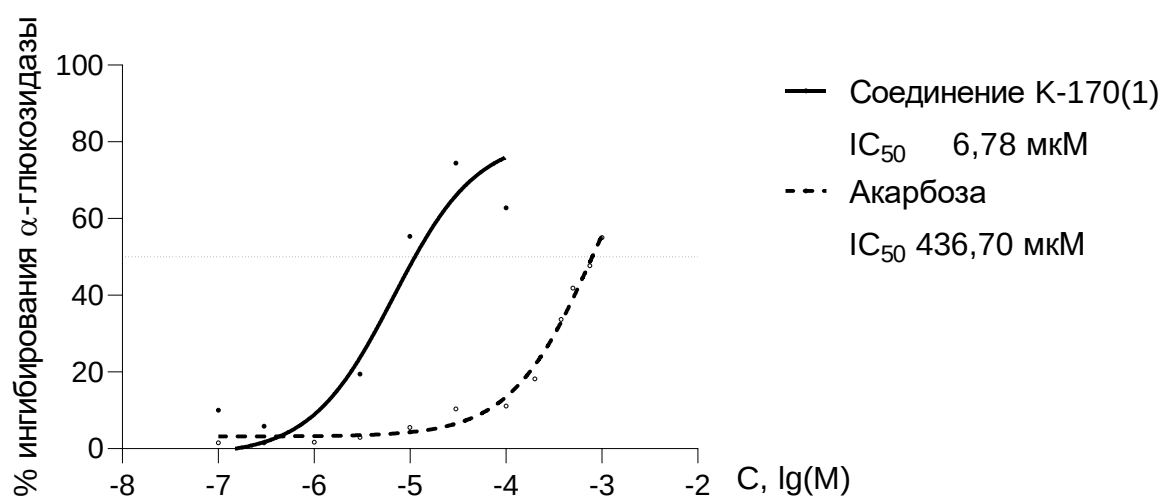
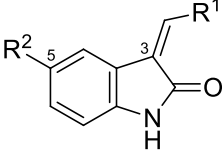
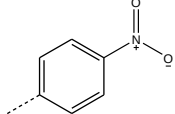
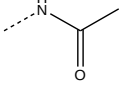
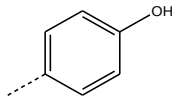
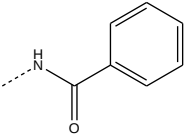
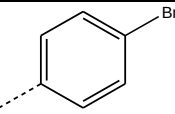
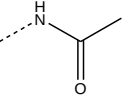
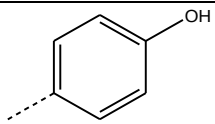
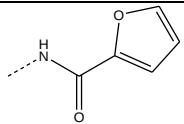
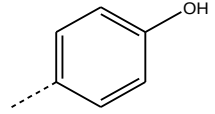
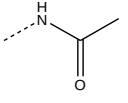
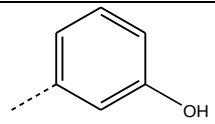
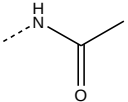
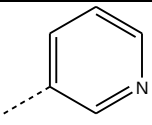
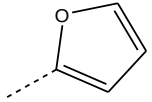


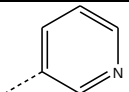
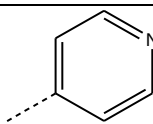
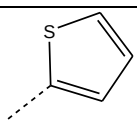
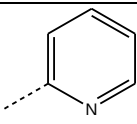
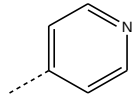
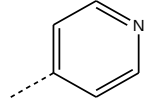
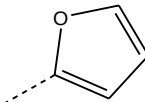
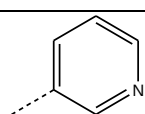
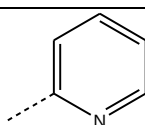
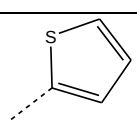
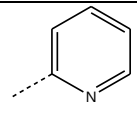
Рисунок 4.1. Влияние соединения К-170(1) и акарбозы в зависимости от концентрации на
активность α -глюкозидазы

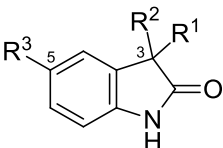
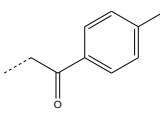
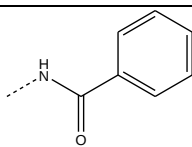
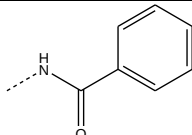
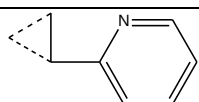
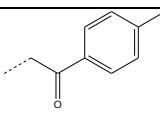
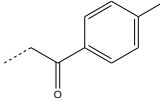
4.1.1. Зависимость ингибирующей активности от структуры новых производных 2-оксиндола

Результаты проведенного скрининга и изучения влияния производных в различной концентрации позволили провести анализ зависимости ингибирующей активности от структуры новых производных 2-оксиндола. В таблице 4.4 представлены данные о химической структуре и величине активности исследованных соединений.

Химическая структура новых производных 2-оксиндола и величина ингибирующей α -глюкозидазу активности ($\Delta\% \pm m$ – ингибирование активности фермента в концентрации 100 мкМ)

3-Арилиден-2-оксиндолы				
				
№	Шифр соединения	R ¹	R ²	$\Delta\% \pm m$
1	K-170(1)			$103,26 \pm 3,19$
2	K-248			$92,29 \pm 1,92$
3	K-127			$81,71 \pm 4,69$
4	K-246			$57,91 \pm 3,09$
5	K-165			$57,86 \pm 6,29$
6	K-166			$14,87 \pm 0,65$
7	OIP-Br-3		Br	$10,65 \pm 0,83$
8	OIP-NO ₂ -O		NO ₂	$8,90 \pm 4,54$

№	Шифр соединения	R ¹	R ²	$\Delta\% \pm m$
9	OIP-H-3		H	$2,08 \pm 2,03$
10	OIP-Br-4		Br	$-0,73 \pm 4,18$
11	OIP-H-S		H	$-1,25 \pm 0,76$
12	OIP-Br-2		Br	$-1,49 \pm 1,94$
13	OIP-NO ₂ -4		NO ₂	$-1,71 \pm 5,24$
14	OIP-H-4		H	$-3,17 \pm 8,42$
15	OIP-Br-O		Br	$-3,81 \pm 2,99$
16	OIP-NO ₂ -3		NO ₂	$7,99 \pm 1,37$
17	K-167		H	$-10,00 \pm 0,62$
18	OIP-Br-S		Br	$-10,62 \pm 3,82$
19	OIP-NO ₂ -2		NO ₂	$-18,00 \pm 5,21$

3,3-Дизамещённые-2-оксиндолы					
					
№	Шифр соединения	R ¹	R ²	R ³	Δ%
1	K-237		OH		52,23 ± 0,81
2	K-223	NCCH ₂	OH		29,19 ± 2,77
3	K-215			H	12,06 ± 7,83
4	K-229		OH	Br	-3,94 ± 3,36
5	K-183(1)		OH	H	-4,01 ± 4,44

В соответствии с базовым скаффолдом, исследованные новые производные 2-оксиндола можно разделить на 2 класса: производные 3-арилиден-2-оксиндола и 3,3-дизамещённые производные 2-оксиндола.

Было обнаружено, что производные 3-арилиден-2-оксиндолов оказались более перспективными и активными в сравнении с 3,3-дизамещёнными-2-оксиндолами. Возможным объяснением служит наличие ароматического радикала в положении C3 у производных 3-арилиден-2-оксиндола. В результате, образуется расширенная система π-π сопряжения, электронные системы находятся в одной плоскости, образуя плоский σ-скелет. При моделировании пространственного 3D-строения данных структур в графическом редакторе MarvinSketch можно визуалью увидеть данные стерические различия (рисунок 4.2).

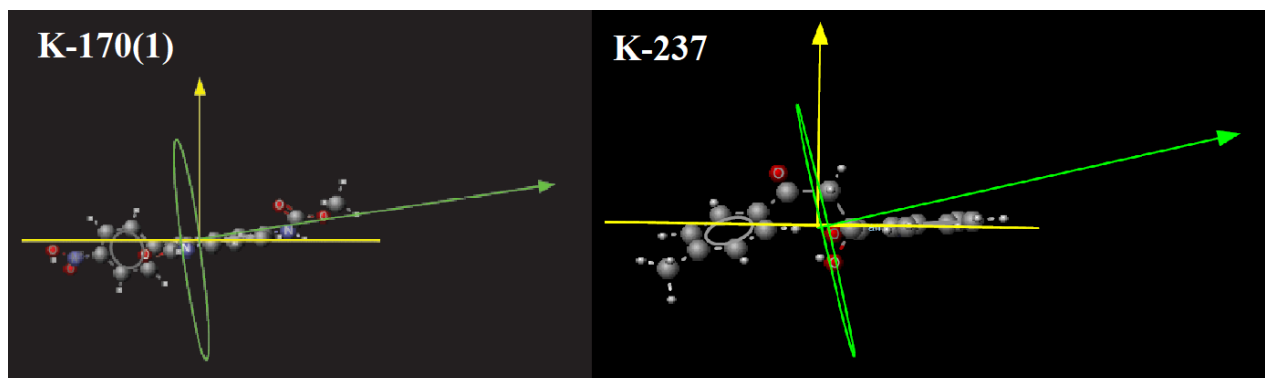


Рисунок 4.2. Влияние радикала в положении C3 на пространственное строение новых производных 2-оксиндола

При анализе заместителей в положении C3 (R^1) выявлено, что гетероциклические радикалы снижали ингибирующую альфа-глюкозидазу активность. При этом карбоциклические радикалы с заместителем в пара-положении вызвали наибольшее увеличение активности соединений.

При рассмотрении заместителей в положении C5 (R^2 для 3-арил-2-оксиндолов и в положении R^3 для 3,3-дизамещенных-2-оксиндолов) обнаружено, что наличие амидной группировки в данном положении повышало уровень активности веществ.

4.1.2. Построение модели связывания соединения K-170(1) с α -глюкозидазой *in silico*

Моделирование связывания производного K-170(1) с α -глюкозидазой *in silico* проведено для выяснения молекулярного механизма их взаимодействия. В графическом редакторе MarvinSketch 17.1.23 [MarvinSketch, США] была построена наиболее энергетически выгодная 3D-структура исследуемого соединения. В работе использована модель α -глюкозидазы человека 2qmj в комплексе с лигандом акарбозой из базы данных Protein Data Bank in Europe. В качестве модели фермента использовалась α -глюкозидаза человека, но полученные данные могут быть транслированы на другие организмы, в связи с высокой гомологичностью фермента [Spasov и др., 2018]. Из используемой модели был удален имеющийся лиганд, и проведено докирование вещества K-170(1) по всей структуре фермента. На рисунке 4.3 показано расположение сайтов связывания акарбозы и соединения K-170(1) с α -глюкозидазой.

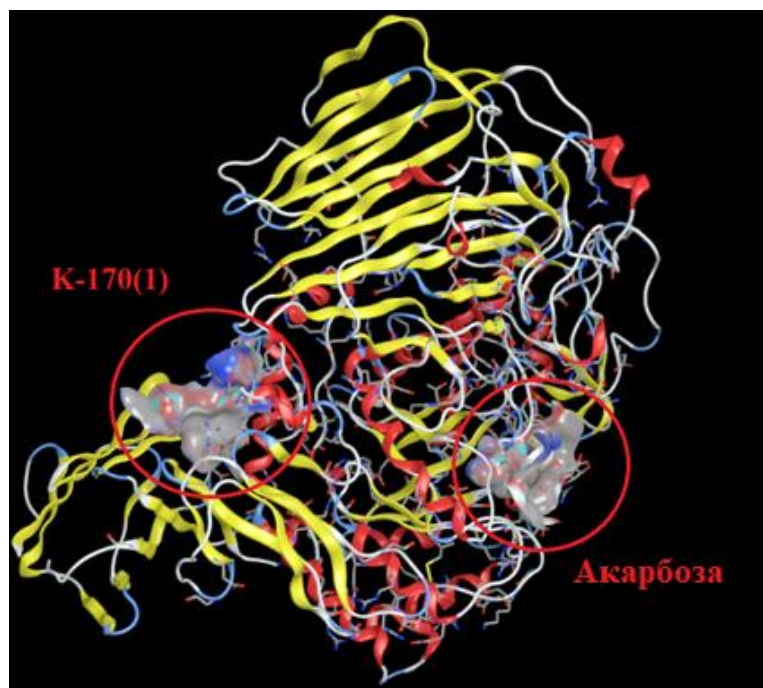


Рисунок 4.3. Расположение сайтов связывания акарбозы и соединения K-170(1) с α -глюкозидазой

По литературным данным известно, что акарбоза является конкурентным ингибитором активного центра фермента [Ghosh, Rangan, 2014]. Наиболее энергетически выгодное связывание соединения K-170(1) с ферментом происходит в ином сайте, что может говорить о его взаимодействии с аллостерическим центром фермента. На рисунке 4.4 представлены межмолекулярные взаимодействия производного K-170(1) и аллостерического центра α -глюкозидазы.

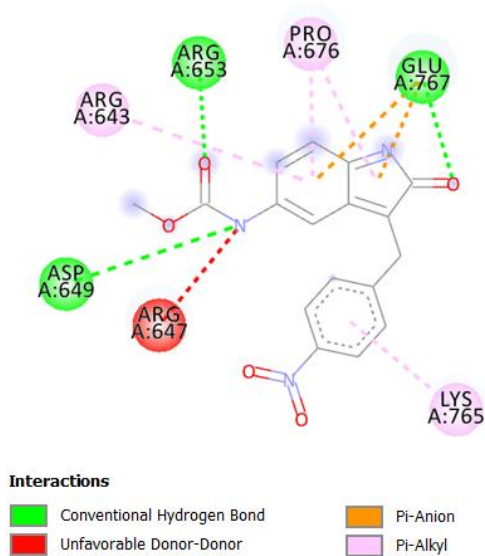


Рисунок 4.4. Межмолекулярные взаимодействия соединения K-170(1) и аллостерического центра α -глюкозидазы

При анализе полученной модели выявлены следующие межмолекулярные взаимодействия между соединением К-170(1) и α -глюкозидазой: водородные связи с ASP649, ARG653 и GLU767; π -акил взаимодействия с ARG643, PRO676 и LYS765; а также π -анион связи с GLU767.

4.1.3. Цитотоксичность соединения К-170(1)

Для наиболее активного соединения К-170(1) было проведено исследование в зависимости от конечной концентрации наличия цитотоксических свойств *in vitro* на первичных клетках животных.

Для тестирования цитотоксических свойств были выбраны перитонеальные первичные макрофаги, поскольку, кроме наличия цитотоксических свойств, на данных клетках возможно обнаружить наличие иммунотоксических свойств веществ, а также неонатальные фибробласты сердца как клетки с высокой скоростью пролиферации.

На рисунке 4.5 представлена кривая зависимости жизнеспособности клеток от конечной концентрации исследуемого вещества в лунке микропланшета.

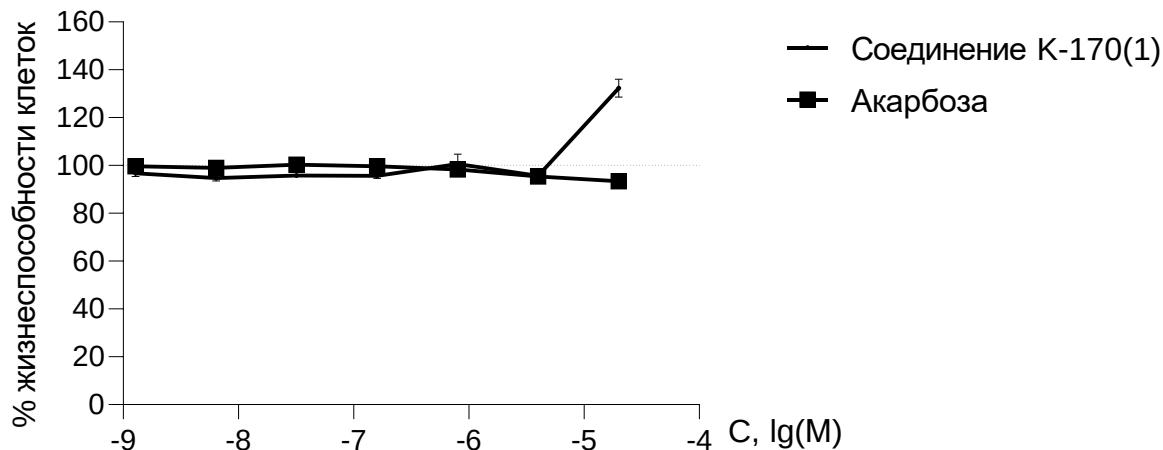


Рисунок 4.5. Влияние соединения К-170(1) и акарбозы в зависимости от концентрации на жизнеспособность перитонеальных макрофагов мышей в МТТ-тесте ($M \pm m$)

В результате проведенного исследования, показано отсутствие влияния производного К-170(1) на жизнеспособность клеток вплоть до концентрации 20 мкМ. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод об отсутствии цитотоксических и иммунотоксических свойств соединения, даже в высокой микромолярной концентрации, на данной клеточной линии.

На рисунке 4.6 представлен уровень жизнеспособности неонатальных сердечных фибробластов крыс при конечной концентрации исследуемого вещества 20 мкМ.

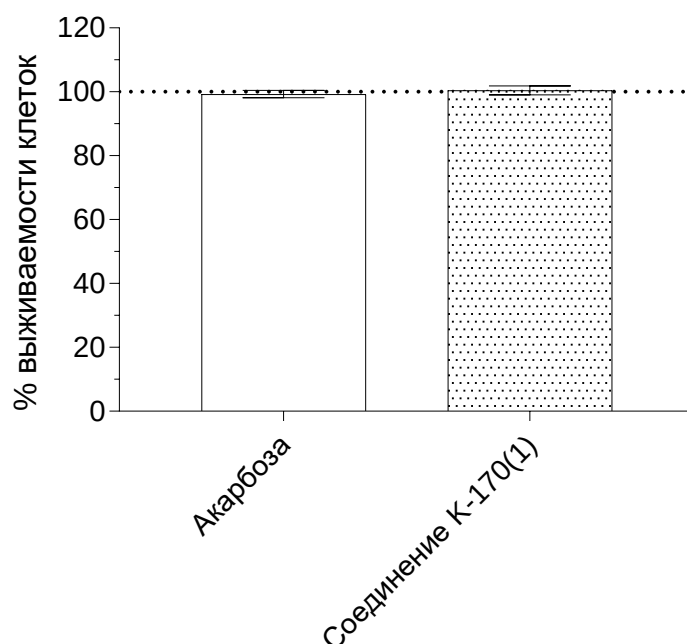


Рисунок 4.6. Влияние акарбозы и соединения К-170(1) в концентрации 20 мкМ на жизнеспособность неонатальных фибробластов сердца крыс в МТТ-тесте ($M \pm m$)

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод об отсутствии цитотоксического эффекта исследуемого соединения в высокой микромолярной концентрации на первичной линии быстро пролиферирующих клеток.

Заключение

Согласно результатам проведенного первичного скрининга, выявлено 6 производных с большей ингибирующей α -глюкозиды *S. Cerevisiae* активностью, чем у препарата сравнения «Акарбоза» (45,22 %). В ходе изучения активности соединений от концентрации установлено, что 4 исследуемых вещества [К-170(1), К-127, К-165 и К-248] превосходят акарбозу по величине показателя IC_{50} . Сформулированы взаимоотношения «структура – активность» для изученных производных 2-оксиндола.

Соединение К-170(1) связывается с аллостерическим сайтом α -глюкозидазы. Также в ходе исследования установлены ключевые аминокислоты фермента, участвующие в этом взаимодействии.

Для выявленного соединения-лидера К-170(1) проведено исследование цитотоксических свойств. Обнаружено, что данное вещество не подавляет жизнеспособность первичных

перитонеальных макрофагов мышей до конечной концентрации 20 мкМ и не влияет на жизнеспособность неонатальных фибробластов сердца крыс в конечной концентрации 20 мкМ.

Согласно полученным результатам можно сделать вывод, что соединение К-170(1) является перспективным для проведения дальнейших исследований его антигипергликемических свойств на различных моделях развития постпрандиальной гипергликемии *in vivo*, а также подтверждения обнаруженного механизма действия.

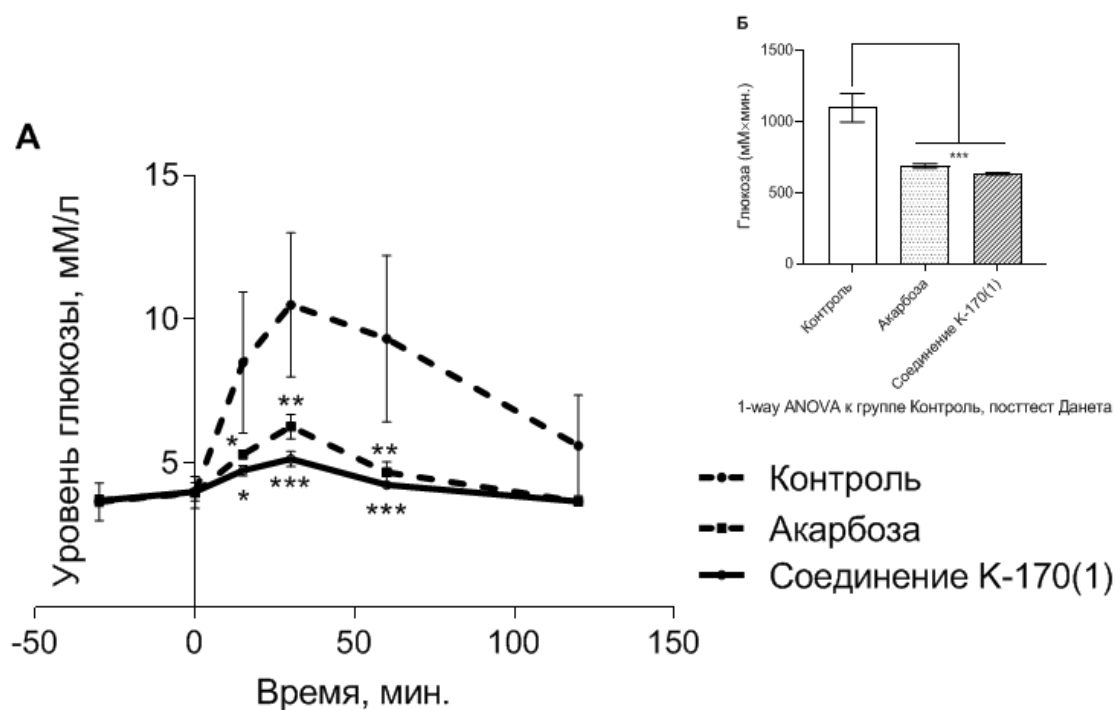
4.2. Антигипергликемическая активность соединения К-170(1)

α -глюкозидазы – семейство экзоферментов, локализующихся в просвете желудочно-кишечного тракта, осуществляющие превращение сложных полисахаридов до простых сахаров (глюкозы) [Matsuura и др., 2004]. Ингибиторы α -глюкозидазы являются перспективным классом пероральных антигипергликемических средств, предотвращающих образование глюкозы из полисахаридов, в результате чего не наблюдается гипергликемии. Из положительных моментов их применения стоит отметить отсутствие гипогликемического эффекта [Moelands и др., 2018].

При изучении фармакологических свойств потенциальных ингибиторов α -глюкозидазы проводят пероральные тесты толерантности к различным углеводным субстратам. Для этого используют дисахариды, такие как мальтаза (ингибирование мальтазы) и сахараза (ингибирование сахаразы). Данные тесты показывают выраженность антигипергликемического эффекта исследуемых веществ [Babu и др., 2004]. Пероральный тест толерантности к глюкозе используют для подтверждения выявленного механизма действия.

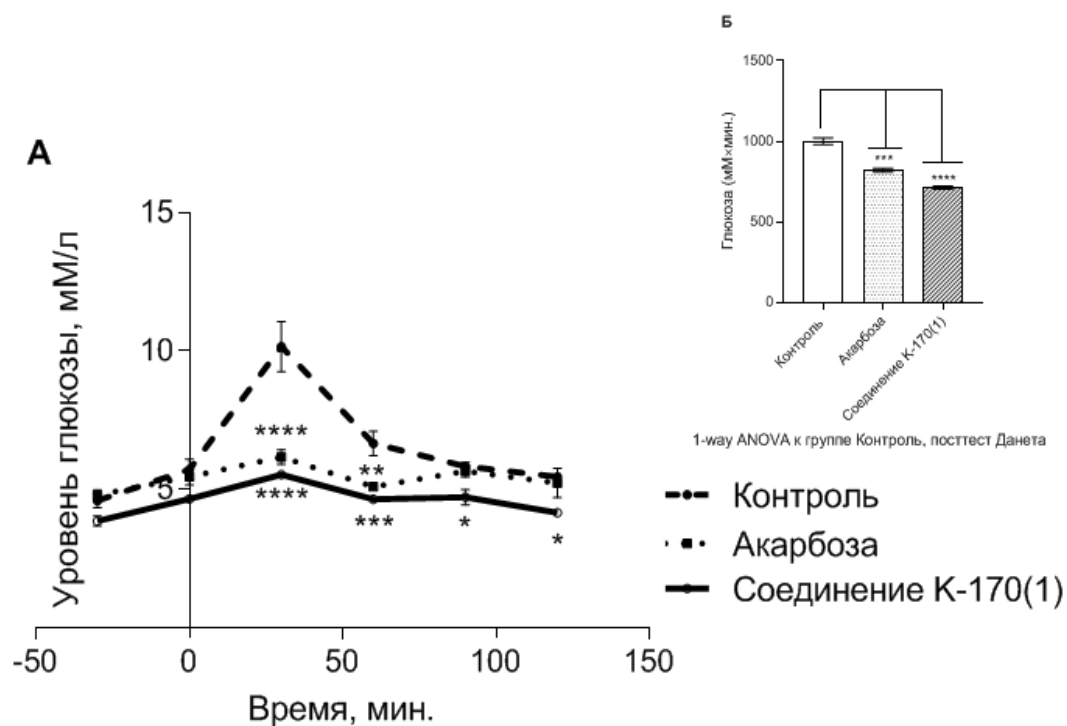
4.2.1. Влияние на уровень постпрандиальной гипергликемии в пероральном тесте толерантности к дисахаридам

На интактных нелинейных крысах-самцах проведены пероральные тесты толерантности к дисахаридам: мальтозе или сахарозе. В качестве препарата сравнения использовалась акарбоза (перорально, 5 мг/кг). Исследуемое вещество вводилось перорально в дозе 5 мг/кг. Результаты проведенных исследований представлены на рисунках 4.7 и 4.8.



2-way ANOVA к группе Контроль, пост-тест Даннета

Рисунок 4.7. Влияние соединения К-170(1) и акарбозы на уровень глюкозы плазмы крови при пероральной нагрузке мальтозой (А) и на площадь под кривой «Глюкоза – Время» (Б) ($M \pm m$)



2-way ANOVA к группе Контроль, пост-тест Даннета

Рисунок 4.8. Влияние соединения К-170(1) и акарбозы на уровень глюкозы плазмы крови при пероральной нагрузке сахарозой (А) и на площадь под кривой «Глюкоза – Время» (Б) ($M \pm m$)

Пероральный тест толерантности к мальтозе

В группе контроля мальтоза при пероральном введении вызывала пик гипергликемии через 30 минут, уровень глюкозы плазмы крови составил $10,5 \pm 4,3$ мМ/л. Ингибитор альфа-глюкозидазы акарбоза привел к снижению максимального пика гипергликемии до $6,2 \pm 0,9$ мМ/л, при этом площадь под кривой «Глюкоза – Время» снизилась на 37,2 % относительно контрольной группы. Исследуемое соединение К-170(1) привело к понижению максимума гипергликемии до $5,1 \pm 0,5$ мМ/л и площади под кривой «Глюкоза – Время» на 42,1 %.

Пероральный тест толерантности к сахарозе

Сахароза у группы контроля вызывала значимое увеличение уровня глюкозы плазмы крови через 30 мин, до значений $10,1 \pm 2,0$ мМ/л. Акарбоза снижала выраженность данного пика, при этом значения глюкозы плазмы крови составили $6,1 \pm 0,6$ мМ/л, а снижение площади под кривой «Глюкоза – Время» 17,9 %. Соединение К-170(1) вызывало уменьшение максимального значения глюкозы крови до $5,5 \pm 0,1$ мМ/л, а уровня кривой на 28,8 %.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что К-170(1) оказывает значимый антигипергликемический эффект при введении дисахаридов, сопоставимый с препаратом сравнения. При использовании мальтозы в качестве углеводной нагрузки отмечается более выраженный эффект вещества относительно сахарозы, что может говорить о большем влиянии исследуемого соединения на мальтозу. У производного К-170(1) не было выявлено гипогликемического эффекта.

4.2.2. Влияние на уровень постпрандиальной гипергликемии в пероральном тесте толерантности к глюкозе

Пероральный тест толерантности к глюкозе используется для подтверждения, выявленного ранее механизма действия, его результаты представлены на рисунке 4.9.

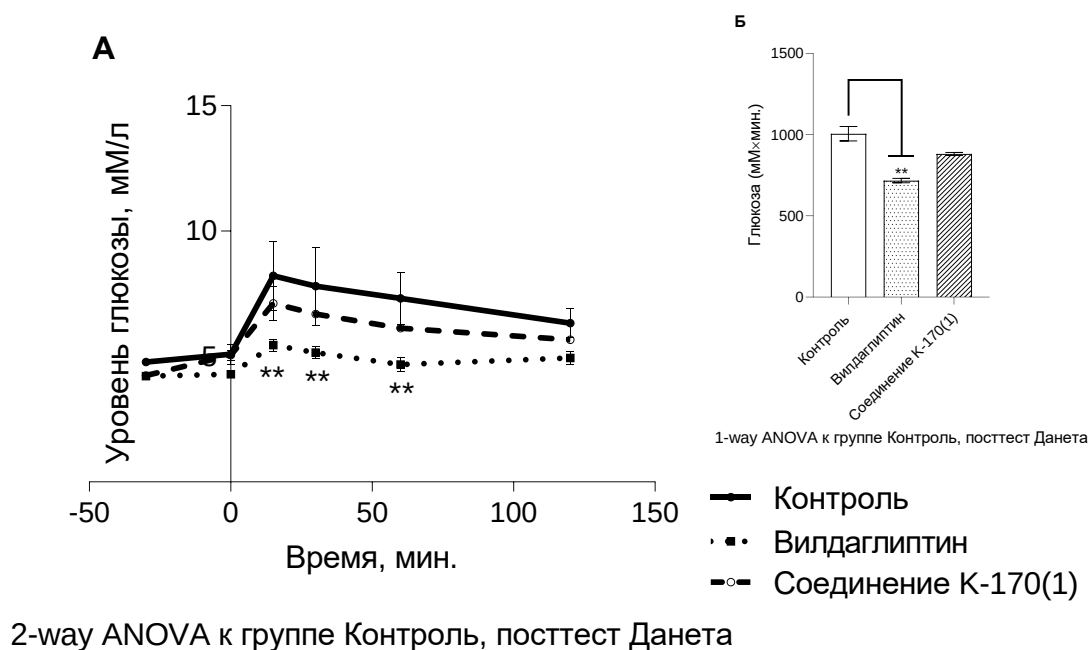


Рисунок 4.9. Влияние соединения К-170(1) и вилдаглиптина на уровень глюкозы плазмы крови при пероральной нагрузке глюкозой (А) и на площадь под кривой «Глюкоза – Время» (Б) ($M \pm m$)

Глюкоза при пероральном введении группе контрольных животных вызывала быстрый (15 мин) пик развития гипергликемии, со значениями глюкозы $8,2 \pm 2,7$ mM/л. Препарат сравнения «Вилдаглиптин» приводил к снижению максимального пика уровня глюкозы плазмы крови до $5,4 \pm 0,5$ mM/л, при этом площадь под кривой «Глюкоза – Время» значительно снижалась на 28,6 %. Соединение К-170(1) не оказало значимого влияния на уровень глюкозы крови ($7,1 \pm 1,3$ mM/л), при этом площадь под кривой статистически недостоверно снизилась на 12,3 %.

Вещество К-170(1) не оказало статистически достоверного влияния на уровень постпрандиальной гипергликемии, в отличие от препарата сравнения вилдаглиптина. Данный результат подтверждает выявленный ранее механизм действия изучаемого вещества.

4.3. Оценка лекарственного подобия, основных фармакокинетических и токсикологических свойств соединения К-170(1) по показателям ADMET

Соединение К-170(1) изучено с помощью 5 наиболее распространенных интернет-сервисов ADMET. Спрогнозированы и оценены основные фармакокинетические и токсикологические показатели, а также коэффициент лекарственного подобия. С целью

подтверждения полученных данных, прогноз проведен также для препарата сравнения «Акарбозы». Полученные результаты представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4

Результаты прогноза ADMET показателей соединения К-170(1) и акарбозы

Показатель	Результат прогноза	
	Соединение К-170(1)	Акарбоза
Лекарственное подобие		
Коэффициент лекарственного подобия	-6,503	-7,403
Фармакокинетические показатели		
Проницаемость в линии клеток Сасо-2	Проницаем	Не проницаем
Локализация в клетке	Митохондрии	Митохондрии
Абсорбция в ЖКТ	88,06 %	0%
Проницаемость в ГЭБ	Проникает через ГЭБ	Не проникает через ГЭБ
Объем распределения (л/кг)	0,737	0,164
Токсикологические показатели		
Класс острой токсичности	4	5
Показатель LD ₅₀ острой токсичности (крысы, мг/кг)	1000,00	>5000
Хроническая токсичность (крысы, мг/кг/день)	106,90	>5000
Максимальная переносимая доза (люди, мг/кг/день)	0,762	2,999
Тест Эймса	Возможна мутагенность	Не мутагенен
Канцерогенность	Не канцерогенен	Не канцерогенен
Гепатотоксичность	Возможна токсичность	Не токсичен
Иммунотоксичность	Не токсичен	Не токсичен
Мутагенность	Не мутагенен	Не мутагенен
Цитотоксичность	Не токсичен	Не токсичен
Кожное раздражение	Не вызывает раздражения	Не вызывает раздражения

Согласованность полученных данных для препарата сравнения «Акарбозы» с литературными и клиническими данными ее применения [Chiasson и др., 2002; Furman, 2007; Liu, Ma, 2017; Moelands и др., 2018] подтверждают возможность использования данной методики прогноза.

Схожий коэффициент лекарственного подобия у исследуемого вещества и препарата сравнения является позитивной предпосылкой для проведения доклинического исследования вещества. Хорошая абсорбция производного K-170(1), в отличие от акарбозы, в желудочно-кишечном тракте говорит о его большей схожести с классом всасываемых ингибиторов α -глюкозидазы (воглибоза), для которого, по литературным данным, характерна меньшая частота возникновения побочных эффектов [Dabhi, Bhatt, Shah, 2013; Ghani, 2015; Kawamori и др., 2009]. Принадлежность к 4-му классу острой токсичности (малотоксичные вещества) говорит о возможном наличии широкого терапевтического интервала применения вещества и его низкой токсичности. Опасение вызывает возможное наличие некоторых специфических видов токсичности, что требует проведение титрования дозы введения и определение порога, при котором могут быть выражены побочные эффекты соединений.

Заключение

По данным исследования, в тестах толерантности к дисахаридам (мальтозе, сахарозе) соединение K-170(1) оказывало статистически значимый антигипергликемический эффект при пероральном применении, при этом не наблюдалось развития гипогликемии. Влияния на уровень постпрандиальной гипергликемии в тесте толерантности к глюкозе не обнаружено, что подтверждает механизм действия изучаемого производного. Спрогнозированные показатели ADMET показывают перспективность дальнейшего изучения выявленного соединения-лидера, однако опасение вызывает возможное наличие некоторых специфических видов токсичности, что требует проведение титрования дозы введения и определение порога, при котором могут быть выражены побочные эффекты соединений.

ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По данным группы авторов [Franco Buzzetti, Maria Gabriella Brasca, Antonio Longo, 1995; Yasuda и др., 2013; Yoshikawa и др., 2015], производные 2-оксиндола являются перспективным классом соединений и оказывают широкий спектр фармакологических эффектов. К характерным для 2-оксиндолов видам активности относят: антидиабетическую [Khan и др., 2014], противовоспалительную [Rudrangi и др., 2011], антиоксидантную и антирадикальную [Furuta и др., 2017; Gupta A.K., Kalpana S., 2012; Hirata и др., 2018; Yasuda и др., 2013], противоопухолевую [Franco Buzzetti, 1995, Nesi и др., 2013], антимикробную и противовирусную [Ghozlan и др., 2015; Padalkar и др., 2016; Hazare R.S., Arpit, 2011].

В работе рассмотрен ряд из 27 производных 2-оксиндола [Lozinskaya и др., 2019]. По данным Khan и др. [2013], химически схожие им соединения оказывают выраженный антидиабетический эффект. Данный вид активности является социально значимым, поскольку СД2 представляет собой глобальную проблему для здоровья человека и общества в целом, темпы роста распространенности которой приобрели масштаб мировой эпидемии. Около 425 миллионов человек по всему земному шару подвержено данному заболеванию [Cho и др., 2018]. Особую опасность при нарушении метаболизма глюкозы и липидов представляют развивающиеся осложнения СД2: диабетические ретино-, кардио-, ангио-, нефро- и полинейропатии, атеросклероз, оппортунистические инфекции, деменция и многие другие, приводящие к нетрудоспособности и инвалидизации населения [Mata-Cases и др., 2020]. Длительное состояние гипергликемии запускает в организме процессы гликирования белков, что приводит к активации каскада NF- κ B и подкреплению развитого подострого хронического воспаления [Maleki и др., 2020]. Большое разнообразие разработанных классов противодиабетических препаратов, к сожалению, не обеспечивает все необходимые потребности: наличие большого количества побочных эффектов, недостаточная корректировка постпрандиальной гипергликемии, отсутствие влияния на развивающееся подострое хроническое воспаление [Cheng, Fantus, 2005; Upadhyay и др., 2018].

По данным исследователей [Czeleń, Szeffler, 2021; Dhokne, Sakla, Shankaraiah, 2021; Leoni и др., 2016], производные 2-оксиндола являются потенциальными ингибиторами киназы гликогенсинтазы типа 3 бета (GSK3B). По данным Chen и др. [2014], производные 2-оксиндола снижают ЛПС-индуцированную выработку провоспалительных цитокинов (TNF- α и IL-6) макрофагов посредством ингибирования экспрессии мРНК ЦОГ-2, PGES и индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS). 3-бензилиденовые производные 2-оксиндола являются индукторами NAD(P)H-хинон-оксидоредуктазы-1 и оказывают ингибирующее влияние на

фермент тиоредоксинредуктазу [Kaminska и др., 2016]. Некоторые производные 2-оксиндола ингибируют фермент альфа-глюкозидазу [Mata и др., 2013].

Киназа гликогенсинтазы типа 3 бета (GSK3B) является одной из новых перспективных мишеней для терапии СД2 [Wagman, Johnson, Bussiere, 2005]. При СД2 выявлена чрезмерная активация GSK3B, снижающая синтез гликогена, утилизацию глюкозы, синтез белка [Dokken и др., 2008]. Так, в исследованиях Сассо и др. (2019) ингибитор GSK3B нормализовал продукцию и секрецию инсулина и транспортера глюкозы GLUT2, активность β -клеток островков Лангенгарса, а также активность ферментов, участвующих в обмене углеводов [Domoto и др., 2020]. В периферических тканях с инсулинорезистентностью применение ингибиторов GSK3B увеличивает экспрессию IRS-1 и GLUT4, уровень активной pAMPK, а также скорость утилизации глюкозы и образования гликогена [Kim K. M. и др., 2015]. Ингибирование киназы гликогенсинтазы типа 3 бета препятствует развитию как подострого хронического воспаления, так и острых воспалительных процессов путем инактивации сигнального каскада NF- κ B [уменьшение количества провоспалительных цитокинов (IL-1B, IL-6, TNF-a), увеличение количества противовоспалительных интерлейкинов (IL-10), снижение синтеза индуцированного оксида азота и миграции макрофагов, снижение хемотаксиса моноцитов путем уменьшения количества цитокинов Msp1 и Msp3] [Beurel, Jore, 2009; Wang и др., 2018]. Для ингибиторов GSK3B характерно влияние на многие осложнения СД2: ускорение ранозаживления и снижение апоптоза фибробластов [Кароог и др., 2008]; стимулирование пролиферации кардиомиоцитов [Tseng, Engel, Keating, 2006]; снижение повышенной агрегантной активности тромбоцитов, а также препятствование тромбообразованию [Barry и др., 2003; Li, August, Woulfe, 2008; Wei и др., 2020]; активация ядерного фактора pnf2, отвечающего за экспрессию ферментов 2-й фазы антиоксидантной и антирадикальной защиты организма [Chen и др., 2015; Nagle и др., 2014]; а также цитопротекторная активность [Natoli и др., 2008; Paeng и др., 2014; Yi и др., 2007].

В общедоступных базах биологической активности описаны 16 скаффолдов, обеспечивающих GSK3B-ингибирующую активность: пиразольный, пиррольный, пиридиновый, пиримидиновый, тиазольный, индольный и др. [Phukan и др., 2010]. При этом наибольшее количество ингибиторов выявлено среди производных пиридина, пиримидина и пиразола. База данных ChEMBL содержит 7251 соединение, изученное на ингибирование GSK3B (на декабрь 2019 г.). Из них только 194 производных (2,7%) являются производными 2-оксиндола, при этом многие из них обладают активностью в наномолярном диапазоне. Таким образом, 2-оксиндолы являются перспективным скаффолдом для конструирования новых ингибиторов GSK3B.

В клинической практике лекарственные препараты с подобным антидиабетическим механизмом действия отсутствуют. Клинические исследования проводились для лечения болезни Альцгеймера, мышечной дистрофии и аутизма (NP031112 Tideglusib), а также резистентных опухолевых заболеваний (LY2090314, 9-ING-41) [Lovestone и др., 2015; Ugolkov и др., 2018]. Следовательно, разработка данного класса препаратов как инновационных средств для терапии СД2, обладающих антигипергликемической, противовоспалительной, антиоксидантной активностями и влияющими на поздние осложнения СД2, является актуальной и перспективной.

В настоящем исследовании *in vitro* изучено влияние 16 новых производных 2-оксиндола на активность киназы гликогенсинтазы типа 3 бета человека. Выявлено одно производное (K-167), оказывающее большее ингибирующее GSK3B действие в конечной концентрации 10 мкМ, чем вещество сравнения SB-21673; 4 соединения проявили активность выше 50 % (K-165, K-167, K-248, OIP-NO₂-2). Вещество K-167 (IC₅₀ 4,2 нМ) в два раза превосходит по активности вещество сравнения (IC₅₀ 8,4 нМ).

Проведен анализ зависимости ингибирующей активности от структуры новых производных 2-оксиндола. Выявлено, что производные 3-арилиден-2-оксиндола оказались более перспективными и активными в сравнении с 3,3-дизамещенными-2-оксиндолами. Возможным объяснением служит наличие ароматического радикала в положении С3 у производных 3-арилиден-2-оксиндола, в связи с чем образуется расширенная система π-π сопряжения, электронные системы находятся в одной плоскости, образуя плоский σ-скелет. При анализе заместителей в положении С3 (R¹) показано, что наличие шестичленного ароматического цикла с гетероатомом в орто-положении или гидроксильной группой в пара-положении повышало ингибирующую GSK3B активность. По данным Chen и др. (2014), производные 2-оксиндола, содержащие в положении С3 шестичленный ароматический цикл, оказывают наибольшую противовоспалительную активность, что подтверждает выявленную закономерность.

По результатам проведенных ранее исследований и данных о влиянии соединений на активность киназы гликогенсинтазы типа 3 бета выявлены соединения-лидеры для проведения углубленного фармакологического изучения: производное K-167 – наиболее активное производное в методике *in vitro*; вещество K-248, которое ингибирует киназу гликогенсинтазы типа 3 бета в микромолярном диапазоне концентраций (IC₅₀ 4,3 ± 0,2 мкМ). В предварительно проведенных исследованиях по изучению влияния на липополисахаридиндуцированный синтез оксида азота перитонеальными макрофагами мышей выявлено, что соединение K-248 оказывает наибольший противовоспалительный эффект в ряду исследованных производных 2-оксиндола (IC₅₀ 8,78 мкМ). Липополисахарид является специфическим активатором Tlr4 рецепторов.

GSK3B задействована как в Myd88-зависимом (Tlr4/Myd88/IRAK/TRAF6/TAK1/.../GSK3B), так и в Myd88-независимом (Tlr4/TRIF/TRAF3/.../GSK3B) сигнальном каскаде [Beurel, Jope, 2009], в связи с чем данная методика может быть использована для поиска GSK3B, способных проникать внутрь клеток.

Соединение К-167. На первом этапе проведено *in silico* исследование механизма действия вещества обнаружено, что взаимодействие происходит в АТФ-связывающем сайте фермента, что также характерно для вещества сравнения [An и др., 2010]. Выявлены ключевые аминокислоты, обуславливающие взаимодействие изучаемого соединения, и вещества сравнения с активным центром фермента: VAL70, ALA83, CYS199 и LEU188.

На втором этапе проведено изучение цитотоксичности. При исследовании цитотоксичности на перитонеальных макрофагах мышей производное К-167 не вызывало гибель клеток вплоть до конечной концентрации 7 мкМ, при этом в концентрации 50 мкМ наблюдалась значительная токсичность; в концентрации 20 мкМ у линии неонатальных фибробластов сердца крыс цитотоксический эффект отсутствовал.

Вещество К-167 улучшает захват глюкозы из среды неонатальными фибробластами сердца крыс на $+237,80 \pm 27,82$ %. Выявленное влияние на захват глюкозы быстро пролиферирующими клетками подтверждает предположение о наличии антидиабетического действия у соединения.

Активность в наномолярном диапазоне концентраций при цитотоксичности в микромолярном диапазоне позволяет сделать вывод о широком терапевтическом индексе вещества. Полученные данные подтверждают перспективность углубленного изучения производного К-167.

На третьем этапе исследования для соединения К-167 проведено изучение влияния на уровень постпрандиальной гипергликемии в пероральном тесте толерантности к глюкозе при однократном введении крысам с моделированным СД2. Производное испытывалось в 3 дозах: 10, 20 и 30 мг/кг. Выявлено, что доза 30 мг/кг по эффективности ($\Delta AUC -29,30 \pm 3,88$ %, $p < 0,001$) соответствует препарату сравнения «Вилдаглиптину» в дозе 10 мг/кг ($\Delta AUC -26,60 \pm 3,20$ %, $p < 0,001$). Она была выбрана для проведения дальнейших исследований как наиболее эффективная. По данным Ring и др. (2003), селективный наномолярный ингибитор GSK3B CHIR-99021 при однократном пероральном введении в дозе 48 мг/кг оказывает достоверное влияние на уровень постпрандиальной гипергликемии ($\Delta AUC -33 \pm 4,20$ %), что соответствует уровню активности К-167 в дозе 30 мг/кг.

На четвертом этапе проведено изучение влияния соединения при курсовом пероральном введении мышам линии c57bl/6j с развитым СД2. Курсовое введение проводилось в течение 90

дней. В качестве препарата сравнения использовался «Метформин» (100 мг/кг). Выявлено, что соединение К-167 оказывает выраженную антидиабетическую активность, начиная с первого дня курсового введения. Данный эффект сохранялся в течение всех трех месяцев введения и был сопоставим с препаратом сравнения. Производное К-167 улучшает гликемический контроль у животных, что подтверждается снижением уровня глюкозы плазмы крови натощак во всех исследованных временных точках на -19,3 %, -10,3 % и -20,4 % ($p < 0,001$) относительно группы ВЖД. Вещество К-167 снижает уровень глюкозы (-29,1 %, $p < 0,05$) и инсулина (-78,3 %, $p < 0,0001$) плазмы крови относительно группы ВЖД, благодаря чему не было выявлено признаков инсулинорезистентности у опытной группы животных (снижение индекса инсулинорезистентности -71,2 %, $p < 0,001$).

Важным эффектом при терапии СД2 является влияние на массу тела [Chaudhury и др., 2017], в связи с этим изучено влияние висцеральных жировых отложений на вес и массу животных. Соединение К-167 не влияет на вес животных, при этом в морфометрическом анализе жировой ткани показано снижение всех типов абдоминальных жировых отложений до уровня интактных животных (мезентериальных -33,54 %, эпидидимальных -34,9 % и ретроперитонеальных -36,9 % относительно группы ВЖД; $p < 0,01$). Исследуемое вещество нормализовало уровень триглицеридов печени (снижение -24,1% от группы ВЖД, $p < 0,05$).

Основной теорией развития инсулинорезистентности и СД2 в настоящее время принято считать воспалительную [Shoelson, Lee, Goldfine, 2006]; избыток ненасыщенных жирных кислот, поступающих с пищей, активирует каскад Tlr4/.../Nf-kB макрофагов жировой ткани [Davis и др., 2020] и приводит к развитию хронического подострого воспаления, к оксидативному стрессу и нарушениям углеводного обмена [Pal и др., 2012; Sears, Kim, 2010; Shi и др., 2006]. В связи с этим исследовано влияние производного К-167 на основные маркеры, характеризующие развитие хронического подострого воспаления. Так, выявлено, что под действием изучаемого соединения нормализовались показатели лейкоцитарной формулы крови (снижение количества сегментоядерных нейтрофилов -38 % и повышение числа лимфоцитов +21,5 % от группы ВЖД, $p < 0,0001$), а также ранних медиаторов воспаления (ФНО- α -39,4 % и оксида азота -59,3 % относительно группы ВЖД, $p < 0,05$). Помимо этого, вещество К-167 оказывало благоприятное влияние на антирадикальную систему организма: снижение уровня ТБК-активных продуктов печени -71 % от группы ВЖД ($p < 0,05$) и увеличение количества восстановленного глутатиона в 3,4 раза от группы ВЖД ($p < 0,01$) и на +97 % от группы интактных животных ($p < 0,05$). Кроме того формирующийся воспалительный процесс влиял на поведенческую активность животных. По данным авторов [Okun и др., 2012; Strekalova и др., 2015], выявлено стрессорное влияние ВЖД на нарушение способности к обучению. Соединение К-167 препятствовало развитию данных изменений под воздействием ВЖД, что

показано по нормализации результатов поведенческих тестов («Открытое поле» и «Распознавание нового объекта»).

Kim K. M. и соавт. (2015) перорально вводили ингибитор GSK3B KICG1338 в дозе 30 мг/кг курсами (56 дней). Достоверное снижение глюкозы плазмы крови натошак выявлено лишь на 3-й неделе эксперимента с сохранением эффекта до конца эксперимента. На 56-й день эксперимента показано достоверное снижение площади под кривой «Глюкоза – Время» в ИТТГ до уровня препарата сравнения «Метформина». Выявлено значимое снижение уровня инсулина, факторов воспаления (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6), повышение количества инсулин-позитивных клеток поджелудочной железы и адипонектина. По данным King и др. (2013), курсовое введение ингибитора GSK3B AR-A014418 животным с моделированным сахарным диабетом предотвращает снижение интереса к новому объекту.

Совокупность выявленных эффектов при курсовом введении соединения K-167 позволяет сделать вывод о наличии у него большого спектра плеiotропных эффектов (антидиабетический, противовоспалительный, антиоксидантный, антирадикальный), позволяющих достоверно корректировать проявления моделированной патологии. Эффективность исследуемого производного сопоставима с препаратом сравнения «Метформином», «золотым стандартом» лечения СД2.

На пятом этапе проведено изучение противовоспалительной активности соединения K-167 *in vitro* и *in vivo* на моделях воспалительного процесса. Поскольку избыток ненасыщенных жирных кислот при СД2 активирует сигнальный путь Tlr4 рецепторов, для исследования противовоспалительной активности использовался липополисахарид, являющийся специфическим активатором данного каскада [Shi и др., 2006]. На клеточной модели *in vitro* биохимических исследованиях выявлено, что производное в наномолярных концентрациях предотвращает индуцированную липополисахаридом и неопсонизированным зимозаном (специфический лиганд Tlr3 рецепторов) активацию макрофагов. В морфологическом исследовании подтверждено наличие данной активности (коэффициент распластанности макрофагов – $0,310 \pm 0,059$, в концентрации 3 нМ, $p < 0,0001$; группа контроля $2,290 \pm 0,126$). Обнаружено отсутствие влияния вещества на фагоцитарный ответ перитонеальных макрофагов в конечной концентрации 7 мкМ и перитонеальных нейтрофилов в концентрации 20 мкМ. Выявлено, что вещество K-167 препятствует выработке ИЛ-6 под воздействием липополисахарида (IC_{50} $18,51 \pm 14,80$ мкМ). Отсутствие чрезмерной поляризации макрофагов и влияния на врожденный бактериальный ответ говорит о благоприятном иммунотропном действии соединения. На животных в модели липополисахаридиндуцированного отека задней лапы крыс (100 мкг/лапа) производное K-167 в дозе 30 мг/кг при пероральном введении оказало выраженную противовоспалительную активность. Выявлено достоверное снижение веществом

К-167 объема отека задней лапы животных в течение 24 часов (ΔAUC -63,2 % от группы ЛПС, $p < 0,05$), достоверное снижение выработки ФНО- α (-90,9 % от группы ЛПС, $p < 0,05$) и оксида азота (-57,1% от группы ЛПС, $p < 0,01$) в плазме крови. По результатам исследований подтверждено влияние соединения на сигнальный путь Tlr4 рецептора, что может быть использовано для предотвращения прогрессирования подострого воспаления и инсулинорезистентности при СД2.

По данным Tantray и др. (2016), при однократном пероральном введении ингибитора GSK3B вещества 4g (IC_{50} 0,19 мкМ) и SB-21673 выявлено наличие выраженной противовоспалительной активности в тесте липополисахаридиндуцированного отека задней лапы крыс (100 мкг/лапа). Соединение предотвращало увеличение объема отека, снижало продукцию провоспалительных цитокинов (ФНО- α ., ИЛ-1 β и ИЛ-6) и оксида азота.

На шестом этапе проведено изучение влияния производного К-167 на процессы агрегации и тромбообразования как на самые частые осложнения СД2 [Cade, 2008; Wu и др., 2020]. Для изучения антиагрегантной активности использовались две методики, различающиеся индукторами агрегации. В методике с использованием АДФ (5 мкМ) соединение проявило высокий уровень активности (IC_{50} 21 мкМ соответственно) относительно препарата сравнения «Ацетилсалициловой кислоты» (IC_{50} 104 мкМ). При использовании в качестве индуктора агрегации коллагена (15 мкг/мл) вещество К-167 в 16 раз активнее препятствовало агрегации тромбоцитов (IC_{50} 3,02 мкМ), чем ацетилсалициловая кислота (IC_{50} 49,3 мкМ). Наличие антитромботической активности у производного К-167 определялось по влиянию на время окклюзии сонной артерии крыс, индуцированной аппликацией 50%-ы раствором хлорида железа (III). Исследуемое вещество вводилось перорально в дозе 30 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовалась кислота ацетилсалициловая в различных дозировках. Выявлено, что вещество К-167 пролонгировало время окклюзии сонной артерии на +78,5 % ($p < 0,0001$) от группы контроля. Соответствующий уровень активности для препарата сравнения (+68,4 %, $p < 0,0001$) показан в дозе 150 мг/кг. Полученные результаты позволяют сделать вывод о возможности коррекции поздних осложнений СД2 исследуемым веществом, что окажет дополнительное протекторное действие на организм. По данным Bagu и др. (2003), лития хлорид ингибирует GSK3B тромбоцитов, препятствуя их агрегации при добавлении коллагена. Агрегация предотвращается полностью при конечной концентрации лития хлорида 50 мкМ.

На седьмом этапе проведена оценка лекарственного подобия, расчет основных фармакокинетических и токсикологических свойств производного К-167. Выявлено, что исследуемое производное имеет благоприятный фармакокинетический профиль, относится к соединениям 4-го класса токсичности (малотоксичные). На основании прогнозирования возможно наличие гепато- и иммунотоксичности, а также мутагенности в тесте Эймса, что дает

основания при планировании доклинического изучения вещества особое внимание уделить функциональной активности печени и мутагенным свойствам, а также определению порога доз, при которых проявляются данные эффекты.

Проведено изучение острой токсичности производного К-167 при пероральном введении мышам. Изучаемое вещество не проявило признаков острой токсичности в дозе 2 г/кг, выживаемость животных через 2 недели после введения вещества составляла 100 %, значимых изменений в весе животных не обнаружено. Полученные данные позволяют сделать вывод о его принадлежности к соединениям 5-го класса токсичности (нетоксичные).

Соединение К-248. На первом этапе проведено *in silico* изучение механизма связывания производного с GSK3B. Показано, что взаимодействие происходит в АТФ-связывающем сайте фермента [An и др., 2010]. Выявлены ключевые аминокислоты, обуславливающие взаимодействие изучаемого соединения и вещества сравнения с активным центром фермента: VAL70, ALA83, CYS199 и LEU188.

На втором этапе проведено изучение цитотоксических свойств соединения К-248. В конечной концентрации 7 мкМ отсутствовало влияние на жизнеспособность линии перитонеальных макрофагов мышей. В концентрации 50 мкМ наблюдалась значительная токсичность; в концентрации 20 мкМ на линии неонатальных фибробластов сердца крыс гибель клеток отсутствовала.

Производное К-248 в конечной концентрации 20 мкМ улучшает захват глюкозы неонатальными фибробластами сердца крыс на $+272,8 \pm 48,76$ %. Выявленное влияние на захват глюкозы быстро пролиферирующими клетками и наличие высокой противовоспалительной активности предполагают наличие антидиабетического действия у вещества.

Изучаемое соединение ингибирует киназу гликогенсинтазы типа 3 бета, способно проникать внутрь клеток, а также не вызывает цитотоксичности вплоть до высоких микромолярных концентраций, в связи с чем взято для проведения углубленного изучения фармакологических свойств.

На третьем этапе изучено влияние соединения К-248 при курсовом пероральном введении в дозе 30 мг/кг мышам линии c57bl/6j с развитым СД2. Курсовое введение проводилось в течение 90 дней. В качестве препарата сравнения использовался метформин (100 мг/кг). В отличие от производного 2-оксиндола К-167, изучаемое производное не оказало влияния на уровень постпрандиальной гипергликемии при первичном однократном введении вещества (Δ AUC -5,6 %), однако значительно снижало его в тестах на 45-й и 90-й дни курсового введения (Δ AUC -21,6 и -14 % соответственно, $p < 0,0001$). Выявлено, что соединение К-248 значительно снижает уровень глюкозы плазмы крови натощак во всех исследованных временных

точках на -24 %, -7,8 % и -12,5 % ($p < 0,0001$; 0,05; 0,001). Изучаемое производное снижает уровень глюкозы плазмы крови на -44,4 % ($p < 0,05$) и инсулина на -73,5 % ($p < 0,001$) от группы ВЖД, что позволило предотвратить развитие инсулинорезистентности (снижение индекса инсулинорезистентности -51,6 %, $p < 0,05$). При исследовании влияния вещества на массу животных достоверных отличий выявлено не было, однако показано значимое снижение массы всех исследованных типов абдоминальных жировых отложений: мезентериальных -34,3 %, ретроперитонеальных -39,1 % и эпидидимальных -44,6% ($p < 0,001$). Снижение массы ретроперитонеальных и эпидидимальных жировых отложений недостоверно превышало таковое при введении вещества К-167. Вещество К-248 снижает уровень триглицеридов печени на -15,1 % ($p < 0,05$). Соединение К-248 оказывало более выраженное противовоспалительное действие, чем производное К-167, что выражалось во влиянии на выработку ранних медиаторов воспаления (снижение уровня ФНО- α -46,6 % и оксида азота -25,8 % от группы ВЖД, $p < 0,05$) и показатели лейкоцитарной формулы крови животных (снижение количества сегментоядерных нейтрофилов -46,6 % и повышение числа лимфоцитов +25,8 % от группы ВЖД, $p < 0,0001$), что позволяет сделать вывод о предотвращении развития хронического подострого воспаления, характерного для патогенеза СД2. Также обнаружено снижение уровня ТБК-активных продуктов печени -70,7 % ($p < 0,05$) от группы ВЖД, при отсутствии достоверного влияния на количество восстановленного глутатиона печени в отличие от соединения К-167.

На четвертом этапе проведено дополнительное изучение противовоспалительной активности производного К-248 на моделях *in vitro* и *in vivo*. На клеточной модели *in vitro* изучаемое соединение в конечной концентрации 3 нМ предотвращает индуцированную липополисахаридом и неопсонизированным зимозаном активацию макрофагов. В морфологическом исследовании подтверждено наличие данной активности (коэффициент распластанности макрофагов $0,570 \pm 0,086$, $p < 0,0001$). Выявлено отсутствие влияния производного К-248 на фагоцитарный ответ перитонеальных макрофагов в конечной концентрации 7 мкМ и перитонеальных нейтрофилов в концентрации 20 мкМ. Показано, что производное К-248 препятствует выработке ИЛ-6 под воздействием липополисахарида (IC_{50} $17,60 \pm 18,63$ мкМ). Препятствование чрезмерной поляризации макрофагов, отсутствие влияния на врожденный бактериальный ответ подтверждают наличие благоприятного иммуотропного действия соединения. На животной модели липополисахаридиндуцированного отека задней лапы крыс (100 мкг/лапа) вещество К-248 в дозе 30 мг/кг при пероральном введении оказывало выраженную противовоспалительную активность. Выявлено, что изучаемое вещество предотвращало увеличение объема отека задней лапы животных в течение 24 часов (ΔAUC -77,4 % от группы ЛПС, $p < 0,001$) и

достоверно снижало выработку ФНО- α (-79,5 % от группы ЛПС, $p < 0,05$) и оксида азота (-49,6 % от группы ЛПС, $p < 0,01$) в плазме крови.

На пятом этапе изучено влияние соединения К-248 на процесс агрегации тромбоцитов. В качестве индукторов агрегации использовались раствор АДФ (5 мкМ) и раствор коллагена (15 мкг/мл). Вещество К-248 оказывает высокую антиагрегантную активность в обеих методиках (IC_{50} 10 и 0,79 мкМ соответственно), превосходя препарат сравнения «Кислота ацетилсалициловая» по активности (IC_{50} 104 и 49,3 мкМ) и производное К-167 в 2 раза.

На шестом этапе оценено лекарственное подобие, расчет основных фармакокинетических и токсикологических свойств соединения. По результатам прогноза, производное К-248 имеет благоприятный фармакокинетический профиль, доступно перорально и проникает внутрь клеток. Рассчитано, что изучаемое вещество относится к 4-му классу токсичности (малотоксичные). На основании прогнозирования возможно наличие гепатотоксичности и мутагенности, что дает основания при планировании доклинического изучения соединения особое внимание уделить функциональной активности печени и мутагенным свойствам, а также определению порога доз, при которых проявляются данные эффекты.

В результате проведенного исследования выявлены производные 3-арилиден-2-оксиндола К-167 и К-248, перорально доступные ингибиторы GSK3 β . Соединение К-167 оказывает выраженный антидиабетический эффект при однократном введении, влияет на многие звенья патогенеза СД2, в том числе корректирует хроническое подострое воспаление и может быть использовано для корректировки его осложнений (антиагрегантная и антитромботическая активности). Вещество К-248 имеет более выраженную противовоспалительную активность, за счет которой реализуется его антидиабетическая активность, при этом он в 2 раза активнее производного К-167 на *in vitro* моделях агрегации тромбоцитов.

Альфа-глюкозидаза – экзофермент, гидролизующий альфа-1,4-связи на нередуцирующем конце альфа-1,4-гликанов, отщепляя глюкозу в альфа-форме. Его субстратами могут служить мальтоза, мальтоолигосахариды, сахароза, амилодекстрины, амилоза, амилопектин, гликоген [Zhang и др., 2015]. Принцип действия ингибиторов альфа-глюкозидазы основывается на замедлении высвобождения глюкозы из сложных углеводов, что приводит к уменьшению постпрандиальной гипергликемии [Kumar, Sinha, 2012]. В настоящее время одобрены для клинического применения 3 лекарственных препарата, относящихся к группе конкурентных ингибиторов активного центра фермента: акарбоза, миглитол, воглибоза. Необходимость поиска новых лекарственных препаратов данного класса обуславливается

недостатками существующих [Ghani, 2015], а именно: диспепсическими расстройствами, проблемами с пищеварением, вздутием живота, диареей, гепатитом, цистидным интестинальным пневматозом. По данным Moelands и др. (2018), у группы всасываемых в ЖКТ ингибиторов альфа-глюкозидазы отмечается меньшая частота возникновения и выраженность побочных эффектов. По данным Ху Н. (2010), неконкурентные (взаимодействующие с аллостерическим центром фермента) ингибиторы альфа-глюкозидазы лучше переносятся пациентами при терапии.

Для ингибиторов альфа-глюкозидазы характерен большой спектр антидиабетических эффектов: улучшение гликемического контроля, повышение уровня инсулина, снижение толерантности к глюкозе, предотвращение снижения экспрессии GLUT4, снижение уровня гликированного гемоглобина и конечных продуктов гликирования [Hofmann и др., 2012]. Также выражено влияние на поздние осложнения сахарного диабета: предотвращение почечных изменений, замедление развития полинейропатии и снижения скорости нервной проводимости, предотвращение осложнений сердечно-сосудистой системы [Hamada и др., 1989; Hofmann и др., 2012].

In vitro изучено влияние 24 новых производных 2-оксиндола на активность альфа-глюкозидазы *S.cerevisiae*. Выявлено 6 производных [K-127, K-165, K-170(1), K-237, K-246, K-248], оказывающих большее ингибирующее влияние на альфа-глюкозидазу в конечной концентрации 100 мкМ, чем препарат сравнения «Акарбоза». Соединение K-170(1) (IC_{50} 6,78 мкМ) превосходит препарат сравнения по активности (IC_{50} 436,7 мкМ).

Проведен анализ зависимости ингибирующей активности от структуры новых производных 2-оксиндола, показано, что производные 3-арилиден-2-оксиндола оказались более перспективными и активными в сравнении с 3,3-дизамещенными-2-оксиндолами. При анализе заместителей в положении C3 (R^1) выявлено, что гетероциклические радикалы снижали, а карбоциклические радикалы с заместителем в пара-положении увеличивали ингибирующую альфа-глюкозидазу активность. Наличие амидной группировки в положении C5 (R^2 для 3-арил-2-оксиндолов и в положении R^3 для 3,3-дизамещенных-2-оксиндолов) увеличивало активность соединений. По данным Khan и др. (2014), при изучении влияния структуры производных 6-хлоро-2-оксиндолов обнаружено, что большую активность проявляют производные, содержащие карбоциклические радикалы с гидроксильными группами в пара- или метаположении при C3 (R^1), что подтверждает выявленные закономерности.

На первом этапе проведено изучение механизма взаимодействия **соединения K-170(1)** с альфа-глюкозидазой методом молекулярного докинга *in silico*. Показано, что взаимодействие исследуемого вещества с ферментом происходит в отличном от акарбозы центре связывания

[Jhong и др., 2015]. Для соединения К-170(1) выявлены ключевые аминокислоты, описывающие его связывание с аллостерическим центром фермента.

На втором этапе проведено изучение цитотоксических свойств соединения. Производное К-170(1) в конечной концентрации 20 мкМ не вызывает гибель перитонеальных макрофагов мышей и неонатальных фибробластов крыс.

На третьем этапе проведено изучение антигипергликемических свойств вещества в методике перорального теста толерантности к дисахаридам (мальтоза и сахароза). Производное 2-оксиндола К-170(1) вводилось перорально в дозе 5 мг/кг, в качестве препарата сравнения использовалась акарбоза (5 мг/кг, перорально). Согласно полученным результатам эксперимента, можно сделать вывод, что изучаемое соединение оказывает значимый антигипергликемический эффект (ΔAUC : мальтоза -42,1 %; сахароза -28,8 %; $p < 0,001$), сопоставимый с препаратом сравнения (ΔAUC : мальтоза -37,2 %; сахароза -17,9 %; $p < 0,001$). При использовании мальтозной углеводной нагрузки отмечается более выраженный эффект вещества, чем при использовании сахарозы, что может быть связано с большим влиянием исследуемого соединения на мальтазу, чем на сахаразу. Вещество К-170(1) не вызывало гипогликемического эффекта в обоих тестах.

Производное К-170(1) не оказало достоверного влияния на уровень постпрандиальной гипергликемии (ΔAUC 12,3%) в пероральном тесте толерантности к глюкозе. Согласно полученным результатам, можно сделать вывод, что вещество К-170(1) оказывает выраженную антигипергликемическую активность в тестах с дисахаридами, что объясняется его механизмом действия.

На четвертом этапе проведена оценка лекарственного подобия, расчет основных фармакокинетических и токсикологических свойств исследуемого соединения и их сравнение с применяемым в клинической практике препаратом «Акарбозой» – ингибитором альфа-глюкозидазы. По результатам прогноза можно сделать вывод, что вещество К-170(1) имеет схожий показатель лекарственного подобия с препаратом сравнения, но в отличие от акарбозы способно хорошо абсорбироваться в ЖКТ, что относит вещество К-170(1) к классу всасываемых ингибиторов α -глюкозидазы. Для данного класса отмечается меньшая частота возникновения характерных для ингибиторов альфа-глюкозидазы побочных эффектов [Kawamori и др., 2009]. На основании прогнозирования возможно наличие гепатотоксичности и мутагенности в тесте Эймса, что дает основания при планировании доклинического изучения соединения особое внимание уделить функциональной активности печени и мутагенным свойствам, а также определению порога доз, при которых проявляются данные эффекты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно результатам исследования, производные 3-арил-2-оксиндола обладают рядом фармакологически изученных эффектов: ингибирование киназы гликогенсинтазы типа 3 бета, альфа-глюкозидазы, влияние на выделение провоспалительных цитокинов при активации макрофагов липополисахаридом, а также противовоспалительной активностью.

Выявлены новые ингибиторы киназы гликогенсинтазы типа 3 бета (GSK3B) и альфа-глюкозидазы в ряду производных 2-оксиндола. При поиске производных, влияющих на активность **GSK3B**, из изученных 16 новых производных 2-оксиндола показано 4 соединения с активностью более 50 % и одно превосходящее вещество сравнения. Установлено, что уровень ингибирующей GSK3B активности увеличивался при наличии 3-арилиден-2-оксиндольного скаффолда и шестичленного ароматического цикла с гетероатомом в орто-положении или гидроксильной группой в пара-положении у C3 (R^1). По результатам проведенного изучения цитотоксичности, влияния на захват глюкозы быстропролиферирующими клетками, механизма взаимодействия соединений с ферментом и исследованных ранее противовоспалительных свойств, выявлены вещества К-167 и К-248 для проведения углубленного фармакологического изучения.

Соединение К-167 – наномолярный ингибитор GSK3B, по активности превосходящий вещество сравнения в 2 раза. На животных с моделированным СД2 вещество при однократном пероральном введении в дозе 30 мг/кг оказывает выраженный антидиабетический эффект. Данная дозировка выбрана для проведения углубленного изучения активности при курсовом введении. Соединение проявляет выраженный антидиабетический эффект с первого дня курсового введения; корректирует уровни глюкозы, инсулина, массу жировых отложений, триглицеридов, ранних медиаторов воспаления, показатели лейкоцитарной формулы крови и поведенческую активность животных. В концентрации 3 нМ исследуемое вещество предотвращает индуцированную липополисахаридом активацию макрофагов, при отсутствии влияния на фагоцитарную активность в концентрации 20 мкМ. В дозе 30 мг/кг соединение К-167 снижет объем индуцированного липополисахаридом отека задней лапы крыс, выработку ФНО- α и оксида азота. Производное 2-оксиндола К-167 подавляет индуцированную АДФ и коллагеном агрегацию тромбоцитов *in vitro*, при этом *in vivo* в дозе 30 мг/кг пролонгирует время окклюзии сонной артерии, индуцированной аппликацией 50%-го раствора хлорида железа (III), что может быть использовано для предотвращения осложнений СД2. На основании теста острой токсичности относится к нетоксичным.

Соединение К-248 ингибирует GSK3B в микромолярных концентрациях, оказывает выраженную противовоспалительную активность, улучшает захват глюкозы неонатальными

фибробластами сердца. При курсовом пероральном введении (30 мг/кг) вещество проявляет увеличивающийся со временем антидиабетический эффект, что может быть связано с высоким уровнем противовоспалительной активности; недостоверно превосходит соединение К-167 по влиянию на показатели, характеризующие развивающееся хроническое подострое воспаление (уровень ФНО- α и лейкоцитарную формулу крови); снижает уровень глюкозы, инсулина, триглицеридов, массу висцеральных жировых отложений и нормализует поведенческую активность животных на уровне вещества К-167. В конечной концентрации 3 нМ вещество К-248 препятствует индуцированной липополисахаридом активации макрофагов, при отсутствии влияния на фагоцитарную активность в концентрации 20 мкМ. При однократном пероральном введении (30 мг/кг) производное 2-оксиндола К-248 предотвращает увеличение объема, индуцированного липополисахаридом отека задней лапы крыс (ΔAUC -77,4 %), снижает выработку ФНО- α и оксида азота. Производное К-248 в 2 раза превосходит соединение К-167 по уровню антиагрегантной активности на изученных моделях агрегации тромбоцитов.

При поиске соединений, влияющих на активность **альфа-глюкозидазы**, из изученных 24 новых производных 2-оксиндола выявлено 6 производных, превосходящих препарат сравнения по активности. Установлено, что уровень, ингибирующий альфа-глюкозидазу, повышается при наличии 3-арилиден-2-оксиндольного скаффолда, карбоциклических радикалов с заместителем в пара-положении и амидной группировкой в положении C5 (R^2 для 3-арил-2-оксиндолов и в положении R^3 для 3,3-дизамещенных-2-оксиндолов), а гетероциклические радикалы в положении C3 (R^1) снижают активность. По результатам проведенного изучения цитотоксичности и механизма взаимодействия соединений с ферментом, выявлено соединение-лидер К-170(1) для проведения углубленного фармакологического изучения.

Соединение К-170(1) – микромолярный ингибитор альфа-глюкозидазы (IC_{50} 6,78 мкМ). При однократном пероральном введении (5 мг/кг) вещество оказывает выраженную антигипергликемическую активность в тесте толерантности к дисахаридам, сопоставимую с препаратом сравнения. Производное К-170(1) не активно в тесте с глюкозой, что подтверждает выявленный механизм действия. При оценке основных токсикологических, фармакокинетических и фармакодинамических показателей *in silico* показан хороший фармакокинетический профиль применения пероральных форм введения соединения, что относит его к классу всасываемых ингибиторов альфа-глюкозидазы, обладающих меньшей частотой возникновения побочных эффектов.

ВЫВОДЫ

1. Новые производные 3-арилиден-2-оксиндола ингибируют киназу гликогенсинтазы типа 3 бета (GSK3B) и альфа-глюкозидазу. Из изученных 16 новых производных 2-оксиндола в концентрации 10 мкМ выявлено 4 производных с ингибирующей GSK3B активностью более 50 % и одно соединение, превосходящее вещество сравнения SB-21673. На наличие ингибирующей альфа-глюкозидазу активности изучено 24 производных 2-оксиндола в концентрации 100 мкМ, выявлено 6 веществ, превосходящих препарат сравнения акарбозу.

2. Соединения, содержащие 3-арилиден-2-оксиндольный скаффолд, были более активными в сравнении с 3,3-дизамещенным-2-оксиндольным скаффолдом при поиске ингибиторов **GSK3B**. Шестичленный ароматический цикл с гетероатомом в орто-положении или гидроксильной группой в пара-положении у C3 (R¹) увеличивал активность веществ.

3. Производные 3-арилиден-2-оксиндола – более активные ингибиторы **альфа-глюкозидазы** в сравнении с 3,3-дизамещенным-2-оксиндолами. Гетероциклические радикалы в положении C3 (R¹) снижали, а карбоциклические радикалы с заместителем в пара-положении увеличивали ингибирующую **альфа-глюкозидазу** активность. Амидная группировка в положении C5 (R² для 3-арил-2-оксиндолов и в положении R³ для 3,3-дизамещенных-2-оксиндолов) увеличивала активность соединений.

4. Соединение **K-167** является ингибитором GSK3B (IC₅₀ 4,2 ± 0,7 нМ), по уровню активности превосходит вещество сравнения SB-216763 в 2 раза (IC₅₀ 8,4 ± 2,0 нМ). Вещество улучшает захват глюкозы неонатальными фибробластами сердца крыс в конечной концентрации 20 мкМ; при однократном пероральном введении (30 мг/кг) эквивалентно по эффективности препарату сравнения вилдаглиптину (10 мг/кг); при курсовом пероральном введении (30 мг/кг) оказывает выраженное антидиабетическое действие, начиная с первого дня введения; снижает уровни глюкозы, инсулина, триглицеридов, ранних медиаторов воспаления (ФНО-α и оксида азота), а также массу висцеральных жировых отложений; нормализует показатели лейкоцитарной формулы крови и поведенческую активность животных.

5. Вещество **K-167** предотвращает индуцированную липополисахаридом активацию макрофагов в концентрации 3 нМ; не влияет на фагоцитарную активность до конечной концентрации 20 мкМ. При однократном пероральном введении (30 мг/кг) снижает объем индуцированного липополисахаридом отека задней лапы в течение 24 ч, выработку ФНО-α и оксида азота в плазме крови.

6. Производное 2-оксиндола **K-167** подавляет индуцированную АДФ (5 мкМ) и коллагеном (15 мкг/мл) агрегацию тромбоцитов (IC₅₀ 21 и 3,02 мкМ); при пероральном

введении (30 мг/кг) пролонгирует время окклюзии сонной артерии ($+78,51 \pm 19,48 \%$), индуцированной аппликацией 50%-го раствора хлорида железа (III).

7. Соединение **K-248** ингибирует GSK3B ($4,34 \pm 0,21$ мкМ) и оказывает выраженную противовоспалительную активность на модели липополисахаридиндуцированной активации перитонеальных макрофагов; улучшает захват глюкозы неонатальными фибробластами сердца в конечной концентрации 20 мкМ. Изучаемое производное при курсовом пероральном введении (30 мг/кг) оказывает увеличивающийся со временем антидиабетический эффект, что может быть связано с высоким уровнем противовоспалительной активности. Соединение K-248 недостоверно превосходит производное K-167 по влиянию на показатели, характеризующие развивающееся хроническое подострое воспаление (уровень ФНО- α и лейкоцитарную формулы крови); при этом снижая уровень глюкозы, инсулина, триглицеридов, массу висцеральных жировых отложений и нормализуя поведенческую активность животных на уровне соединения K-167.

8. Производное 2-оксиндола **K-248** в концентрации 3 нМ препятствует индуцированной липополисахаридом активации макрофагов, не влияет на фагоцитарную активность до конечной концентрации 20 мкМ; при однократном пероральном введении (30 мг/кг) препятствует увеличению объема, индуцированного липополисахаридом отека задней лапы в течение 24 ч, снижает выработку ФНО- α и оксида азота.

9. Вещество **K-248** в 2 раза превосходит соединение K-167 по уровню антиагрегантной активности на моделях агрегации тромбоцитов, индуцируемых АДФ (5 мкМ) и коллагеном (15 мкг/мл) (IC_{50} 10 и 0,79 мкМ).

10. Производное **K-170(1)** ингибирует альфа-глюкозидазу (IC_{50} 6,78 мкМ). Установлена антигипергликемическая активность (5 мг/кг), сопоставимая с препаратом сравнения «Акарбозой» (5 мг/кг).

11. Изученные соединения **K-167**, **K-170(1)** и **K-248** не вызывали гибели неонатальных фибробластов сердца крыс в конечной концентрации 20 мкМ и первичных перитонеальных макрофагов мышей в конечной концентрации 7 мкМ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. 3-арилиден-2-оксиндол является перспективным скаффолдом для поиска соединений, влияющих на активность киназы гликогенсинтазы типа 3 бета и альфа-глюкозидазы.
2. Новые производные 2-оксиндола, вещества К-167 и К-248, подавляют индуцированный липополисахаридом синтез оксида азота и интерлейкина-6.
3. Необходимо проведение расширенных доклинических исследований ингибиторов GSK3В производных К-167, и К-248, а также ингибитора альфа-глюкозидазы соединения К-170(1).

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

ВЖД – высокожировая диета

ДМСО – диметилсульфоксид

ЛПС – липополисахарид

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

НАДН – восстановленная форма кофермента НАД

ПМ – перитонеальные макрофаги

СД2 – сахарный диабет 2-го типа

ТГ – триглицериды

ФНО- α – фактор некроза опухолей α

AUC – площадь под кривой

DIO – ожирение, индуцированное высокожировой диетой

GSK3B – киназа гликогенсинтазы 3 B

НОМА-IR – индекс инсулинорезистентности

IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования

LD₅₀ – доза, вызывающая гибель 50 % животных

STZ – стрептозотцин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Akagi Y. и др. Risk of hypoglycemia associated with repaglinide combined with clopidogrel, a retrospective cohort study // J. Pharm. Heal. Care Sci. 2020 61. 2020. Т. 6. № 1. С. 1–7.
2. Al-Karagholi M. A.-M. и др. Cerebrovascular effects of glibenclamide investigated using high-resolution magnetic resonance imaging in healthy volunteers: // <https://doi.org/10.1177/0271678X20959294>. 2020. Т. 41. № 6. С. 1328–1337.
3. Al-Kuraishy H. M. и др. Metformin and/or vildagliptin mitigate type II diabetes mellitus induced-oxidative stress: The intriguing effect // J. Adv. Pharm. Technol. Res. 2020. Т. 11. № 3. С. 142.
4. Alam M. N., Bristi N. J., Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity // Saudi Pharm. J. 2013.
5. An W. F. и др. Discovery of Potent and Highly Selective Inhibitors of GSK3b. , 2010.
6. Antunes M., Biala G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications // Cogn. Process. 2012.
7. Asghari B. и др. Flavonoids from *Salvia chloroleuca* with alpha-Amylase and alpha-Glucosidase Inhibitory Effect // Iran. J. Pharm. Res. 2015. Т. 14. № September 2013. С. 609–615.
8. Ates Bulut E. и др. Cognitive and metabolic outcomes of vildagliptin addition to the therapy in patients with type 2 diabetes mellitus: 26 week follow-up study // Arch. Gerontol. Geriatr. 2020. Т. 88. С. 104013.
9. Azim S., Baker W. L., White W. B. Evaluating Cardiovascular Safety of Novel Therapeutic Agents for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus // Curr Cardiol Rep. 2014. Т. 16. № 541.
10. Babu K. S. и др. Yeast and mammalian α -glucosidase inhibitory constituents from Himalayan rhubarb *Rheum emodi* Wall.ex Meisson // Bioorganic Med. Chem. Lett. 2004. Т. 14. № 14. С. 3841–3845.
11. Banerjee P. и др. ProTox-II: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals // Nucleic Acids Res. 2018.
12. Barry F. A. и др. Regulation of glycogen synthase kinase 3 in human platelets: A possible role in platelet function? // FEBS Lett. 2003. Т. 553. № 1–2. С. 173–178.
13. Bartoli E., Fra G. P., Schianca G. P. C. The oral glucose tolerance test (OGTT) revisited // Eur. J. Intern. Med. 2011.
14. Beurel E., Grieco S. F., Jope R. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases // Pharmacol. Ther. 2015. Т. 148. С. 114–131.
15. Beurel E., Jope R. S. Lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production is controlled by glycogen synthase kinase-3 and STAT3 in the brain // J. Neuroinflammation. 2009. Т. 6. С. 1–11.
16. Bischoff H. The mechanism of α -glucosidase inhibition in the management of diabetes //

Clinical and Investigative Medicine. , 1995. C. 303–311.

17. Bøyum A. Separation of Blood Leucocytes, Granulocytes and Lymphocytes // Tissue Antigens. 1974.

18. Cade W. T. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting // Phys. Ther. 2008.

19. Chaplin S. Rybelsus: an oral formulation of the GLP-1 agonist semaglutide // Prescriber. 2020. T. 31. № 10. C. 32–33.

20. Chaudhury A. и др. Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2017. T. 8. C. 6.

21. Chen B. и др. The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries // J. Endocrinol. 2015. T. 225. № 3. C. R83–R99.

22. Chen G. и др. Synthesis and biological evaluation of novel indole-2-one and 7-aza-2-oxindole derivatives as anti-inflammatory agents // Drug Des. Devel. Ther. 2014. T. 8. C. 1869–1892.

23. Cheng A. Y. Y., Fantus I. G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus // CMAJ. 2005.

24. Cheng F. и др. AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties // J. Chem. Inf. Model. 2012.

25. Chiasson J. L. и др. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: The STOP-NIDDM randomised trial // Lancet. 2002.

26. Cho N. H. и др. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 // Diabetes Res. Clin. Pract. 2018. T. 138.

27. Coghlan M. P. и др. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription // Chem. Biol. 2000.

28. Coleman J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation // Int. Immunopharmacol. 2001.

29. Coll A. P. и др. GDF15 mediates the effects of metformin on body weight and energy balance // Nat. 2019 5787795. 2019. T. 578. № 7795. C. 444–448.

30. Csizmadia P. MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web. , 2019.

31. Czeleń P., Szefer B. The Oxindole Derivatives, New Promising GSK-3 β Inhibitors as One of the Potential Treatments for Alzheimer's Disease—A Molecular Dynamics Approach // Biology (Basel). 2021. T. 10. № 4. C. 332.

32. Dabhi A. S., Bhatt N. R., Shah M. J. Voglibose: An alpha glucosidase inhibitor // J. Clin. Diagnostic Res. 2013.

33. Dahlgren C., Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils // J. Immunol. Methods. 1999.

34. Daina A., Michielin O., Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules // *Sci. Rep.* 2017.
35. Daniell C., Bartlett S., Siegel J. A. Effects of High-Fat Diet and Ethanol on Cognition and Behavior in Mice // *J. Young Investig.* 2013. T. 25. № 7. C. 96–100.
36. Davis F. M. и др. Palmitate-TLR4 signaling regulates the histone demethylase, JMJD3, in macrophages and impairs diabetic wound healing // *Eur. J. Immunol.* 2020. T. 50. № 12. C. 1929–1940.
37. DeFronzo R. A. и др. Pioglitazone for Diabetes Prevention in Impaired Glucose Tolerance // *N. Engl. J. Med.* 2011. T. 364. № 12. C. 1104–1115.
38. Dhokne P., Sakla A. P., Shankaraiah N. Structural insights of oxindole based kinase inhibitors as anticancer agents: Recent advances // *Eur. J. Med. Chem.* 2021. T. 216. C. 113334.
39. Diamantino T. C. и др. Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus // *Chemosphere.* 2001.
40. Dokken B. B. и др. Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: Role of glycogen synthase kinase-3 // *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 2008.
41. Domoto T. и др. Glycogen Synthase Kinase 3 β in Cancer Biology and Treatment // *Cells.* 2020. T. 9. № 6.
42. Dong J. и др. Admetlab: A platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database // *J. Cheminform.* 2018.
43. Dubey R. K. и др. Exogenous and endogenous adenosine inhibits fetal calf serum-induced growth of rat cardiac fibroblasts: Role of A(2B) receptors // *Circulation.* 1997.
44. Estevez B., Du X. New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling // *Physiology.* 2017. T. 32. № 2. C. 162–177.
45. Fiorentino T. V. и др. Pioglitazone corrects dysregulation of skeletal muscle mitochondrial proteins involved in ATP synthesis in type 2 diabetes // *Metabolism.* 2021. T. 114. C. 154416.
46. Franco Buzzetti, Maria Gabriella Brasca, Antonio Longo D. B. Hydrosoluble 3-arylidene-2-oxindole derivatives as tyrosine kinase inhibitors // 1995.
47. Furman B. L. Acarbose // *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference.* , 2007.
48. Furuta K. и др. Synthesis of 3-arylmethyl-2-oxindole derivatives and their effects on neuronal cell death // *Chem. Pharm. Bull.* 2017.
49. Ganorkar S. B. и др. Pharmaceutical Analytical Profile for Novel SGL-2 Inhibitor: Dapagliflozin // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2020.
50. Ghani U. Re-exploring promising α -glucosidase inhibitors for potential development into oral anti-diabetic drugs: Finding needle in the haystack // *Eur. J. Med. Chem.* 2015.

51. Ghosh S., Rangan L. Molecular Docking and Inhibition Kinetics of α -glucosidase Activity by Labdane Diterpenes Isolated from Tora Seeds (*Alpinia nigra* B.L. Burt.) // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014. T. 175. № 3. C. 1477–1489.
52. Ghozlan S. A. S. и др. Cytotoxic and antimicrobial evaluations of novel apoptotic and anti-angiogenic spiro cyclic 2-oxindole derivatives of 2-amino-tetrahydroquinolin-5-one // *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 2015.
53. Giorno T. B. S. и др. Central and peripheral antinociceptive activity of 3-(2-oxopropyl)-3-hydroxy-2-oxindoles // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2015. T. 135. C. 13–19.
54. Goh S. Y., Cooper M. E. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008.
55. Gollapalli M. и др. Synthesis of benzothiazole derivatives as a potent α -glucosidase inhibitor // *Bioorg. Chem.* 2019. T. 85. C. 33–48.
56. Gordon S. The macrophage: Past, present and future // *Eur. J. Immunol.* 2007.
57. Graham G. G. и др. Clinical pharmacokinetics of metformin // *Clin. Pharmacokinet.* 2011. T. 50. № 2. C. 81–98.
58. Gupta AK, Kalpana S M. J. Synthesis and in vitro antioxidant activity of new 3-substituted-2-oxindole derivatives. // *Indian J Pharm Sci.* 2012. T. 75. № 5. C. 481–486.
59. Gutmanas A. и др. PDBe: Protein data bank in Europe // *Nucleic Acids Res.* 2014.
60. HAMADA H. и др. Effet de l'Acarbose sur les diabètes chez la souris KK // *Yakuri to chiryo.* 1989. T. 17. № 9.
61. Hirata Y. и др. Novel oxindole derivatives prevent oxidative stress-induced cell death in mouse hippocampal HT22 cells // *Neuropharmacology.* 2018.
62. Hofmann F. B. и др. Handbook of Experimental Pharmacology Volume 212. , 2012.
63. Hou L. и др. Glibenclamide attenuates 2,5-hexanedione-induced neurotoxicity in the spinal cord of rats through mitigation of NLRP3 inflammasome activation, neuroinflammation and oxidative stress // *Toxicol. Lett.* 2020. T. 331. C. 152–158.
64. Hu B., Huang S., Yin L. The cytokine storm and COVID-19 // *J. Med. Virol.* 2021. T. 93. № 1. C. 250–256.
65. Hyung S. C. и др. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells // *J. Immunoass. Immunochem.* 2006.
66. Israili Z. H. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus // *Am. J. Ther.* 2011. T. 18. № 2. C. 117–152.
67. Jerala R. Structural biology of the LPS recognition // *Int. J. Med. Microbiol.* 2007.
68. Jhong C. H. и др. Screening alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitors from natural compounds by molecular docking in silico // *BioFactors.* 2015. T. 41. № 4. C. 242–251.

69. Johnson P. R., Hirsch J. Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice // *J. Lipid Res.* 1972.
70. Kaminska K. K. и др. Indolin-2-one compounds targeting thioredoxin reductase as potential anticancer drug leads // *Oncotarget.* 2016. Т. 7. № 26. С. 40233–40251.
71. Kapoor M. и др. GSK-3 β in mouse fibroblasts controls wound healing and fibrosis through an endothelin-1-dependent mechanism // *J. Clin. Invest.* 2008. Т. 118. № 10. С. 3279–3290.
72. Kaushik D., Bhandari R., Kuhad A. TLR4 as a therapeutic target for respiratory and neurological complications of SARS-CoV-2 // *Expert Opin. Ther. Targets.* 2021.
73. Kawamori R. и др. Voglibose for prevention of type 2 diabetes mellitus: a randomised, double-blind trial in Japanese individuals with impaired glucose tolerance // *Lancet.* 2009.
74. Khan K. и др. Oxindole Derivatives: Synthesis and Antiglycation Activity // *Med. Chem. (Los. Angeles).* 2013.
75. Khan M. и др. Discovery of novel oxindole derivatives as potent α -glucosidase inhibitors // *Bioorganic Med. Chem.* 2014.
76. Khanmohammadi S., Rezaei N. Role of Toll-like receptors in the pathogenesis of COVID-19 // *J. Med. Virol.* 2021. Т. 93. № 5. С. 2735–2739.
77. Kim K. M. и др. Anti-diabetic efficacy of KICG1338, a novel glycogen synthase kinase-3 β inhibitor, and its molecular characterization in animal models of type 2 diabetes and insulin resistance // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015a.
78. Kim S. J. и др. Bio-assay guided isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Diospyros lotus* // *Korean J. Pharmacogn.* 2015b. Т. 46. № 2. С. 105–108.
79. King M. R. и др. Glycogen synthase kinase-3 inhibition prevents learning deficits in diabetic mice // *J. Neurosci. Res.* 2013. Т. 91. № 4. С. 506–514.
80. Ko R., Lee S. Y. Glycogen synthase kinase 3 β in Toll-like receptor signaling // *BMB Rep.* 2016. Т. 49. № 6. С. 305–310.
81. Kobayashi H. и др. Luminol-Dependent Chemiluminescence Assay // *J. Androl.* 2001.
82. Kumar R. V., Sinha V. R. Newer insights into the drug delivery approaches of α -glucosidase inhibitors // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2012.
83. Kurz K. D., Main B. W., Sandusky G. E. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride // *Thromb. Res.* 1990.
84. Lai Y. C. и др. Triterpenes as α -glucosidase inhibitors from *Fagus hayatae* // *Phytochemistry.* 2012. Т. 74. С. 206–211.
85. Lambeir A. M., Scharpé S., Meester I. De. DPP4 inhibitors for diabetes-What next? // *Biochem. Pharmacol.* 2008. Т. 76. № 12. С. 1637–1643.
86. Leoni A. и др. 2-Indolinone a versatile scaffold for treatment of cancer: A patent review

(2008–2014) // Expert Opin. Ther. Pat. 2016. T. 26. № 2. C. 149–173.

87. Li D., August S., Woulfe D. S. GSK3 β is a negative regulator of platelet function and thrombosis // Blood. 2008.

88. Li X., Jope R. S. Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation // Neuropsychopharmacology. 2010. T. 35. № 11. C. 2143–2154.

89. Liu S. K. и др. An updated research of glycogen synthase kinase-3 β inhibitors: a review // Monatshefte fur Chemie. 2021. T. 152. № 1. C. 19–33.

90. Liu X., Yao Z. Chronic over-nutrition and dysregulation of GSK3 in diseases // Nutr. Metab. 2016.

91. Liu Z., Ma S. Recent Advances in Synthetic α -Glucosidase Inhibitors // ChemMedChem. 2017. T. 12. № 11. C. 819–829.

92. Lovestone S. и др. A phase II trial of tideglusib in alzheimer's disease // J. Alzheimer's Dis. 2015.

93. Lozinskaya N. A. и др. Synthesis and biological evaluation of 3-substituted 2-oxindole derivatives as new glycogen synthase kinase 3 β inhibitors // Bioorganic Med. Chem. 2019.

94. Lu Y. C., Yeh W. C., Ohashi P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway // Cytokine. 2008.

95. Lv Z., Guo Y. Metformin and Its Benefits for Various Diseases // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2020. T. 11.

96. Maes M. и др. New drug targets in depression: Inflammatory, cell-mediate immune, oxidative and nitrosative stress, mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. and new drug candidates-Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors // Inflammopharmacology. 2012. T. 20. № 3. C. 127–150.

97. Magrane M., Consortium U. P. UniProt Knowledgebase: A hub of integrated protein data // Database. 2011.

98. Maleki V. и др. The effect of resveratrol on advanced glycation end products in diabetes mellitus: a systematic review // Arch. Physiol. Biochem. 2020.

99. Maqbool M., Hoda N. GSK3 Inhibitors in the Therapeutic Development of Diabetes, Cancer and Neurodegeneration: Past, Present and Future // Curr. Pharm. Des. 2017.

100. Mata-Cases M. и др. Improving management of glycaemic control in people with T2DM in primary care: Estimation of the impact on the clinical complications and associated costs // BMC Health Serv. Res. 2020. T. 20. № 1. C. 803.

101. Mata R. и др. Mexican antidiabetic herbs: Valuable sources of inhibitors of α -glucosidases // J. Nat. Prod. 2013. T. 76. № 3. C. 468–483.

102. Matsuura H. и др. Isolation of α -glucosidase inhibitors from hyssop (Hyssopus officinalis)

// *Phytochemistry*. 2004. T. 65. № 1. С. 91–97.

103. Meijer L., Flajolet M., Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3 // *Trends Pharmacol. Sci.* 2004. T. 25. № 9. С. 471–480.

104. Moelands S. V. L. и др. Alpha-glucosidase inhibitors for prevention or delay of type 2 diabetes mellitus and its associated complications in people at increased risk of developing type 2 diabetes mellitus // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2018.

105. Morris G. M. и др. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility // *J. Comput. Chem.* 2009.

106. Nagle A. A. и др. 3-(2-oxoethylidene)indolin-2-one derivatives activate Nrf2 and inhibit NF- κ B: Potential candidates for chemoprevention // *ChemMedChem*. 2014. T. 9. № 8. С. 1763–1774.

107. Natoli R. и др. Gene regulation induced in the C57BL/6J mouse retina by hyperoxia: A temporal microarray study // *Mol. Vis.* 2008. T. 14. С. 1983–1994.

108. Nesi G. и др. Synthesis of novel 3,5-disubstituted-2-oxindole derivatives as antitumor agents against human nonsmall cell lung cancer // *ACS Med. Chem. Lett.* 2013.

109. Norwitz N. G. и др. Multi-loop model of Alzheimer disease: An integrated perspective on the Wnt/GSK3 β , α -synuclein, and type 3 diabetes hypotheses // *Front. Aging Neurosci.* 2019. T. 10. № JUL. С. 184.

110. OECD. Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure // *Oecd Guidel. Test. Chem.* 2001.

111. Okun E. и др. Evidence for a Developmental Role for TLR4 in Learning and Memory // *PLoS One*. 2012. T. 7. № 10. С. 1–8.

112. Padalkar V. S. и др. Synthesis and antimicrobial activity of novel 2-substituted benzimidazole, benzoxazole and benzothiazole derivatives // *Arab. J. Chem.* 2016.

113. Paeng J. и др. Enhanced glycogen synthase kinase-3 β activity mediates podocyte apoptosis under diabetic conditions // *Apoptosis*. 2014.

114. Pal D. и др. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance // *Nat. Med.* 2012. T. 18. № 8. С. 1279–1285.

115. Park S. M. и др. Tacrine, an oral acetylcholinesterase inhibitor, induced hepatic oxidative damage, which was blocked by liquiritigenin through GSK3-beta inhibition // *Biol. Pharm. Bull.* 2015.

116. Patel S. S. Cerebrovascular Complications of Diabetes: Alpha Glucosidase Inhibitor as Potential Therapy // *Horm. Metab. Res.* 2015. T. 48. № 2. С. 83–91.

117. Phukan S. и др. GSK3 β : role in therapeutic landscape and development of modulators // *Br. J. Pharmacol.* 2010. T. 160. № 1. С. 1–19.

118. Pires D. E. V., Blundell T. L., Ascher D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures // *J. Med. Chem.* 2015.

119. Raikou V., Gavriil S. Metabolic Syndrome and Chronic Renal Disease // Diseases. 2018. T. 6. № 1. C. 12.
120. Rand M. L., Leung R., Packham M. A. Platelet function assays // Transfus. Apher. Sci. 2003.
121. Reddy M. A., Zhang E., Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory // Diabetologia. 2015.
122. Rena G., Hardie D. G., Pearson E. R. The mechanisms of action of metformin // Diabetologia. 2017. T. 60. № 9. C. 1577–1585.
123. Reuter T. Y. Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes // Drug Discov. Today Dis. Model. 2007.
124. Rudrangi S. R. S. и др. Oxindoles and Their Pharmaceutical Significance- an Overview // Asian J. Res. Chem. 2011.
125. Ryu H. W. и др. Polyphenols from *Broussonetia papyrifera* displaying potent α -glucosidase inhibition // J. Agric. Food Chem. 2010. T. 58. № 1. C. 202–208.
126. S. K. S., Rahul HAZARE Sujeeth K. A. S., Arpit K. SYNTHESIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOME 3-SUBSTITUTED-2-OXINDOLE DERIVATIVES // Turk J. Pharm. 2011. T. 8. № 2. C. 169–178.
127. Sacco F. и др. Phosphoproteomics Reveals the GSK3-PDX1 Axis as a Key Pathogenic Signaling Node in Diabetic Islets // Cell Metab. 2019.
128. Sander T. и др. DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis // J. Chem. Inf. Model. 2015.
129. Santos J. M. Dos, Tewari S., Mendes R. H. The role of oxidative stress in the development of diabetes mellitus and its complications // J. Diabetes Res. 2019.
130. Scott L. J. Repaglinide: A review of its use in type 2 diabetes mellitus // Drugs. 2012. T. 72. № 2. C. 249–272.
131. Sears D. D., Kim J. J. TLR4 and insulin resistance // Gastroenterol. Res. Pract. 2010.
132. Semenya A. M., Wilson S. A. Oral Semaglutide (Rybelsus) for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus // Am. Fam. Physician. 2020. T. 102. № 10. C. 627–628.
133. Setti S. E. и др. Diet-induced obesity attenuates endotoxin-induced cognitive deficits // Physiol. Behav. 2015. T. 141. C. 1–8.
134. Shestakova M. V. и др. Diabetes and COVID-19: analysis of the clinical outcomes according to the data of the russian diabetes registry // Probl. Endokrinol. (Mosk). 2020. T. 66. № 1. C. 35–46.
135. Shi H. и др. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance // J. Clin. Invest. 2006. T. 116. № 11. C. 3015–3025.

136. Shoelson S. E., Lee J., Goldfine A. B. Inflammation and insulin resistance // *J. Clin. Invest.* 2006. T. 116. № 7. С. 1793–1801.
137. Simanenkova A. и др. Comparative evaluation of metformin and liraglutide cardioprotective effect in rats with impaired glucose tolerance // *Sci. Reports* 2021 111. 2021. T. 11. № 1. С. 1–12.
138. Singh G. и др. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of novel benzimidazole derivatives // *Comput. Biol. Chem.* 2018. T. 72. С. 45–52.
139. Spasov A. A. и др. Synthesis and biological evaluation of 2-acylbenzofuranes as novel α -glucosidase inhibitors with hypoglycemic activity // *Chem. Biol. Drug Des.* 2017.
140. Spasov A. A. и др. Synthesis, in vitro and in vivo evaluation of 2-aryl-4H-chromene and 3-aryl-1H-benzo[f]chromene derivatives as novel α -glucosidase inhibitors // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018. С. 4–11.
141. Spasov A. A. и др. Synthesis, in vitro and in vivo evaluation of 2-aryl-4H-chromene and 3-aryl-1H-benzo[f]chromene derivatives as novel α -glucosidase inhibitors // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2019. T. 29. № 1.
142. Srinivasan K. и др. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening // *Pharmacol. Res.* 2005.
143. Strekalova T. и др. Tlr4 upregulation in the brain accompanies depression- and anxiety-like behaviors induced by a high-cholesterol diet // *Brain. Behav. Immun.* 2015. T. 48. С. 42–47.
144. Studio D. Dassault Systemes BIOVIA, Discovery Studio Modelling Environment, Release 4.5 // *Accelrys Softw. Inc.* 2015.
145. Takeuchi O. и др. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components // *Immunity.* 1999.
146. Tantray M. A. и др. Synthesis of Novel Oxazolo[4,5-b]pyridine-2-one based 1,2,3-triazoles as Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors with Anti-inflammatory Potential // *Chem. Biol. Drug Des.* 2016.
147. Tao X. и др. Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced signalling associated with activation of a tyrosine phosphatase in Sprague-Dawley rats cardiac fibroblasts // *Biol. Cell.* 2014.
148. Thomas G. P. L. и др. Zymosan-induced inflammation stimulates neo-adipogenesis // *Int. J. Obes.* 2008. T. 32. № 2. С. 239–248.
149. Tkachuk V. A., Vorotnikov A. V. Molecular mechanisms of insulin resistance development // *Diabetes Mellit.* 2014. T. 17. № 2. С. 29–40.
150. Tokunaga T. и др. Structure-activity relationships of the oxindole growth hormone secretagogues // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2005. T. 15. № 7. С. 1789–1792.

151. Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading // *J. Comput. Chem.* 2009.
152. Tseng A. S., Engel F. B., Keating M. T. T. The GSK-3 Inhibitor BIO Promotes Proliferation in Mammalian Cardiomyocytes // *Chem. Biol.* 2006. T. 13. № 9. C. 957–963.
153. Ugolkov A. V. и др. 9-ING-41, a small-molecule glycogen synthase kinase-3 inhibitor, is active in neuroblastoma // *Anticancer. Drugs.* 2018. T. 29. № 8. C. 717–724.
154. Upadhyay J. и др. Pharmacotherapy of type 2 diabetes: An update // *Metabolism.* 2018.
155. Ushio-Fukai M. Localizing NADPH oxidase-derived ROS. // *Sci. STKE.* 2006. T. 2006. № 349. C. re8–re8.
156. Vazzana N. и др. Diabetes mellitus and thrombosis // *Thromb. Res.* 2012.
157. Vilim V., Wilhelm J. What do we measure by a luminol-dependent chemiluminescence of phagocytes? // *Free Radic. Biol. Med.* 1989. T. 6. № 6. C. 623–629.
158. Villarreal F. J. и др. Identification of functional angiotensin II receptors on rat cardiac fibroblasts // *Circulation.* 1993.
159. Wagman A., Johnson K., Bussiere D. Discovery and Development of GSK3 Inhibitors for the Treatment of Type 2 Diabetes // *Curr. Pharm. Des.* 2005.
160. Walsh R. N., Cummins R. A. The open-field test: A critical review // *Psychol. Bull.* 1976.
161. Wan H. и др. A study of the reproducibility of the MTT test // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1994.
162. Wang L. и др. Inhibiting glycogen synthase kinase 3 reverses obesity-induced white adipose tissue inflammation by regulating apoptosis inhibitor of macrophage/CD5L-mediated macrophage migration // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2018.
163. Watanabe H. и др. Synthesis and biological evaluation of novel oxindole derivatives for imaging neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2012.
164. Waugh J. и др. Pioglitazone: A review of its use in type 2 diabetes mellitus // *Drugs.* 2006. T. 66. № 1. C. 85–109.
165. Wei G. и др. Salidroside inhibits platelet function and thrombus formation through AKT/GSK3 β signaling pathway // *Aging (Albany, NY).* 2020. T. 12. № 9. C. 8151–8166.
166. Whitlock R. H. и др. A Safety Comparison of Metformin vs Sulfonylurea Initiation in Patients With Type 2 Diabetes and Chronic Kidney Disease: A Retrospective Cohort Study // *Mayo Clin. Proc.* 2020. T. 95. № 1. C. 90–100.
167. Wiciński M. и др. Vasculoprotective Effects of Vildagliptin. Focus on Atherogenesis // *Int. J. Mol. Sci.* 2020, Vol. 21, Page 2275. 2020. T. 21. № 7. C. 2275.
168. Wilmot E., Idris I. Early onset type 2 diabetes: risk factors, clinical impact and management. // *Ther. Adv. Chronic Dis.* 2014. T. 5. № 6. C. 234–44.

169. Wu B. и др. Screening of minor bioactive compounds from herbal medicines by in silico docking and the trace peak exposure methods // *J. Chromatogr. A*. 2016. Т. 1436. С. 91–99.
170. Wu H. и др. Breaking the vicious loop between inflammation, oxidative stress and coagulation, a novel anti-thrombus insight of nattokinase by inhibiting LPS-induced inflammation and oxidative stress // *Redox Biol.* 2020. Т. 32. № March. С. 101500.
171. Wylie G. и др. A comparative study of tenidap, a cytokine-modulating anti-rheumatic drug, and diclofenac in rheumatoid arthritis: A 24-week analysis of a 1-year clinical trial // *Rheumatology*. 1995. Т. 34. № 6. С. 554–563.
172. Xie W. и др. Isolation, structure identification and SAR studies on thiosugar sulfonium salts, neosalaprinol and neoponkoranol, as potent α -glucosidase inhibitors // *Bioorganic Med. Chem.* 2011. Т. 19. № 6. С. 2015–2022.
173. Yasuda D. и др. Antioxidant activities of 5-hydroxyoxindole and its 3-hydroxy-3-phenacyl derivatives: The suppression of lipid peroxidation and intracellular oxidative stress // *Bioorganic Med. Chem.* 2013.
174. Yi H. и др. Characterization of Wnt signaling during photoreceptor degeneration // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007. Т. 48. № 12. С. 5733–5741.
175. Yin Z. и др. Ambient fine particles (PM_{2.5}) attenuate collagen-induced platelet activation through interference of the PLC γ 2/Akt/GSK3 β signaling pathway // *Environ. Toxicol.* 2017. Т. 32. № 2. С. 530–540.
176. Yoshikawa M. и др. Design and synthesis of a novel 2-oxindole scaffold as a highly potent and brain-penetrant phosphodiesterase 10A inhibitor // *Bioorganic Med. Chem.* 2015.
177. Zhang H. и др. Inhibitory properties of aqueous ethanol extracts of propolis on α -glucosidase // *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2015. Т. 2015.
178. Zhao B. и др. Protective effects of acarbose against insulinitis in multiple low-dose streptozotocin-induced diabetic mice // *Life Sci.* 2020. Т. 263. С. 118490.
179. Zhou Y. и др. Pioglitazone for the Primary and Secondary Prevention of Cardiovascular and Renal Outcomes in Patients with or at High Risk of Type 2 Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2020. Т. 105. № 5. С. 1670–1681.
180. Zyuz'kov G. N. и др. Role of NF- κ B/IKK-Dependent Signaling in Functional Stimulation of Mesenchymal Progenitor Cells by Alkaloid Songorine // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015. Т. 158. № 5. С. 624–627.
181. Аметов, А. С. Сахарный диабет: нужны кардинальные перемены! [Текст] / А. С. Аметов // *Эндокринология*. – 2020. – Т. 9, № 1. – С. 8–10.
182. Дедов, И. И. Сахарный диабет 2 типа у взрослых [Текст] / И. И. Дедов, М. В. Шестакова, А. Ю. Майоров [и др.]. // *Сахарный диабет*. – 2020. – Т. 23, № 2S. – С. 4–102.

183. Зефирова, О. Н. Медицинская химия (MEDICINAL CHEMISTRY). II. Методологические основы создания лекарственных препаратов / О. Н. Зефирова, Н. С. Зефирова // ВМУ. – Химия. – 2000. – Т. 41, № 2. – С. 103–108.

184. Куркин, Д. В. Система инкретинов как перспективная фармакологическая мишень для сахароснижающей терапии / Д. В. Куркин, Е. В. Волотова, Д. А. Бакулин [и др.] // Фарматека. – 2016. – № 5 (318). – С. 45–50.

185. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (часть 1) / под ред. А. Н. Миронова, Н. Д. Бунатян, А. Н. Васильев [и др.]. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

186. Петров, В. И. Терапия больных с сахарным диабетом 2-го типа / В. И. Петров, Н. В. Рогова, Д. О. Михайлова // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2010. – Т. 1, № 33. – С. 28–32.

187. Петров, В. И. Фундаментальные основы поиска лекарственных средств для терапии сахарного диабета 2-го типа / В. И. Петров, А. А. Спасов, Н. И. Чепляева, К. В. Ленская // Вестник РАМН. – 2013. – Т. 68, № 2. – С. 43–49.

188. Середенин, С. Б. Патент РФ 2597848. Средство для профилактики и лечения диабета / С. Б. Середенин, Р. У. Островская, Т. А. Воронина // Заявл. 12.03.2013; опубл. 20.09.2016. – 17 с.

189. Тюренков, И. Н. Гипогликемическая активность новых агонистов рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 / И. Н. Тюренков, Д. В. Куркин, Д. А. Бакулин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т. 83, № 2. – С. 27–33.