

**КЛОЧКОВ ВЛАДЛЕН ГЕННАДИЕВИЧ**

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ  
ПРОИЗВОДНЫХ 2-ОКСИНДОЛА**

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

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

**Научный руководитель:**

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

**Спасов Александр Алексеевич**

**Официальные оппоненты:**

Заведующий кафедрой фармацевтической химии, фармакогнозии  
и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной  
медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова», доктор фармацевтических наук,  
профессор

**Каленикова Елена Игоревна**

Заведующий кафедрой фармакологии и клинической  
фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный  
исследовательский университет» Минобрнауки РФ,  
доктор медицинских наук, профессор

**Покровский Михаил Владимирович**

**Ведущее учреждение:** Федеральное государственное бюджетное научное  
учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр  
Российской академии наук», г. Томск

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г. в \_\_\_\_ ч. на заседании  
диссертационного совета 21.2.005.02 ФГБОУ ВО «Волгоградский  
государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу  
400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ([www.volgmed.ru](http://www.volgmed.ru))  
ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»  
Минздрава России

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

**Любовь Ивановна Бугаева**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

**Актуальность темы.** 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 (Cho и др., 2019). При этом половина из них имеют недиагностированный или скрытый СД2. Заболевание характеризуется прогрессивным течением инсулинорезистентности (Ткачук, Воротников, 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 (Шетакова 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. и др. 2016). При этом большое разнообразие разработанных классов противодиабетических препаратов, к сожалению, не обеспечивает все необходимые потребности здравоохранения (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 (Дедов и др., 2020; Тюренков И. Н. и др., 2020).

2-оксиндолный 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 (Лозинская и др., 2019) свойства.

Перспективными направлениями поиска новых антидиабетических средств среди изучаемых производных 2-оксиндола являются ингибирование киназы гликогенсинтазы типа 3 бета или 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 поиска новых антидиабетических средств. При этом наличие большого спектра плеiotропных активностей показывает их возможную 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 путь 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, влияющий на развитие поздних 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.** В клинической практике 11 классов лекарственных препаратов, новые группы находятся на различных этапах клинических исследований, 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). Клинические исследования ингибиторов GSK3B проводились для лечения болезни Альцгеймера, мышечной дистрофии и 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 со стороны желудочно-кишечного тракта данная группа препаратов не имеет широкого применения в клинической практике. 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 (Kim, 2004).

**Целью исследования** является поиск и изучение фармакологических свойств новых производных 2-оксиндола ингибирующих киназу гликогенситазы типа 3 бета или альфа-глюкозидазу. Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Провести экспериментальный поиск *in vitro* ингибиторов киназы гликогенситазы типа 3 бета (GSK3B) или 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 (ЛПС).

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 снижение развития 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», индуцированный липополисахаридом). Данная активность подтверждена в исследованиях *in vivo* при отеке лапы крысы индуцированным ЛПС.

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.

**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 высокожировой диете (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 (ONHRP), протокол № 2021/042 от 29 апреля 2021 года.

#### **Положения, выдвигаемые на защиту:**

1. Новые производные 3-арилиден-2-оксиндола ингибируют киназу гликогенсинтазу типа 3 бета (GSK3B) и (или) 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 К-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. Производные 2-оксиндола соединения К-167 и К-248 подавляют индуцированную липополисахаридом выработку оксида азота и интерлейкина-6 макрофагами.
5. Соединение К-170(1) ингибирует альфа-глюкозидазу (IC<sub>50</sub> 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 К-167, К-170(1) и К-248 не вызывали гибели неонатальных фибробластов сердца крыс и первичных перитонеальных макрофагов мышей в средних микромолярных концентрациях. Соединение К-167 относится к 5-му классу токсичности при пероральном введении мышам.

**Внедрение результатов исследования.** Разработанная методология углублённого изучения потенциальных противодиабетических препаратов включена в

материалы кафедр фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ; фармакологии и фармации Института НМФО ВолгГМУ; фармацевтической и токсикологической химии ВолгГМУ; лабораторий отдела фармакологии Волгоградского медицинского научного центра. 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).

**Достоверность научных положений.** 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.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 4 в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 3 в журналах, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени и получен 1 патент на изобретение.

**Апробация работы.** 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).

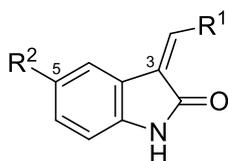
**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 176 страницах машинописного текста и состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, перечня сокращений и условных обозначений и списка литературы. Работа иллюстрирована 82 рисунками и 23 таблицами. Библиографический указатель включает 189 источников, из них 15 отечественных, 174 иностранных.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

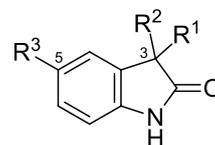
**В первой главе** показана проблематика вопроса фармакотерапии и развития сахарного диабета 2 типа. Описаны основные характерные для 2-оксиндольного скаффолда фармакологические свойства. Выявлено вероятное влияние изучаемых производных на активность киназы гликогенсинтазы типа 3 бета и альфа-глюкозидазу. Для данных ферментов систематизированы основные функции в организме человека и эффекты, вызываемые их ингибиторами.

**Во второй главе** диссертации описаны материалы и методы работы. Изучено 27 новых производных под лабораторными шифрами «К» и «ОИР», 20 из которых относятся к производным 3-арилиден-2-оксиндола, 7 соединений – к производным 3,3-дизамещённых-2-оксиндолов\*.

### 3-арилиден-2-оксиндолы



### 3,3-дизамещённые-2-оксиндолы



Описан *in vitro* поиск ингибиторов киназы гликогенсинтазы типа 3 в методиках изучения влияния на активность человеческого рекомбинантного фермента и синтез оксида азота перитонеальными макрофагами мышей под влиянием липополисахарида, а также поиск ингибиторов альфа-глюкозидазы в методике изучения влияния на активность альфа-глюкозидазы *S. cerevisiae*. Определена зависимость активности изучаемых соединений от химической структуры. Для выявленных соединений-лидеров построены модели связывания с ферментами, определены активные центры и ключевые аминокислоты, а также определена их цитотоксичность на первичных клеточных линиях животных в МТТ- и ЛДГ-тестах, оценено лекарственное подобие, основные фармакокинетические и токсикологические свойства *in silico*.

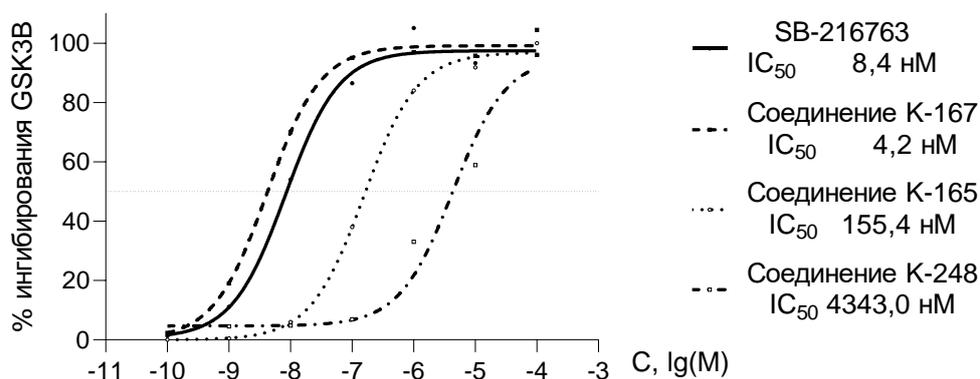
Для соединений, ингибирующих активность GSK3B, изучена их антидиабетическая активность в методиках определения влияния на утилизацию глюкозы фибробластами крыс, на уровень постпрандиальной гипергликемии в пероральном тесте толерантности к глюкозе при однократном введении и на показатели углеводного обмена, воспалительный статус и поведенческую активность животных с моделированным сахарным диабетом 2 типа; противовоспалительная активность в методиках изучения влияния на липополисахаридиндуцированный отек задней лапы крыс, активацию, фагоцитарную активность и зимозанопосредованную хемилюминисценцию перитонеальных макрофагов; антиагрегантная активность *in vitro* с использованием АДФ и коллагена в качестве индукторов агрегации тромбоцитов; антитромботическая активность в методике изучения влияния соединений на время окклюзии сонной артерии индуцированного аппликацией 50%-го раствора хлорида железа (III) интактным крысам.

---

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

Соединение, ингибирующее альфа-глюкозидазу, изучено на наличие антигипергликемической активности в пероральном тесте толерантности к дисахаридам (мальтоза, сахароза) и моносахаридам (глюкоза) на интактных крысах.

В третьей главе приведены результаты *in vitro* исследования влияния 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-NO<sub>2</sub>-2). Вещество K-167 (IC<sub>50</sub> 4,2 нМ) в два раза превосходит по активности вещество сравнения (IC<sub>50</sub> 8,4 нМ).



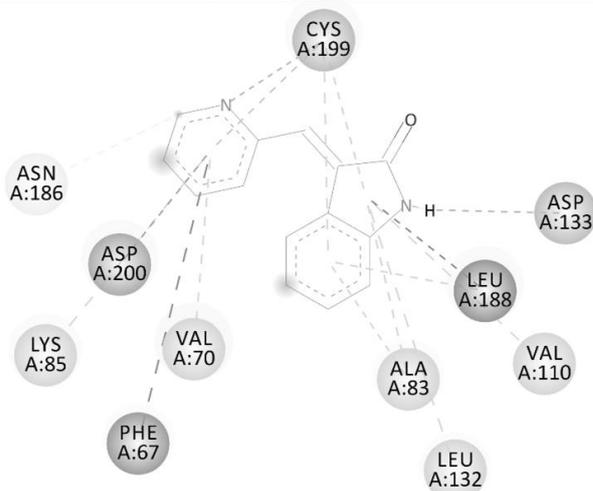
**Рисунок 1.** Влияние соединений K-167, K-165, K-248 и SB-216763 в зависимости от концентрации на активность GSK3B

В предварительно проведенных исследованиях по изучению влияния на липополисахаридиндуцированный синтез оксида азота перитонеальными макрофагами мышей выявлено соединение K-248, оказывающее наибольший противовоспалительный эффект в ряду исследованных производных 2-оксиндола (IC<sub>50</sub> 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, Jore, 2009), в связи с чем данная методика может быть использована для поиска ингибиторов GSK3B, способных проникать внутрь клеток.

Проведен анализ зависимости ингибирующей активности от структуры новых производных 2-оксиндола. Выявлено, что производные 3-арилден-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-арилден-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 (R<sup>1</sup>) показано, что наличие шестичленного ароматического цикла с гетероатомом в орто-положении или гидроксильной группой в пара-положении повышало ингибирующую GSK3B активность.

Вещества K-167 и K-248 были выбраны для углубленного изучения фармакологических свойств.

**Соединение К-167.** Проведено *in silico* исследование механизма действия вещества, обнаружено, что взаимодействие происходит в АТФ-связывающем сайте фермента. По данным (An и др., 2010) установлено, что такое же взаимодействие характерно для вещества сравнения. Выявлены ключевые аминокислоты, обуславливающие взаимодействие изучаемого соединения, и вещества сравнения с активным центром фермента: VAL70, ALA83, CYS199 и LEU188.

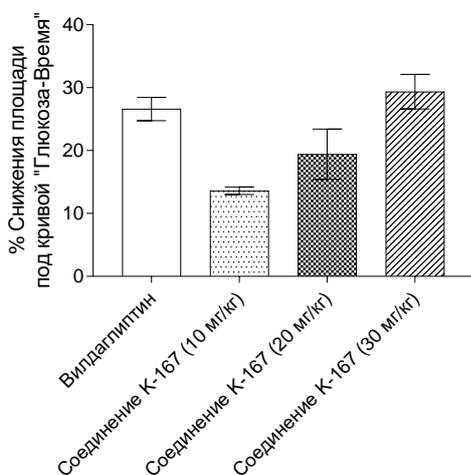


**Рисунок 2.** Межмолекулярные взаимодействия соединения К-167 и АТФ-связывающего центра GSK3В

Исследована цитотоксичность, 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.

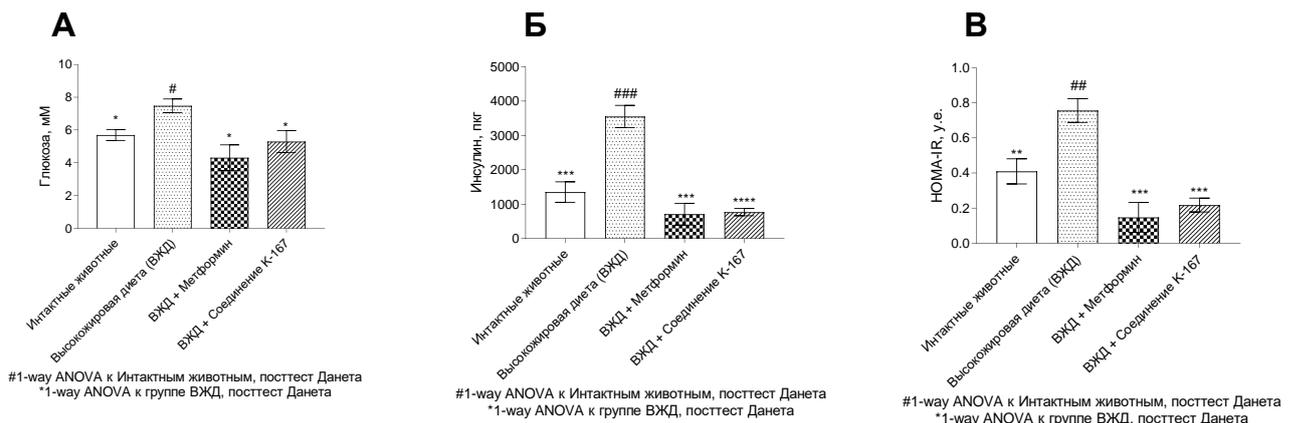
Активность в наномолярном диапазоне концентраций при цитотоксичности в микромолярном диапазоне позволяет сделать вывод о широком терапевтическом индексе вещества.



**Рисунок 3.** 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 ( $M \pm m$ )

Изучено влияние вещества К-167 на уровень постпрандиальной гипергликемии в пероральном тесте толерантности к глюкозе при однократном введении крысам с моделированным СД2. Данное производное испытывалось в 3 дозах: 10, 20 и 30 мг/кг. Показано, 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.

Изучено влияние соединения при курсовом пероральном введении в течение 90 дней мышам линии c57bl/6j с развитым СД2. 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 (на 29,1%,  $p < 0,05$ ) и инсулина (на 78,3%,  $p < 0,0001$ ) плазмы крови относительно группы ВЖД, благодаря чему не было выявлено признаков инсулинорезистентности у опытной группы животных (снижение индекса инсулинорезистентности на 71,2%,  $p < 0,001$ ).

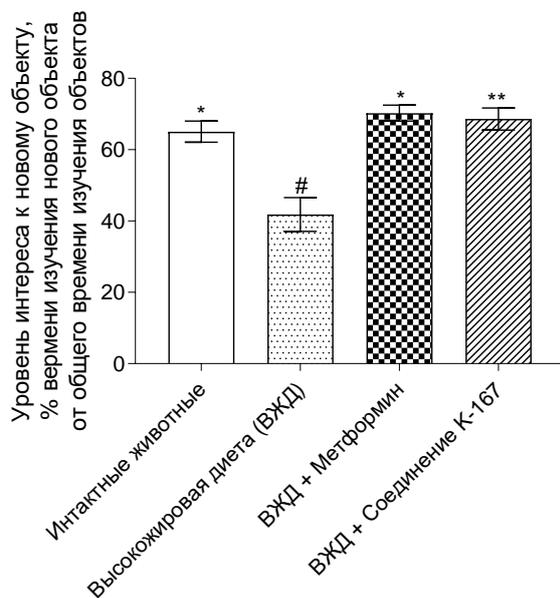


**Рисунок 4.** Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень глюкозы (А) и инсулина (Б) плазмы крови, а также рассчитанный показатель инсулинорезистентности НОМА-IR (В) животных с СД2 ( $M \pm m$ )

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 на 33,54%, эпидидимальных на 34,9% и ретроперитонеальных на 36,9% относительно группы ВЖД;  $p < 0,01$ ). Исследуемое вещество нормализовало уровень триглицеридов печени (снижение на 24,1% от группы ВЖД,  $p < 0,05$ ).

Производное К-167 оказывало противовоспалительное действие, что выражалось в нормализации показателей лейкоцитарной формулы крови (снижение количества сегментоядерных нейтрофилов на 38% и повышение числа лимфоцитов на 21,5% от группы ВЖД,  $p < 0,0001$ ), а также уровней ранних медиаторов воспаления (ФНО- $\alpha$  на 39,4% и оксида азота на 59,3% относительно группы ВЖД,  $p < 0,05$ ); оказывало благоприятное влияние на антирадикальную систему организма: снижение уровня ТБК-

активных продуктов печени (на 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 ( $p < 0,05$ ).



#1-way ANOVA к Интактным животным, посттест Дана  
\*1-way ANOVA группе ВЖД, посттест Дана

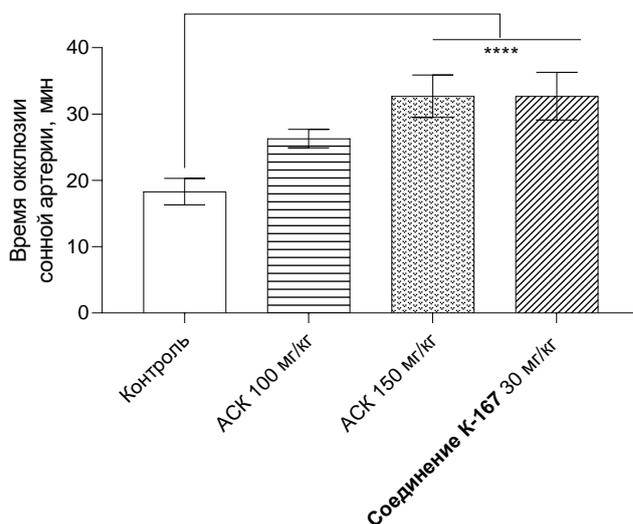
**Рисунок 5.** Влияние соединения К-167 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень интереса к новому объекту в тесте «Распознавание нового объекта» у животных с СД2 ( $M \pm m$ )

Соединение К-167 препятствовало развитию поведенческих изменений под воздействием ВЖД, что показано по нормализации результатов тестов «Открытое поле» и «Распознавание нового объекта».

Совокупность выявленных эффектов при курсовом введении соединения К-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.

На клеточной модели *in vitro* в биохимических исследованиях выявлено, что производное К-167 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 К-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 К-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 ( $\Delta AUC$  63,2% от группы ЛПС,  $p < 0,05$ ), достоверное снижение выработки ФНО- $\alpha$  (на 90,9% от группы ЛПС,  $p < 0,05$ ) и

оксида азота (на 57,1% от группы ЛПС,  $p < 0,01$ ) в плазме крови. По результатам исследований подтверждено влияние соединения на сигнальный путь Toll-рецепторов, что может быть использовано для предотвращения прогрессирования подострого воспаления и инсулинорезистентности при СД2.



**Рисунок 6.** Влияние соединения К-167 и ацетилсалициловой кислоты на время окклюзии сонной артерии, индуцированной аппликацией 50%-м раствором хлорида железа (III) интактным животным ( $M \pm m$ )

1-way ANOVA к группе Контроль, посттест Данета

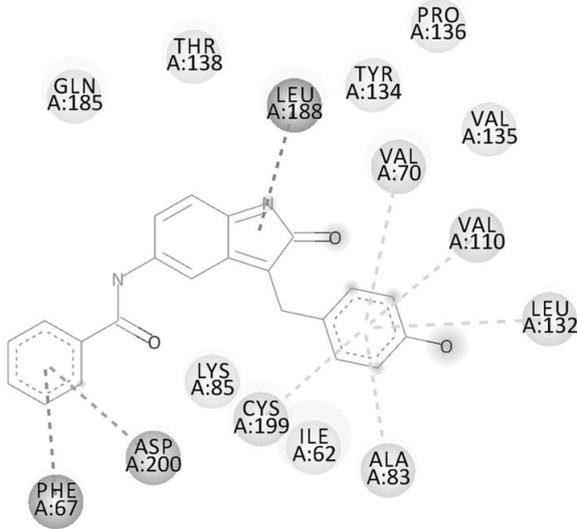
Для изучения антиагрегантной активности использовались две методики, различающиеся индукторами агрегации. В методике с использованием АДФ (5 мкМ) соединение проявило высокий уровень активности ( $IC_{50}$  21 мкМ соответственно) относительно препарата сравнения кислоты ацетилсалициловой ( $IC_{50}$  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%-ым раствором хлорида железа (III). Исследуемое вещество вводилось перорально в дозе 30 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовалась кислота ацетилсалициловая в различных дозировках. 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.

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.

Изучаемое вещество К-167 при пероральном введении мышам не проявило признаков острой токсичности в дозе 2 г/кг, выживаемость животных через 2 недели

после введения составила 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. Сайт-связывания соответствует активному центру связывания препарата сравнения, описанного по данным (An и др., 2010). Выявлены ключевые аминокислоты, обуславливающие взаимодействие изучаемого соединения и вещества сравнения с активным центром фермента: VAL70, ALA83, CYS199 и LEU188.

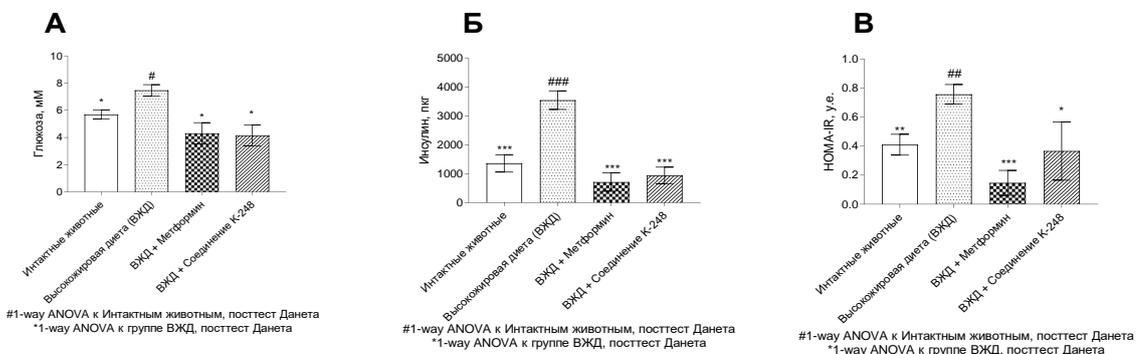


**Рисунок 7.** Межмолекулярные взаимодействия соединения К-248 и АТФ-связывающего центра GSK3B

Соединения К-248 в конечной концентрации 7 мкМ не влияет, а в концентрации 50 мкМ оказывает цитотоксическое действие на линию перитонеальных макрофагов мышей. 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 GSK3B, 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.

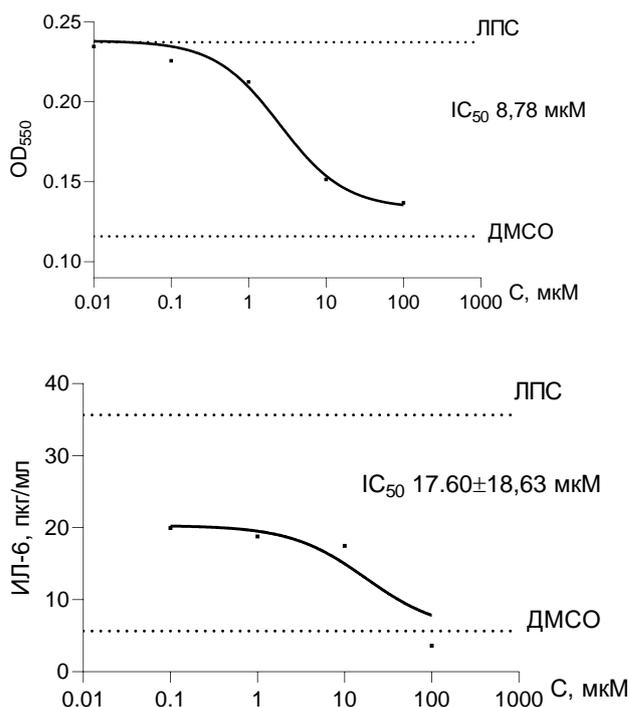


**Рисунок 8.** Влияние соединения К-248 (30 мг/кг) и метформина (100 мг/кг) на уровень глюкозы (А) и инсулина (Б) плазмы крови, а также рассчитанный показатель инсулинорезистентности HOMA-IR (В) животных с СД2 (M ± m)

Изучено влияние соединения К-248 при курсовом пероральном введении в течение 90 дней в дозе 30 мг/кг мышам линии c57bl\6j с развитым СД2. В качестве препарата сравнения использовался метформин (100 мг/кг). В отличие от производного 2-оксиндола К-167, вещество К-248 не оказало влияния на уровень постпрандиальной гипергликемии при первичном однократном введении вещества ( $\Delta$ AUC 5,6%), однако значительно снижало его в тестах на 45-й и 90-й дни курсового введения ( $\Delta$ 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 на 51,6%,  $p < 0,05$ ).

Вещество не влияет на массу животных, однако показано значимое снижение массы всех исследованных типов абдоминальных жировых отложений: мезентериальных на 34,3%, ретроперитонеальных на 39,1% и эпидидимальных на 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- $\alpha$  на 46,6% и оксида азота на 25,8% от группы ВЖД,  $p < 0,05$ ) и показатели лейкоцитарной формулы крови животных (снижение количества сегментоядерных нейтрофилов на 46,6% и повышение числа лимфоцитов на 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 на 70,7% ( $p < 0,05$ ) от группы ВЖД, при отсутствии достоверного влияния на количество восстановленного глутатиона печени в отличие от соединения К-167.

Производное К-248 на клеточной модели *in vitro* 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. 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. Изучаемое соединение предотвращало увеличение объема отека задней лапы животных в течение 24 часов ( $\Delta$ AUC 77,4% от группы ЛПС,  $p < 0,001$ ) и достоверно снижало выработку ФНО- $\alpha$  (на 79,5% от группы ЛПС,  $p < 0,05$ ) и оксида азота (на 49,6% от группы ЛПС,  $p < 0,01$ ) в плазме крови.



**Рисунок 9.** Влияние соединения К-248 на выработку оксида азота и ИЛ-6 перитонеальными макрофагами под воздействием липополисахарида.

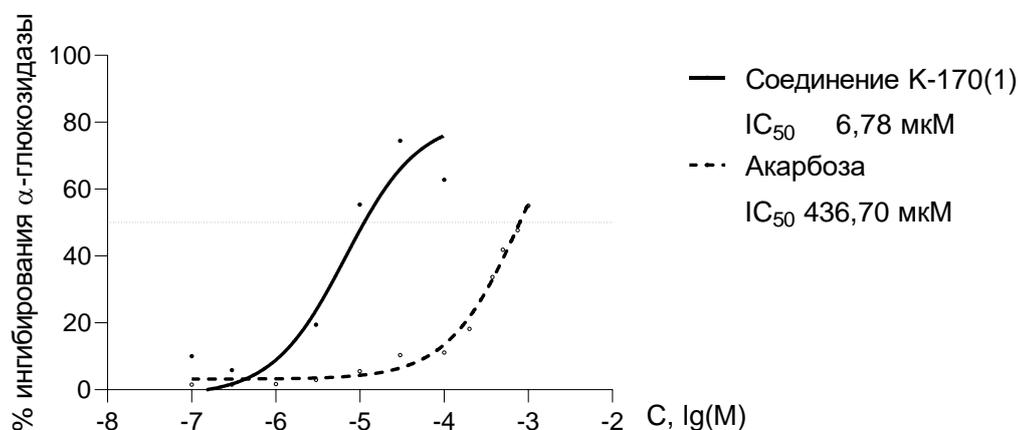
Изучено влияние соединения К-248 на процесс агрегации тромбоцитов с использованием индукторов агрегации раствора АДФ (5 мкМ) и раствора коллагена (15 мкг/мл). Вещество К-248 оказывает высокую антиагрегантную активность в обеих методиках (IC<sub>50</sub> 10 и 0,79 мкМ соответственно), превосходя препарат сравнения «Кислота ацетилсалициловая» по активности (IC<sub>50</sub> 104 и 49,3 мкМ) и производное К-167 в 2 раза.

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 GSK3β. 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.

**В четвертой главе** приведены результаты *In vitro* изучения влияния 24 новых производных 2-оксиндола на активность альфа-глюкозидазы *S.cerevisiae*. Выявлено 6 производных (К-127, К-165, К-170(1), К-237, К-246, К-248), оказывающих большее

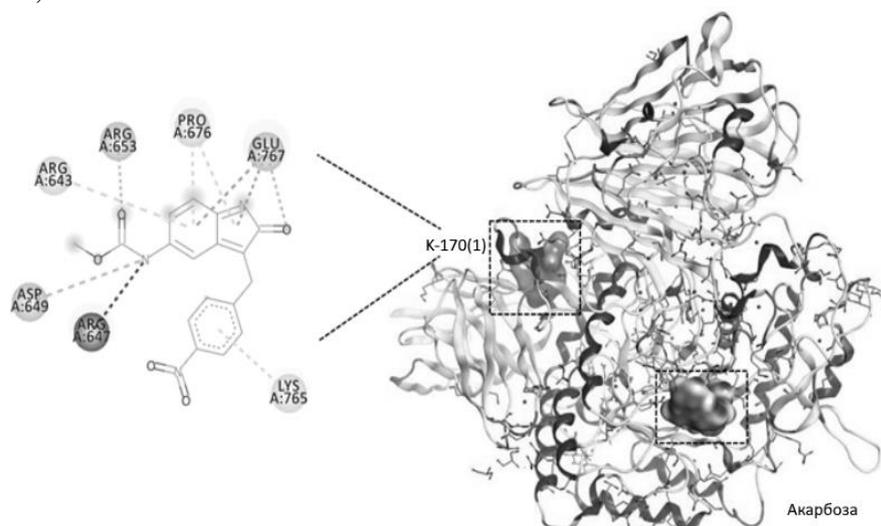
ингибирующее влияние на альфа-глюкозидазу в конечной концентрации 100 мкМ, чем препарат сравнения «Акарбоза». Соединение К-170(1) ( $IC_{50}$  6,78 мкМ) превосходит препарат сравнения по активности ( $IC_{50}$  436,7 мкМ).



**Рисунок 10.** Влияние соединения К-170(1) и акарбозы в зависимости от концентрации на активность  $\alpha$ -глюкозидазы

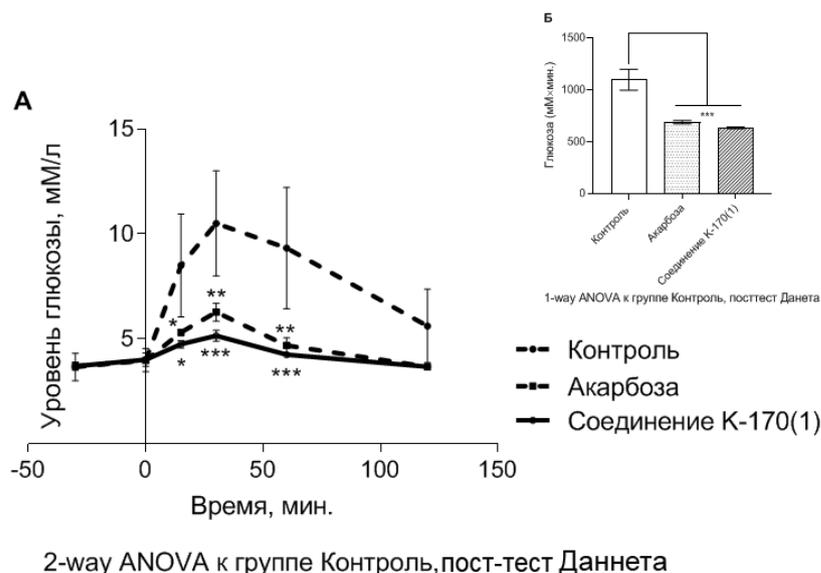
Анализ зависимости ингибирующей активности от структуры новых производных 2-оксиндола показал, что производные 3-арилден-2-оксиндола оказались более перспективными и активными в сравнении с 3,3-дизамещенными-2-оксиндолами. При анализе заместителей в положении С3 ( $R^1$ ) выявлено, что гетероциклические радикалы снижали, а карбоциклические радикалы с заместителем в пара-положении увеличивали ингибирующую альфа-глюкозидазу активность. Наличие амидной группировки в положении С5 ( $R^2$  для 3-арил-2-оксиндолов и в положении  $R^3$  для 3,3-дизамещенных-2-оксиндолов) увеличивало активность соединений.

**Соединение К-170(1)** взаимодействует с альфа-глюкозидазой в отличном от акарбозы центре связывания, что выявлено методом молекулярного докинга *in silico*. Для соединения К-170(1) выявлены ключевые аминокислоты, описывающие его связывание с аллостерическим центром фермента: ASP649, ARG653, GLU767, ARG643, PRO676, LYS765, GLU767.



**Рисунок 11.** Расположение сайтов связывания акарбозы и соединения К-170(1) с  $\alpha$ -глюкозидазой.

Производное К-170(1) в конечной концентрации 20 мкМ не вызывает гибель перитонеальных макрофагов мышей и неонатальных фибробластов крыс.



**Рисунок 9.** 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) ( $M \pm m$ )

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). Соединение оказывает значимый антигипергликемический эффект ( $\Delta AUC$ : мальтоза 42,1%; сахароза 28,8%;  $p < 0,001$ ), сопоставимый с препаратом сравнения ( $\Delta AUC$ : 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 ( $\Delta AUC$  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.

Оценено лекарственное подобие и рассчитаны основные фармакокинетических и токсикологических свойства исследуемого соединения в сравнении 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  $\alpha$ -глюкозидазы. Для данного класса отмечается меньшая частота возникновения характерных для ингибиторов альфа-глюкозидазы побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта (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 или 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 (R1). 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** – нанолярный 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- $\alpha$  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 микролярных 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- $\alpha$  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 ( $\Delta AUC$  77,4%), снижает выработку ФНО- $\alpha$  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 С5 ( $R^2$  для 3-арил-2-оксиндолов и в положении  $R^3$  для 3,3-дизамещенных-2-оксиндолов), а гетероциклические радикалы в положении С3 ( $R^1$ ) 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 С3 ( $R^1$ ) увеличивал активность веществ.

3. Производные 3-арилиден-2-оксиндола – более активные ингибиторы **альфа-глюкозидазы** в сравнении с 3,3-дизамещенными-2-оксиндолами. Гетероциклические радикалы в положении С3 ( $R^1$ ) снижали, а карбоциклические радикалы с заместителем в пара-положении увеличивали ингибирующую **альфа-глюкозидазу** активность. Амидная группировка в положении С5 ( $R^2$  для 3-арил-2-

оксиндолов и в положении R<sup>3</sup> для 3,3-дизамещенных-2-оксиндолов) увеличивала активность соединений.

4. Соединение **K-167** является ингибитором GSK3B (IC<sub>50</sub> 4,2 ± 0,7 нМ), по уровню активности превосходит вещество сравнения SB-216763 в 2 раза (IC<sub>50</sub> 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, а также 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 (IC<sub>50</sub> 21 и 3,02 мкМ); при пероральном введении (30 мг/кг) пролонгирует время окклюзии сонной артерии (78,51 ± 19,48%), индуцированной аппликацией 50%-го раствора хлорида железа (III).

7. Соединение **K-248** ингибирует GSK3B (4,34 ± 0,21 мкМ) и оказывает выраженную противовоспалительную активность на модели липополисахаридиндуцированной активации перитонеальных макрофагов; улучшает захват глюкозы из среды 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<sub>50</sub> 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, альфа-глюкозидазы.

2. Новые производные 2-оксиндола, вещества K-167 и K-248, подавляют индуцированный липополисахаридом синтез оксида азота и интерлейкина-6.

3. Необходимо проведение расширенных доклинических исследований ингибиторов GSK3 $\beta$  производных K-167 и K-248, а также ингибитора альфа-глюкозидазы соединения K-170(1).

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных Минобрнауки РФ

1. **Klochkov V.G.**, Bezsonova E.N., Dubar M., Melekhina D.D., Temnov V.V., Zaryanova E.V., Lozinskaya N.A., Spasov A.A. Towards multi-target antidiabetic agents: In vitro and in vivo evaluation of 3, 5-disubstituted indolin-2-one derivatives as novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitors //Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2022. – Т. 55. – С. 128449.

2. Spasov A. A., Babkov D. A., Osipov D. V., **Klochkov V. G.**, Prilepskaya D. R., Demidov M. R., Osyanin V. A., Klimochkin Y. N. Synthesis, in vitro and in vivo evaluation of 2-aryl-4H-chromene and 3-aryl-1H-benzo [f] chromene derivatives as novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitors //Bioorganic & medicinal chemistry letters. – 2019. – Т. 29. – №. 1. – С. 119-123.

3. Vassiliev P. M., Spasov A. A., Yanaliyeva L. R., Kochetkov A. N., Vorfolomeyeva V. V., **Klochkov V. G.**, Appazova D. T. Neural network modeling of the multitarget rage inhibitory activity //Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2019. – Т. 13. – №. 3. – С. 256-263.

4. Лозинская Н.А., Зарянова Е.В., Бабков Д.А., **Клочков В.Г.**, Спасов А.А., Ефремов А.М., Безсонова Е.М., Цымляков М.Д. // Патент № 2734495 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/404, А61К 31/4178, А61К 31/422. Способ лечения сахарного диабета: № 2019128937: заявл. 13.09.2019: опубл. 19.10.2020. Заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ).

### Статьи в журналах и сборниках материалов конференций

1. Васильев П.М., Яналиева Л.Р., Кочетков А.Н., Ворфоломеева В.В., **Клочков В.Г.** База данных 3D-моделей релевантных белков-мишеней сигнального пути RAGE-NF- $\kappa$ B. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2018. – № 3(67). – С. 133-138.
2. Кочетков А.Н., Яналиева Л.Р., Васильев П.М., **Клочков В.Г.** Биомишени сигнальных путей RAGE – NF- $\kappa$ B // Сборник материалов XXV Российского национального конгресса «Человек и лекарство» –2018. – С. 73.
3. **Клочков В.Г.**, Бабков Д.А. Новые ингибиторы  $\alpha$ -глюкозидазы фенилхроменового ряда // Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых, посвященной 95-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина "Достижения современной фармакологической науки – 2018. – С. 59-60.
4. **Клочков В.Г.** База данных референсных лигандов сигнальных белков AGE-рецепторов // Материалы 76-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов –2018. – С. 401.
5. Васильев П.М., Спасов А.А., Яналиева Л.Р., Кочетков А.Н., Ворфоломеева В.В., **Клочков В.Г.**, Аппазова Д.Т. Нейросетевое моделирование мультитаргетной RAGE-ингибирующей активности // Биомедицинская химия. – 2019. – Т. 65. – № 2. – С. 91-98.
6. **Клочков В.Г.** Оценка антигипергликемической и противовоспалительной активности нового ингибитора GSK3 $\beta$  // XXIV Региональная конференция молодых ученых и исследователей Волгоградской области: Материалы докладов– 2019.–С.99-101
7. Пешкурова И.А., Киктева О.С., **Клочков В.Г.** Изучение антигипергликемической активности нового производного 2-оксиндола - ингибитора  $\alpha$ -глюкозидазы // Материалы 78-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов –2020. – С. 242.
8. Киктева О.С., Пешкурова И.А., **Клочков В.Г.** Изучение противовоспалительной активности 2-оксиндольных ингибиторов GSK3 $\beta$  // Материалы 78-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов – 2020. – С. 239.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВЖД – высокожировая диета  
 ЛПС – липополисахарид  
 СД2 – сахарный диабет 2-го типа  
 ФНО- $\alpha$  – фактор некроза опухолей  $\alpha$   
 AUC – площадь под кривой  
 GSK3 $\beta$  – киназа гликогенсинтазы 3 Б

**КЛОЧКОВ ВЛАДЛЕН ГЕННАДИЕВИЧ**

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ  
ПРОИЗВОДНЫХ 2-ОКСИНДОЛА**

3.3.6. – Фармакология, клиническая фармакология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук