

УДК 615.31:547.759.4:547-311



Синтез и мультимодальная активность 3а,6-эпоксиизоиндола-2(3H)-(карбокс/тио/селен)амидов в моделях реакции гликирования, окислительного стресса и воспаления, ориентация на разработку средств, воздействующих на триггерные механизмы фиброобразования

У.М. Ибрагимова¹, Н.В. Валуйский¹, В.Р. Райберг¹, С.А. Сорокина¹, К.И. Жукова¹, Д.К. Дерягин¹,
И.С. Ухоренко¹, А.А. Григорьева², Д.М. Щевников², В.П. Зайцев², Р.А. Литвинов^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Россия, 400066, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»,
Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

³ Общество с ограниченной ответственностью «ИННОВИТА»,
Россия, 400066, г. Волгоград, ул. Комсомольская, д. 6, оф. 401, комн. 2

E-mail: litvinov_r@innovvita.com

Получена 30.07.2025

После рецензирования 30.10.2025

Принята к печати 15.11.2025

Цель. В ряду 3а,6-эпоксиизоиндол-2(3H)-(карбокс/тио/селен)амидов выявить мультимодальный скаффолд, пригодный в качестве основы для дальнейшей разработки средств профилактики и терапии фиброзных заболеваний; оценить антигликирующую и антиоксидантную активность ряда соединений, отобрать нецитотоксичное соединение-лидер со сбалансированным сочетанием двух активностей и предварительно проверить его противовоспалительное действие.

Материалы и методы. Целевые 3а,6-эпоксиизоиндол-2(3H)-(карбокс/тио/селен)амиды синтезированы с использованием IMDAF-реакции. Антигликирующую активность оценивали в модели гликирования альбумина глюкозой, регистрируя флуоресценцию конечных продуктов гликирования (КПГ). Антиоксидантные свойства определяли с применением ABTS. Цитотоксическое и противовоспалительное действие изучали на перитонеальных макрофагах белых половозрелых мышей дикого типа ($n=4$, масса 30–35 г). Цитотоксичность оценивали с использованием МТТ-теста и по высвобождению лактатдегидрогеназы (ЛДГ), противовоспалительный эффект — в модели ЛПС-индуцированной продукции оксида азота (NO).

Результаты. В результате работы показаны перспективные направления модификации эпоксиизоиндольного скаффолда для разработки новых лекарственных препаратов; предложена система поиска средств для профилактики и лечения патологий, зависящих от пусковых механизмов повреждения гликированием и окислительным стрессом, в том числе фиброзных болезней. Идентифицированы активные молекулы (производные гидрированного 3а,6-эпоксиизоиндола). Соединение **2.10**, а именно 7а-хлор-N-(4-хлорфенил)-1,6,7,7а-тетрагидро-3а,6-эпоксиизоиндол-2(3H)-карботиоамид, продемонстрировало оптимальное сочетание антигликирующей (в концентрации 100 мкМ ингибирование реакции гликирования на $40,1 \pm 1,7\%$) и антиоксидантной активности (в концентрации 111 мкМ снижение интенсивности окраски ABTS•+ на $57,1 \pm 1,1\%$) при низкой цитотоксичности (проявляется в концентрациях ≥ 250 мкМ), тогда как **2.16–2.19** (содержат структурный N-ароильный фрагмент) отличались исключительно высокой антиоксидантной активностью (снижение интенсивности окраски ABTS•+ на 95,0–96,5%) без согласования таковой с антигликирующим действием (для лучшего соединения не достигает 15% ингибирования реакции гликирования). Противовоспалительная активность **2.10** в использованной модели выявлена не была.

Для цитирования: У.М. Ибрагимова, Н.В. Валуйский, В.Р. Райберг, С.А. Сорокина, К.И. Жукова, Д.К. Дерягин, И.С. Ухоренко, А.А. Григорьева, Д.М. Щевников, В.П. Зайцев, Р.А. Литвинов. Синтез и мультимодальная активность 3а,6-эпоксиизоиндола-2(3H)-(карбокс/тио/селен)амидов в моделях реакции гликирования, окислительного стресса и воспаления, ориентация на разработку средств, воздействующих на триггерные механизмы фиброобразования. *Фармация и фармакология*. 2025;13(6):500-514. DOI: 10.19163/2307-9266-2025-13-6-500-514

© У.М. Ибрагимова, Н.В. Валуйский, В.Р. Райберг, С.А. Сорокина, К.И. Жукова, Д.К. Дерягин, И.С. Ухоренко, А.А. Григорьева, Д.М. Щевников, В.П. Зайцев, Р.А. Литвинов, 2025

For citation: U.M. Ibragimova, N.V. Valuysky, V.R. Rayberg, S.A. Sorokina, K.I. Zhukova, D.K. Deryagin, I.S. Ukhorenko, A.A. Grigoryeva, D.M. Shchevnikov, V.P. Zaytsev, R.A. Litvinov. Synthesis and multimodal activity of 3a,6-epoxyisindole-2(3H)-(carbox/thio/seleno)amides in models of glycation, oxidative stress, and inflammation: Toward the development of agents targeting the triggering mechanisms of fibrogenesis. *Pharmacy & Pharmacology*. 2025;13(6):500-514. DOI: 10.19163/2307-9266-2025-13-6-500-514

Заключение. Соединение **2.10** — перспективная основа для дальнейшей оптимизации структуры в направлении создания средств, ориентированных на ранние звенья патогенеза заболеваний, зависящих от механизмов повреждения гликированием и окислительным стрессом, в том числе для профилактики и лечения фиброзного ремоделирования.

Ключевые слова: эпоксиизоиндол; антигликирование; антиоксидантная активность; воспаление; фиброз; макрофаги

Список сокращений: ABTS — 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота); DMEM — модифицированная Дульбекко среда Игла; IMDAF — внутримолекулярная реакция Дильса-Альдера с участием фурана; БСА — бычий сывороточный альбумин; ДМСО — диметилсульфоксид; КПГ — конечные продукты гликирования; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; ЛПС — липополисахарид; НАД⁺ — никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма молекулы); НАДН — никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма молекулы); ПМ — перитонеальные макрофаги; ТСХ — тонкослойная хроматография; ЯМР — ядерный магнитный резонанс.

Synthesis and multimodal activity of 3a,6-epoxyisoindole-2(3H)-(carbox/thio/seleno)amides in models of glycation, oxidative stress, and inflammation: Toward the development of agents targeting the triggering mechanisms of fibrogenesis

U.M. Ibragimova¹, N.V. Valuysky¹, V.R. Rayberg¹, S.A. Sorokina¹, K.I. Zhukova¹, D.K. Deryagin¹, I.S. Ukhorenko¹, A.A. Grigoryeva², D.M. Shchevnikov², V.P. Zaytsev², R.A. Litvinov^{1,3}

¹ Volgograd State Medical University,

1 Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400066

² Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University),

6 Miklukho-Maklaya Str., Moscow, Russia, 117198

³ InnoVVita LLC,

6 Komsomolskaya Str., office 401, room 2, Volgograd, Russia, 400066

E-mail: litvinov_r@innovvita.com

Received 30 July 2025

After peer review 30 Oct 2025

Accepted 15 Nov 2025

The aim. Within a series of 3a,6-epoxyisoindole-2(3H)-(carbox/thio/seleno)amides, we sought to identify a multimodal scaffold suitable for the further development of agents to prevent and treat fibrotic diseases by assessing of compound's ability to mitigate glycation and oxidative stress, key triggers of fibrogenesis; to select a non-cytotoxic lead with a balanced combination of these two activities, and to preliminarily evaluate its anti-inflammatory potential.

Materials and methods. Target 3a,6-epoxyisoindole-2(3H)-(carbox/thio/seleno)amides were synthesised using the IMDAF approach. Antiglycation activity was evaluated in a bovine serum albumin-glucose model by registering advanced glycation end-product (AGE) fluorescence. Antioxidant properties were determined using the ABTS assay. Cytotoxicity and anti-inflammatory effects were studied in peritoneal macrophages from adult wild-type white mice ($n = 4$; body mass 30–35 g). Cytotoxicity was assessed by the MTT assay and lactate dehydrogenase (LDH) release, while anti-inflammatory effects were evaluated in a model of LPS-induced nitric oxide (NO) production.

Results. The study delineates promising directions for modifying the epoxyisoindole scaffold for drug discovery and proposes a screening framework for agents targeting pathologies dependent on non-enzymatic damaging mechanisms (glycation, oxidation), including fibrotic diseases. Active molecules were identified among derivatives of hydrogenated 3a,6-epoxyisoindole. Compound **2.10** — 7a-chloro-*N*-(4-chlorophenyl)-1,6,7,7a-tetrahydro-3a,6-epoxyisoindole-2(3H)-carbothioamide — exhibited an optimal balance of antiglycation (at 100 μ M, inhibition of glycation $40.1 \pm 1.7\%$) and antioxidant activity (at 111 μ M, reduction in ABTS•+ colour intensity $57.1 \pm 1.1\%$) with low cytotoxicity (apparent from $\geq 250 \mu$ M). By contrast, compounds **2.16–2.19** (bearing an aroyl fragment) showed exceptionally high antioxidant activity (95.0–96.5% reduction in ABTS•+ colour intensity) without concordant antiglycation effects (inhibition not exceeding 15%). In the model used, anti-inflammatory activity of **2.10** was not detected.

Conclusion. Compound **2.10** is a promising starting point for further structural optimisation toward agents acting on early pathogenetic events driven by non-enzymatic damaging triggers, including the prevention and treatment of fibrotic remodelling.

Keywords: epoxyisoindole; antiglycation; antioxidant activity; inflammation; fibrosis; macrophages

Abbreviations: ABTS — 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота); DMEM — Dulbecco's Modified Eagle Medium; IMDAF — IntraMolecular Diels-Alder Furan reaction; БСА — bovine serum albumin; ДМСО — dimethyl sulfoxide; AGE — advanced glycation end products; LDH — lactate dehydrogenase; ЛПС — lipopolysaccharide; НАД⁺ — nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form of the molecule); НАДН — nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form of the molecule); ПМ — peritoneal macrophages; ТСХ — thin-layer chromatography; ЯМР — nuclear magnetic resonance.

ВВЕДЕНИЕ

В основе многих трудноизлечиваемых инвалидизирующих заболеваний лежат процессы патологического фиброзного ремоделирования тканей [1]. Одни из ведущих ролей в развитии фиброза отведены персистентному переходу фибробластов в миофибробласты [2], воспалению [3], изменениям в экспрессии сигнальных молекул (например, FGF23 в сердце, интерлейкинов IL-6 и IL-11) [4–6], а также нарушению баланса деградации и синтеза компонентов внеклеточного матрикса [7]. В то же время, приведенные состояния, несмотря на их высокую патогенетическую значимость, являются реактивными, то есть способными развиваться в ответ на действие пускового повреждающего механизма [8–10]. К числу таких пусковых механизмов относится, в том числе, повреждение молекул такими факторами, как гликирование и окислительный стресс [9, 10].

Фокусируясь на фиброзе, как на патологии, с трудом поддающейся лечению, а также вторичности природы многих значимых патогенетических механизмов фиброзного ремоделирования, можно сделать вывод о том, что воздействие на самые ранние триггерные звенья патогенеза является перспективной стратегией в профилактике и лечении заболевания [11]. При этом воздействие сразу на несколько механизмов может иметь еще больший успех [12]. В обобщенном виде подход к поиску новых антифиброзных соединений, основанный на оценке влияния таковых как на ранние, пусковые, так и на более поздние, вторичные механизмы фиброзного ремоделирования — может служить эффективной стратегией поиска новых антифиброзных средств.

ЦЕЛЬ. Проанализировать и выявить в ряду 3а,6-эпоксизоиндол-2(3H)-(карбокс/тио/селен) амидов мультимодальный скаффолд, пригодный в качестве основы для дальнейшей разработки средств профилактики и терапии фиброзных заболеваний; оценить антигликирующую и антиоксидантную активность ряда соединений, отобрать нецитотоксичное соединение-лидер со сбалансированным сочетанием двух активностей и предварительно проверить его противовоспалительный потенциал.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез соединений

Серии соединений **1.1–1.12** и **2.1–2.19** для выполнения биологических испытаний были синтезированы с использованием термической внутримолекулярной реакции Дильса-Альдера в ряду фурана (IMDAF реакция) которая часто используется, как для направленного получения алкалоидов [13–16], так и для изучения фундаментальных закономерностей органических реакций [17–19].

На первом этапе при помощи восстановительного аминирования были получены соответствующие *N*-аллилфурфуриламины одним из двух методов (Рис. 1), в зависимости от загрузки, как описано в работах [20–23].

Метод А (масса исходного фурфурола менее 5 г). К раствору фурфурола в дихлорметане прибавляли эквимольное количество аллиламина (все коммерчески доступные реактивы предоставлены компанией Thermo Scientific Chemicals), после чего реакционные смеси перемешивались при комнатной температуре в присутствии молекулярных сит MS 3Å 24 ч (контроль ТСХ). После удаления растворителя, образовавшиеся масла без дополнительной очистки растворялись в метаноле (с добавлением тетрагидрофурана в случае неполного растворения), и прибавляли двукратный мольный избыток боргидрида натрия при комнатной температуре и постоянном перемешивании. После выдерживания в течение суток и стандартной обработки вторичные амины выделялись в виде слабозеленых масел методом колоночной хроматографии (SiO₂, элюент: гексан-этилацетат) с выходом 40–50%.

Метод Б (масса исходного фурфурола более 5 г). К раствору фурфурола в бензоле добавляли эквимольное количество аллиламина, после чего смесь кипятили с водоотделителем Дина-Старка до отделения теоретического количества воды. После упаривания бензола, полученные масла без дополнительной очистки растворяли в этаноле и вводили в реакцию с боргидридом натрия (2 экв) при кипении. После стандартной обработки, полученные масла очищались фракционированием при пониженном давлении. Целевые амины получали в виде бесцветных или светло-желтых масел с выходами 45–50%.

Синтез эпоксиизоиндолкарбо(тио, селено) амидов **1.1–1.12** и **2.1–2.19** проводили в среде бензола или толуола, как описано в [24, 25] (Рис. 2 и Рис. 3). К раствору полученных выше фурфурилаллиламинов добавляли соответствующий изо(тио,селено)цианат (R³NCO или R³NCX), кипятили реакционную смесь 6–8 ч (контроль ТСХ, Sorbfil, гексан : этилацетат 80/20). После охлаждения образующиеся кристаллы фильтровали, промывали эфиром, получая целевые продукты в виде бесцветных кристаллов с выходами 28–93%.

Значительная разница в выходах целевых 3а,6-эпоксизоиндолов обусловлена различной стерической нагрузкой диена и диенофила в переходном состоянии внутримолекулярного [4+2] циклоприсоединения, а также различной основностью вторичного атома азота в исходных *N*-аллилфурфуриламилах (что влияет на скорость нуклеофильного присоединения изоцианата). Показано, что объемные алифатические заместители при атоме азота

N-аллилфурурил(тио,селено)мочевин снижают выходы аддуктов Дильса-Альдера. Умеренный выход селеномочевин **2.12–2.15** (Рис. 3) объясняется тем, что продолжительное нагревание реакционных смесей в бензоле приводит к деструкции продуктов с образованием красного осадка селена.

Строение полученных продуктов и их чистота были подтверждены методами ^1H , ^{13}C ЯМР, масс-спектрометрии и элементным анализом. Полученные спектральные данные коррелируют с описанными ранее в работах [24, 25].

Антигликирующая активность *in vitro*

Реакция гликирования проведена в фосфатном буферном растворе 0,05M pH 7.4. Состав реакционной среды: глюкоза 0.36 M («Арат-Мед», Россия), БСА (фракция V) 1 мг/мл («Sigma», США). Исследуемые соединения растворяли в 99% ДМСО («Кемеровская ФФ», Россия) (конечная концентрация растворителя в реакционной среде ~3%). Активность соединений исследована в концентрации 100 мкМ. Контрольные пробы содержали эквивалентный объем растворителя. Образцы инкубировали 24 ч при 60°C. Регистрацию данных проводили спектрофлуориметрическим методом, определяя конечные продукты гликирования (КПГ) по их специфической флуоресценции при длинах волн возбуждения/испускания 440/520 нм (микропланшетный ридер Infinite M200 PRO, Tecan, Австрия).

С целью исключения ложноположительных результатов для соединений, подавляющих флуоресценцию КПГ за счет интерференции, проводилось логарифмическое нормирование получаемых данных по формуле 1:

$$\text{Flu}(\text{lg}) = 10^{\lg(\text{exp}) - \lg(\text{Blank})} - 1,$$

где $\text{Flu}(\text{lg})$ — нормированная интенсивность флуоресценции КПГ; $\lg(\text{Exp})$ и $\lg(\text{blank})$ — десятичные логарифмы фактических уровней флуоресценции гликированных, и соответствующих им негликированных проб (как содержащих исследуемое соединение, так и контрольных).

Активность прочих соединений (как нефлуоресцирующих, так и флуоресцирующих при используемых длинах волн) выражалась по формуле 2:

$$\text{Flu}(\text{lin}) = \text{Exp} - \text{Blank},$$

где $\text{Flu}(\text{lin})$ — интенсивность флуоресценции КПГ; Exp и Blank — фактические уровни флуоресценции гликированных и соответствующих им негликированных проб (как содержащих исследуемое соединение, так и контрольных).

Определение активности, выраженное как % подавления флуоресценции КПГ, производили по формуле 3:

$$\% = 100 - \left(\text{Flu}(\text{exp}) * \frac{100}{\text{Flu}(\text{Contr})} \right),$$

где $\text{Flu}(\text{Exp})$ и $\text{Flu}(\text{Contr})$ — интенсивность флуоресценции КПГ опытных и контрольных проб соответственно (лог-нормированная или не лог-нормированная).

Антиоксидантные свойства *in vitro*

ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота); «Sigma», Канада) представляет собой хромогенный субстрат, применяемый для количественной оценки антиоксидантной активности. В процессе окисления данного субстрата формируется стабильный радикал $\text{ABTS}^{\bullet+}$, характеризующийся интенсивной синезеленой окраской. Антиоксиданты способны восстанавливать данный радикал, что приводит к снижению интенсивности окраски, позволяя тем самым оценить антиоксидантную способность исследуемых соединений. Генерация радикала осуществляется посредством добавления в реакционную среду системы пероксид водорода — гемоглобин. Гемоглобин («Serva», Германия) растворяли в 0,1M фосфатном буферном растворе (pH=6,8) до конечной концентрации 1 мг/мл. ABTS готовили в концентрации 0,4 мг/мл путем разведения 2 мг в 1 мл PBS. Пероксид водорода готовили путем смешивания 197 мкл 3% H_2O_2 («Ивановская фармацевтическая фабрика», Россия) с 9833 мкл дистиллированной воды, достигая концентрации 0,05%. Спектрофотометрическое определение оптической плотности среды проводилось при длине волны 734 нм с использованием многофункционального микропланшетного ридера Tecan Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия).

Этическая экспертиза

Манипуляции проводились в соответствии с требованиями ARRIVE 2.0. Этическое одобрение получено 23.10.2024 г. от Локального этического комитета ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России (регистрационный номер IRB 00005839, IORG 0004900 [OHNP]).

Оценка цитотоксичности соединения-лидера, а также его противовоспалительных свойств при индукции воспаления бактериальным липополисахаридом

В качестве клеток-мишеней использовались первичные мышинные перитонеальные макрофаги (ПМ). ПМ выделяли из перитонеального экссудата белых половозрелых мышей дикого типа ($n=4$, масса 30–35 г). Животные были получены из биопитомника ООО «СМК СТЕЗАР» (г. Владимир) и прошли 2-недельный карантин в виварии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Содержание животных и проведение экспериментов

соответствовало «Принципам надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ Р-53434-2009) и рекомендациям «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств». Для стимуляции накопления и активации ПМ мышам вводили внутривентрально 1 мл 3% раствора пептона. Через 3 сут животных гуманно усыпляли методом цервикальной дислокации. Перитонеальные клетки собирали путем асептического промывания брюшной полости 5 мл стерильного раствора Хенкса (ПанЭко, Россия) (без ионов кальция и магния) при температуре 4–6°C. Полученный лаваж центрифугировали при 250 g 10 мин (центрифуга SIGMA 2- 16KL, Германия), супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали для получения клеточной суспензии, с последующим центрифугированием (5 мин) и ресуспендированием. Общее количество клеток подсчитывали и оценивали их жизнеспособность в счетной камере Горяева (Россия) с окраской 0,4% трипановым синим («Sigma-Aldrich», США). Концентрацию клеток доводили до $2,0 \times 10^5$ клеток/мл в полной питательной среде DMEM (Gibco) с добавлением 2 mM L-глутамина (Gibco), 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки («BioClot», Германия) с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина (Gibco). Клетки сеяли в 96-луночные планшеты по 200 мкл на лунку и инкубировали 2 ч при 37°C в увлажненной атмосфере (влажность 95%) с 5% CO₂, после чего лунки промывали раствором Хенкса (без ионов кальция и магния) для удаления неприкрепившихся клеток. После 24 ч инкубации из каждой лунки забирали 40 мкл супернатанта, добавляли 20 мкл растворов тестируемых веществ в диапазоне концентраций 10–10000 мкМ, что обеспечивало конечную концентрацию 1–1000 мкМ в лунке. Диапазон избранных концентраций приемлем и в разных сочетаниях конкретных исследуемых концентраций встречается в литературе [26–28]. Инкубировали в течение 30 мин в CO₂-инкубаторе. По истечении 30 мин вносили 20 мкл липополисахарида (ЛПС) *E. coli* O26:B6 (в среде DMEM) («Sigma-Aldrich», США) (C=100 нг/лунка) и инкубировали 24 часа. По истечении совместной инкубации ПМ с исследуемыми и контрольными веществами, было отобрано 20 мкл клеточного супернатанта для проведения ЛДГ-теста и 50 мкл клеточного супернатанта для определения продукции NO. Оставшийся культуральный планшет с ПМ использован для дальнейшего проведения МТТ-теста.

Проведение МТТ-анализа

Для оценки жизнеспособности клеток использовали колориметрический МТТ-тест. После 24-часового воздействия соединений и аспирации 70 мкл клеточной суспензии, клетки обрабатывали раствором МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) («Sigma», Китай)

концентрацией 5 мг/мл в PBS в соотношении 1:10 и инкубировали еще 2,5 ч. По окончании инкубации раствор МТТ удаляли, добавляли 150 мкл ДМСО («Кемеровская ФФ», Россия) для растворения формазановых кристаллов и встряхивали планшеты в течение 5 мин. Оптическую плотность измеряли при длине волны 565 нм с использованием многофункционального микропланшетного ридера Tecan Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия). Выбранная длина волны соответствует максимуму поглощения и обеспечивает оптимальную чувствительность; аналогичные параметры описаны ранее [29].

Проведение ЛДГ-анализа

Повышение уровня фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в среде культивирования свидетельствует о нарушении целостности клеточной мембраны и гибели клеток. Для измерения содержания ЛДГ в супернатантах применяли метод, основанный на спектрофотометрическом контроле уменьшения концентрации НАДН в присутствии пирувата. 20 мкл супернатантов, взятых через 24 часа после инкубации ПМ с тестируемыми и контрольными соединениями (конечная концентрация 1-1000 мкМ), смешивали с 250 мкл раствора НАДН (ПанЭко, Россия) с концентрацией 0,194 мМ/л, растворенного в 54 мМ фосфатном буфере, pH=7,5. Затем в смесь добавляли 25 мкл раствора пирувата (ПанЭко, Россия) концентрацией 6,48 мМ.

Изменение оптической плотности фиксировали при длине волны 340 нм в течение 20 мин с использованием многофункционального микропланшетного ридера Tecan Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия). Выбранная длина волны соответствует пиковой абсорбции НАДН, обеспечивая оптимальную чувствительность при его количественном определении [30]. Указанное время необходимо для протекания ферментативной реакции превращения пирувата в лактат и окисления НАДН до НАД⁺, что лежит в основе данной тест-системы [31]. Для определения жизнеспособности клеток использовали стандартную кривую, где жизнеспособность целых клеток принималась за 100%, а обработанных Triton X-100 — за 0%.

Определение продукции NO перитонеальными макрофагами

Экспрессию iNOS клетками индуцировали внесением стерильного раствора ЛПС в объеме 20 мкл, конечная концентрация составляла 100 нг/лунка. В качестве препарата сравнения использовали дексаметазон в концентрации 100 мкМ. Инкубировали 24 ч в стандартных условиях CO₂-инкубатора.

Накопление нитрита (стабильного конечного продукта NO) в супернатантах определяли с помощью стандартного реактива Грисса. Метод Грисса основан на диазотировании нитрит-иона в кислой среде сульфаниламидом и взаимодействии

диазосоединения с *N*-(1-нафтил)этилендиамином с образованием окрашенного производного. После 24-часовой инкубации из лунок планшета отбирали 50 мкл супернатанта, добавляли 100 мкл реактива (1% сульфаниламида в 5% ортофосфорной кислоте и 0,1% водный раствор *N*-(1-нафтил)этилендиамина в равных пропорциях). Определяли оптическую плотность в микропланшетном ридере при 550 нм с использованием многофункционального микропланшетного ридера Tecan Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия). Выбранная процедура соответствует [32].

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили с применением программы GraphPad Prism 9.0, с использованием критерия ANOVA (пост-тест Даннета). Расчет статистических параметров проводился для линейно-нормированных данных (нормализация проведена вычитанием значений, полученных для холостых проб, из результатов, полученных для соответствующих опытных проб). Корреляционный анализ выполняли с использованием коэффициента корреляции Пирсона при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Антигликирующая активность *in vitro*

Результаты исследования антигликирующих свойств соединений представлены в таблице 1.

В ходе исследования выявлено несколько наиболее активных соединений, а именно **2.5**, **2.8**, **2.10**, **2.11**, **2.12**, **2.13**, **2.14** и **2.15**. Несмотря на значительное превосходство в уровне активности над алагебриумом (последний проявляет активность в данных экспериментальных условиях лишь в концентрации 1000 мкМ), активность отмеченных соединений все же представляется умеренной, однако достаточной для ведения дальнейших модификаций структуры. Отрицательное значение активности соединения **1.9**, вероятно, можно рассматривать как результат интерференции или погрешности измерения.

Антиоксидантные свойства *in vitro*

Результаты исследования антиоксидантных свойств соединений представлены в таблице 2.

В ходе исследования выявлено несколько

наиболее активных соединений: **2.2**, **2.3**, **2.4**, **2.5**, **2.6**, **2.7**, **2.8**, **2.9**, **2.10**, **2.11**, **2.12**, **2.13**, а также **2.16**, **2.17**, **2.18**, **2.19** (активность последних 4 соединений оказалась наивысшей в ряду).

Согласно механистическому взгляду на реакцию гликирования, течение реакции во многом зависит от процессов окислации [33], благодаря чему антиоксидантные соединения могут оказываться перспективными антигликаторами [34]. В одной из более ранних работ мы демонстрировали подобную корреляцию антигликирующей активности и способности соединений препятствовать медь-зависимому аутоокислению аскорбата [35]. Примечательно, что в случае исследуемого ряда соединений не наблюдается статистически значимой корреляции двух активностей (критерий Пирсона, $R=0,239$, $p=0,196$). В то же время, исключение соединений **2.16**, **2.17**, **2.18**, **2.19**, проявивших наивысшие антиоксидантные свойства, привело к возникновению статистически значимой корреляции (критерий Пирсона, $R=0,607$, $p=0,001$). Графически данная корреляция представлена на рисунке 4.

Подобная рассогласованность в величинах двух оценённых активностей именно для указанных четырех соединений может являться следствием интерференции в одном из двух тестов, а потому нуждается в дополнительном исследовании. В то же время мы отмечаем, что данные соединения содержат структурный *N*-ароильный фрагмент, возможно, имеющий значение для проявления только одной активности, но не второй, даже вопреки связи таковых. Также возможно, что данная антиоксидантная активность ввиду неустановленных особенностей способна проявлять себя только в условиях теста с ABTS и не имеет значения для течения реакции гликирования, что ограничивает ее потенциальную полезность. Таким образом, несмотря на наличие драматически высокой антиоксидантной активности, сопоставимой с высокоактивным соединением кверцетином, и учитывая недостаточные надежность и объяснимость результатов, соединения **2.16**, **2.17**, **2.18** и **2.19** не были учтены при отборе лидера. Исследования антиоксидантных свойств данных соединений будут продолжены и углублены в будущем.

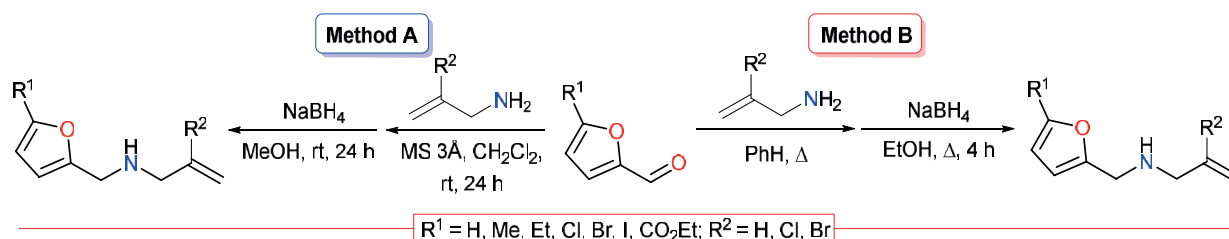


Рисунок 1 — Получение исходных *N*-аллилфурфуриламинов.

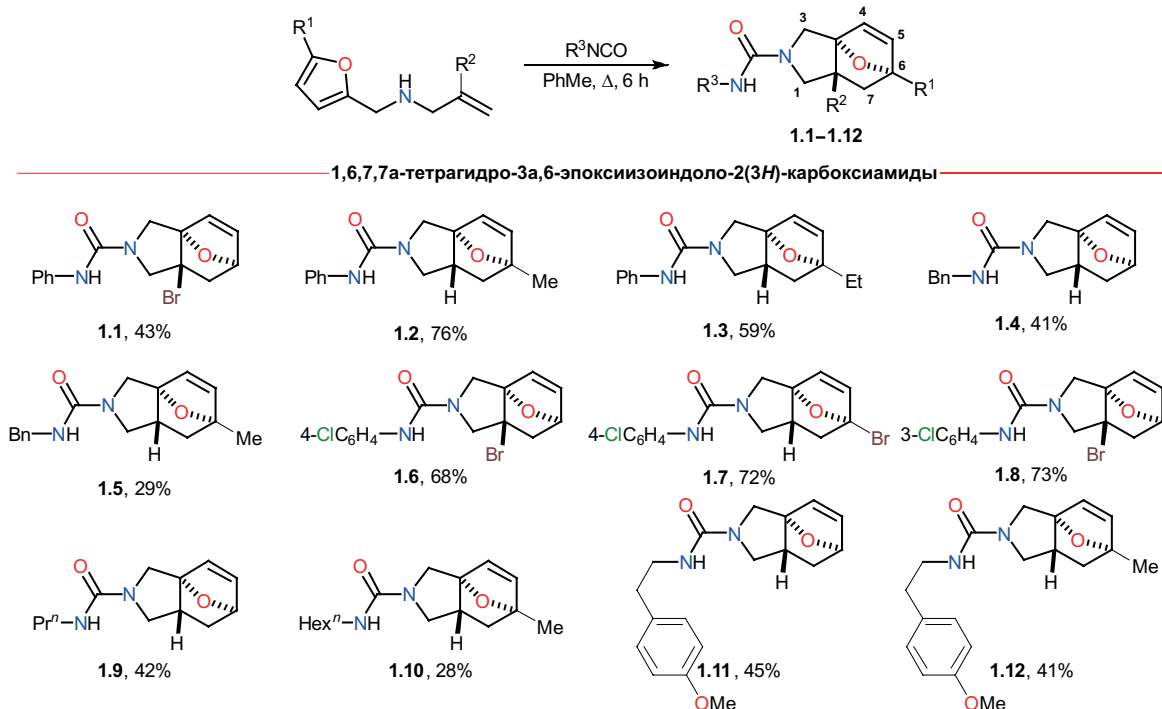


Рисунок 2 — Схема получения и структурные формулы гидрированных 3a,6-эпоксизоиндола-2(3H)-карбоксамидов.

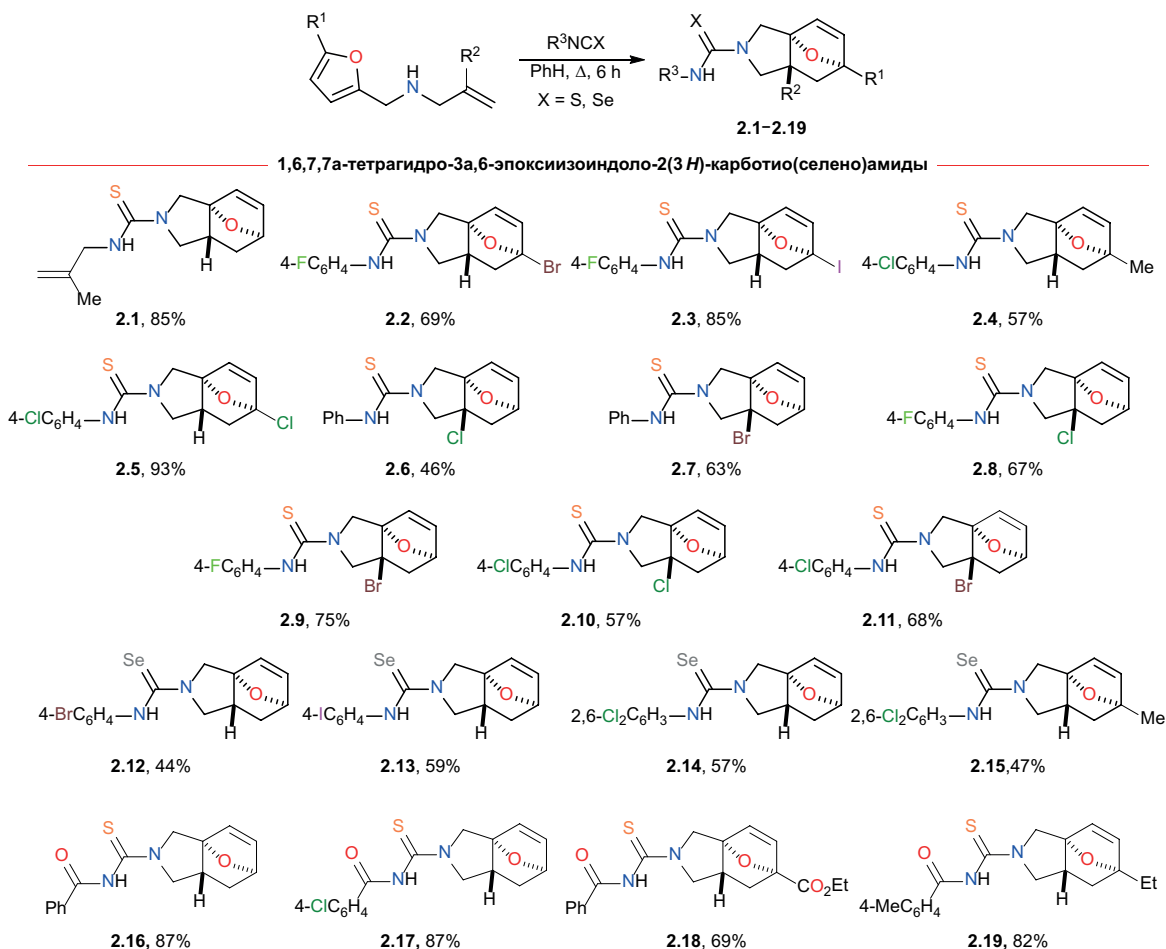


Рисунок 3 — Схема получения и структурные формулы гидрированных 3a,6-эпоксизоиндола-2(3H)-карботио(селено)амидов.

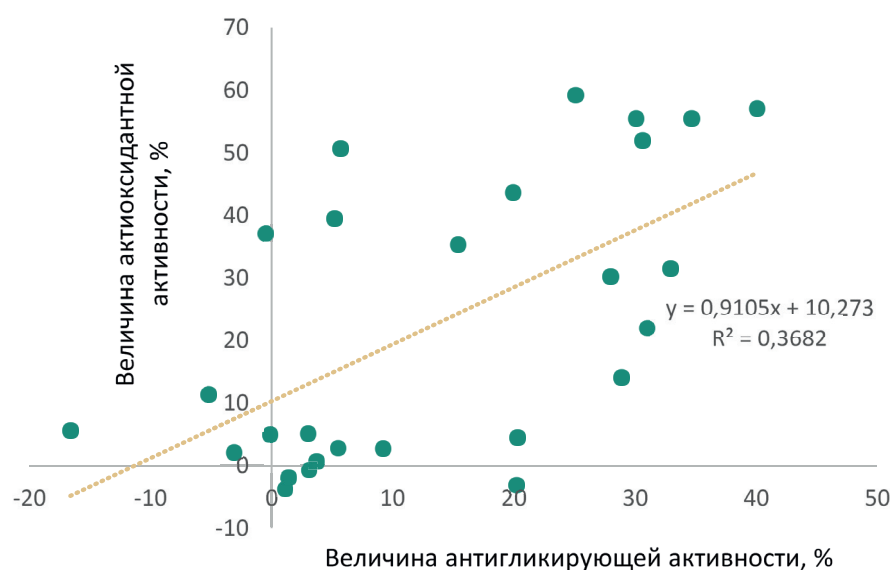


Рисунок 4 – Графическое представление корреляции величин антигликирующей и антиоксидантной активностей соединений, за исключением 2.16, 2.17, 2.18, 2.19 и референтов.

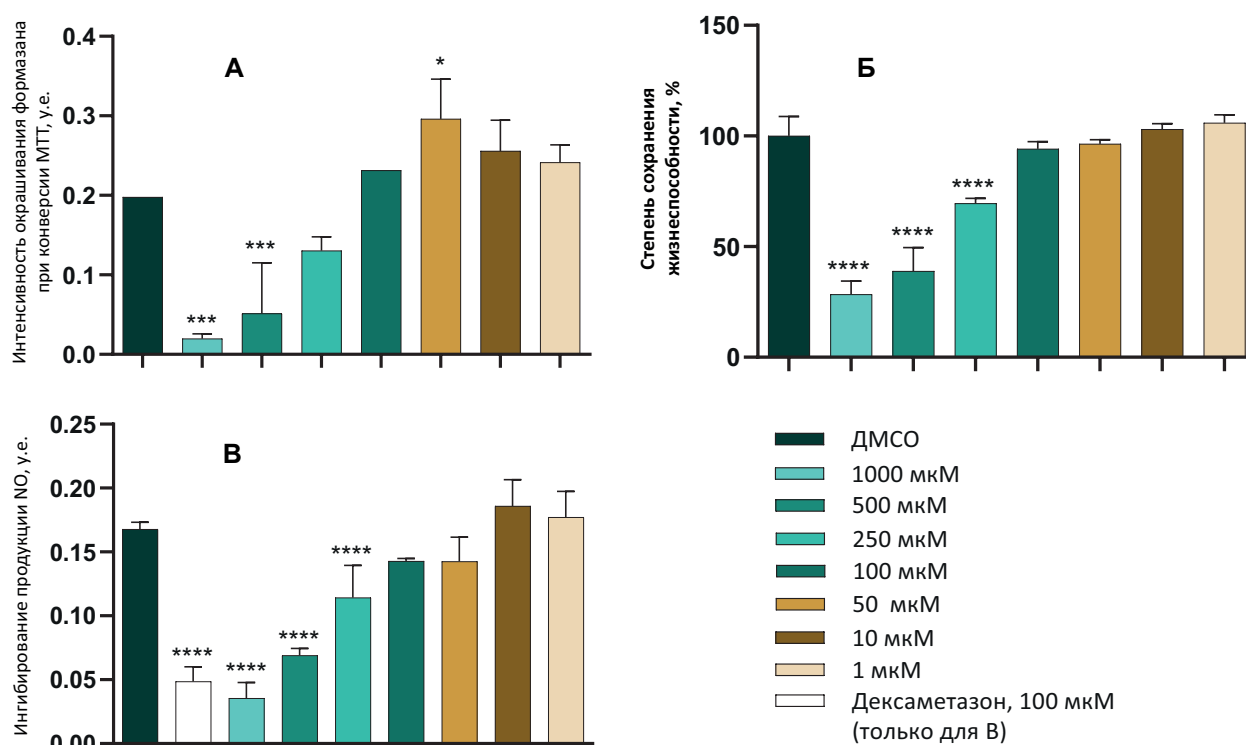


Рисунок 5 – Результаты оценки цитотоксических и противовоспалительных свойств соединения 2.10.

Примечание: А — цитотоксическое действие соединения 2.10 в МТТ-тесте на перитонеальных макрофагах; Б — цитотоксическое действие соединения 2.10 в тесте с определением высвобождающейся лактатдегидрогеназы; В — ингибирующее действие соединения 2.10 в отношении продукции NO, вызванной действием липополисахарида в сравнении с дексаметазоном.* — статистически значимые различия в сравнении с результатами группы контроля, ANOVA (пост-тест Даннета: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$, **** — $p < 0,0001$).

Таблица 1 – Антигликирующая активность производных 3а,6-эпоксизоиндола *in vitro* в концентрации 100 мкМ

Соединение	Активность, % (M±SEM)
1.1	-3,1±1,2
1.2	9,2±4,5
1.3	3,7±2,7
1.4	-0,1±3,6
1.5	3,0±2,7
1.6	20,2±2,4*
1.7	5,5±8,5
1.8	1,1±3,1
1.9	-16,6±2,2**
1.10	20,3±2,2**
1.11	1,4±3,5
1.12	3,1±4,3
2.1	-5,2±2,2
2.2	25,1±4,3**
2.3	19,9±3,3*
2.4	-0,5±1,8
2.5	30,1±5,2***
2.6	15,4±1,6****
2.7	5,2±1,6
2.8	34,7±3,1****
2.9	5,7±3,5
2.10	40,1±1,7****
2.11	30,6±3,3***
2.12	32,9±2,3****
2.13	28,0±1,1****
2.14	28,9±2,7****
2.15	31,0±0,9****
2.16	8,8±2,7**
2.17	14,7±1,0**
2.18	1,0±4,1
2.19	-1,0±3,2
Алагебриум	-12,0±1,2
Алагебриум (1000 мкМ)	15,9±1,5****

Примечание: * — статистически значимые различия в сравнении с результатами группы контроля, ANOVA (пост-тест Даннета: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$).

По совокупности двух активностей, антигликирующей и антиоксидантной, среди оставшихся соединений отобрано наилучшее, в наибольшей степени проявившее одновременно оба искомых вида действия, а именно соединение **2.10**, при этом сочетающее их сбалансированно. Дальнейшие исследования проводились с отобранным лидером.

Оценка цитотоксичности соединения-лидера, а также его противовоспалительных свойств при индукции воспаления бактериальным липополисахаридом

Результаты исследования свойств соединения **2.10** в клеточных моделях представлены на рисунке 5. По данным двух тестов (МТТ-тест и определение высвобождающейся ЛДГ)

Таблица 2 – Антиоксидантная активность производных 3а,6-эпоксизоиндола *in vitro* в концентрации 111 мкМ

Соединение	Активность, % (M±SEM)
1.1	2,1±0,6
1.2	2,7±0,7
1.3	0,7±0,4
1.4	5,0±0,2**
1.5	5,1±0,4**
1.6	-3,1±0,7
1.7	2,8±0,7
1.8	-3,7±0,4
1.9	5,6±0,6***
1.10	4,5±0,6
1.11	-1,9±0,5
1.12	-0,7±1,4
2.1	11,4±0,6****
2.2	59,2±0,9****
2.3	43,7±0,7****
2.4	37,1±1,1****
2.5	55,5±0,9****
2.6	35,3±0,7****
2.7	39,5±0,5****
2.8	55,5±0,3****
2.9	50,7±0,8****
2.10	57,1±1,1****
2.11	52,0±1,3****
2.12	31,5±0,5****
2.13	30,2±1,0****
2.14	14,1±1,2****
2.15	22,0±1,1****
2.16	95,3±0,1****
2.17	96,5±0,2****
2.18	95,0±0,5****
2.19	96,1±0,1****
Кверцетин	92,8±1,8****

Примечание: * — статистически значимые различия в сравнении с результатами группы контроля, ANOVA (пост-тест Даннета: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$; **** — $p < 0,0001$).

цитотоксическое действие соединения **2.10** выявлено лишь в концентрациях ≥ 250 мкМ (Рис. 5А и 5Б). Это позволяет предположить, что значимая цитотоксичность при более низких концентрациях соединения отсутствует. В то же время по результатам МТТ-теста в концентрации 50 мкМ отмечается незначительное цитовитализирующее действие (Рис. 5А).

На заключительном этапе исследования на модели индуцированной с помощью ЛПС продукции NO проведена оценка способности соединения **2.10** проявлять противовоспалительное действие. В результате данного исследования удалось показать наличие у исследуемого соединения признаков мнимой противовоспалительной активности в

концентрациях ≥ 250 мкМ (Рис. 5B). Такой эффект, при его достоверном подтверждении, мог бы представлять интерес, поскольку подавление низкоуровневого хронического воспаления, вызываемого первичными повреждающими факторами, является привлекательной стратегией профилактики фиброза [36]. Исходя из полученных данных, соединение **2.10**, если бы оно обладало существенно меньшей по сравнению с дексаметазоном, но действительной активностью, могло бы быть отнесено к веществам с умеренным модулирующим действием в отношении воспалительных процессов. Однако сопоставление результатов оценки цитотоксичности с данными о противовоспалительной активности **2.10** в значительной степени понижает вероятность данного вида действия у соединения, позволяя считать наблюдаемый эффект ложноположительным, обусловленным цитотоксическими свойствами.

В то же время данный результат не опровергает самой связи первичного молекулярного повреждения гликированием и окислительным стрессом с индукцией этим воздействием вторичного клеточного ответа, поскольку именно этих триггерных факторов в клеточной модели не было, и вместо продуктов реакции гликирования или оксидации на клетки оказывалось воздействие бактериальным ЛПС. Таким образом, дальнейший поиск соединений, сочетающих в себе комплексное этиотропное и патогенетическое действия, нацеленные на предотвращение развития инвалидизирующих последствий трудноизлечиваемых ремоделирующих фиброзных заболеваний, а также их профилактику и лечение, надлежит продолжить. Соединение **2.10** можно рассматривать как успешный промежуточный шаг на пути к созданию данных соединений.

ОБСУЖДЕНИЕ

Гликирование белков и окислительный стресс ассоциированы с целым спектром многообразных нарушений, включая патологии сердечно-сосудистой системы, нейродегенеративные болезни [37, 38], а также состояния, связанные с фиброзированием тканей [10, 39, 40]. Так, гликирование, поперечное сшивание белков внеклеточного матрикса и нарастание его жёсткости поддерживают фиброгенез [41–44], а избыточная продукция активных форм кислорода активирует профибротические сигнальные пути, включая связанные с TGF- β [45]. В дополнение к этому, гликирование и окислительный стресс провоцируют значимые для протекания фиброзирования воспалительные реакции [46, 47]. Основываясь на этом, контроль гликирования и окислительного стресса могут эффективно дополнить спектр

терапевтических стратегий, применяемых при лечении и профилактике фиброзов, увеличивая тем самым частоту благоприятных исходов.

Антигликирующие и антиоксидантные соединения искали среди различных классов молекул, как синтетических, так и природных [48, 49]. Сочетание двух указанных активностей в рамках одного агента известно и уже рассматривалось как успешное [50, 51]. В то же время, несмотря на известную связь антигликирования с проявлением антиоксидантных свойств [52], два данных вида действия могут не быть в полной мере идентичными, и известны примеры (ресвератрол и его производное — триэфир с тролоксом), когда при модификации структуры соединения снижение одной активности сопровождалось увеличением другой [53]. В то же время известны примеры (карнозин, гидрокситирозол), когда сочетание данных видов действия было дополнено противовоспалительными свойствами [54, 55].

Общим выводом из сказанного является то, что получение новых мультимодальных скаффолдов, сбалансированно сочетающих антигликирующее действие с антиоксидантными свойствами, опционально дополненное механистически связанной или несвязанной с ними противовоспалительной активностью, является перспективной стратегией при разработке новых антифиброзных соединений. В нашей работе мы сосредоточились на конструировании двунаправленно-активных соединений, сочетающих способность к антигликированию с антиоксидантностью — на основе эпоксиизоиндольного скаффолда, а именно в ряду 3а,6-эпоксиизоиндол-2(3H)-(карбокс/тио/селен)амидов. Данная молекулярная основа может рассматриваться как привилегированная ввиду того, что она (i) доступна через стереоселективные IMDAF-последовательности, допускающие широкую вариацию вводимых (халькоген)карбамоильных фрагментов, и (ii) уже демонстрировала биологическую перспективность в смежных задачах. Так, показано, что IMDAF-подход позволяет получить 3а,6-эпоксиизоиндольное ядро за малое число синтетических этапов, что облегчает генерацию объемной библиотеки соединений для последующего анализа зависимости активности от структуры. Структурно близкие производные изоиндола ранее демонстрировали антигликирующие свойства [56], что косвенно поддерживает гипотезу о перспективности эпоксиизоиндольного ядра в качестве матрицы для построения соединений, сочетающих в себе антигликирование и антиоксидантность. Дополнительную привилегированность эпоксиизоиндольной основе добавляет ее широкая распространенность в природных и лекарственно-

подобных соединениях с разнообразными биологическими эффектами [57].

В исследовании показано, что наиболее сбалансированным сочетанием антигликирующей и антиоксидантной активностей в ряду изученных соединений обладает (3aRS,6SR,7aRS)-7a-хлор-N-(4-хлорфенил)-1,6,7,7a-тетрагидро-3a,6-эпоксиизоиндол-2(3H)-карботиоамид (соединение **2.10**). Сочетая обе активности, выраженные на достаточном уровне для дальнейшей их оптимизации, соединение не демонстрирует превалирования одной из них. Молекула содержит в своей структуре фрагменты тиомочевины, гидрированного изоиндола и галогенарена. Интересным является то, что по отдельности или в иных сочетаниях данные фрагменты присутствуют и в других соединениях ряда, например тиомочевина в **2.1–2.9** и **2.11**, и пара-хлорфенильный заместитель в структурах **2.11** и **2.17**. Но именно сочетание всех имеющихся структурных фрагментов делает **2.10** выдающимся представителем ряда. Это является важным, поскольку искомым скаффолд должен нести признаки целостности, и дальнейшие его модификации могут быть нацелены преимущественно на включение заместителей в незначимые для конечной фармакологической активности точки его структуры.

Принципиальной особенностью соединения **2.10** и всего исследованного ряда является отсутствие в их структурах фенольных гидроксильных групп, традиционно ассоциируемых с антиоксидантной и антигликирующей активностью. По-видимому, это ограничивает потенциальную величину наблюдаемых эффектов в используемых моделях. Но это также обосновывается тем, что рассматриваемые соединения позиционируются прежде всего как стартовые каркасы для последующей оптимизации структуры — на текущем этапе цель работы состояла в поиске нового скаффолда более высокого уровня (более сложно организованного, чем исходный эпоксиизоиндол), пригодного для дальнейшего усиления его антигликирующих и антиоксидантных свойств, а не в достижении максимальных значений активности.

В то же время, о сбалансированности сочетания двух искомых видов действия нельзя говорить, обсуждая установленные свойства **2.16**, **2.17**, **2.18** и **2.19**. В отличие от всех прочих представителей исследованного ряда, данные соединения содержат в своей структуре N-ароильный фрагмент, который, очевидно, и вносит вклад в проявление выраженных антиоксидантных свойств. При этом, ввиду рассогласованности антиоксидантного и антигликирующего действий, феномен высокой антиоксидантной активности этих соединений имеет невысокую конечную значимость. В то же

время свойства четырех указанных соединений могут быть предметом интереса будущих исследований.

Заключительным этапом обсуждения является вопрос о противовоспалительной активности и общей безопасности соединения-лидера **2.10**. В использованной модели ЛПС-индуцированного воспаления на ПМ специфическая противовоспалительная активность **2.10** подтверждена не была — снижение продукции NO, отмеченное в исследовании, наблюдалось преимущественно в концентрациях, для которых наблюдалось цитотоксическое действие (≥ 250 мкМ), тогда как в субтоксическом диапазоне концентраций достоверного эффекта выявлено не было. По меньшей мере наблюдаемый результат указывает на то, что для соединения **2.10** не является характерным ингибирование внутриклеточных воспалительных каскадов. Последнее могло бы иметь ценность для супрессии фиброгенеза. При этом мы отмечаем, что ввиду отсутствия в модели компонента, связанного с индукцией воспалительной реакции некими поврежденными молекулярными паттернами (например гликированным белком), способными выполнять роль триггеров для продукции NO (вместо таковых был использован ЛПС), необходимы дальнейшие уточняющие исследования. В отношении безопасности совокупный результат двух методик оценки цитотоксичности свидетельствует о вероятной приемлемой переносимости **2.10**, хотя трансляция результатов клеточных исследований токсичности сложна и в дальнейшем потребует более сложно организованных биологических моделей.

Таким образом, настоящая работа определяет эпоксиизоиндольный каркас как перспективную основу для создания соединений с сочетанием антигликирующих и антиоксидантных свойств, представляет перспективные направления модификации исходного эпоксиизоиндольного скаффолда для разработки новых лекарственных препаратов и выделяет найденный скаффолд более высокого порядка — соединение **2.10** — в качестве сбалансированного стартового кандидата для дальнейшей оптимизации структуры. В методическом аспекте в работе описана стратегия поиска средств для профилактики и лечения патологий, зависящих от пусковых механизмов повреждения гликированием и окислительным стрессом, в том числе фиброзных болезней.

Ограничения исследования

Несмотря на все достоинства, данное исследование имеет ряд ограничений:

1. Исследование носит пилотный и поисковый характер.

- Несмотря на достаточную обоснованность связи изменений внеклеточного матрикса под действием гликирования, а также окислительного стресса и воспаления с механизмами фиброгенеза, в работе отсутствуют прямые конечные точки, отражающие динамику фиброзных изменений, включая модели тканевого/органного фиброза. Следовательно, выводы об антифиброзном потенциале логически обоснованы, но имеют инференциальный характер.
- Все использованные в исследовании экспериментальные модели относятся к *in vitro* и *in cellulo*. При оценке антигликирующих свойств исследование ограничено одним модельным белком (БСА), клеточные исследования ограничены одним видом клеток (первичными ПМ мыши).
- Несмотря на предпринятые меры по снижению методической интерференции в тест-системах, полностью исключить ее нельзя. Противовоспалительное действие соединения-лидера не подтверждено,

а наблюдаемый эффект связан с цитотоксичностью.

- Стабильность исследуемых соединений в условиях используемых тест-систем не проверялась и не была предметом исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследования установлено, что соединение **2.10** ((3aRS,6SR,7aRS)-7a-хлор-N-(4-хлорфенил)-1,6,7,7a-тетрагидро-3a,6-эпоксиизоиндол-2(3H)-карботиоамид) сочетает антигликирующую и антиоксидантную активность при отсутствии значимой цитотоксичности. Противовоспалительная активность у соединения **2.10**, однако, выявлена не была. Несмотря на это, установленный профиль активности указывает на потенциал соединения в качестве молекулярной основы более высокого порядка (нежели исходный эпоксиизоиндол), пригодной для направленного конструирования новых средств профилактики и лечения состояний, связанных с повреждающим действием гликирования и окислительного стресса, в особенности средств профилактики и лечения фиброзных заболеваний.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда и Администрации Волгоградской области № 24-24-20112 (<https://rscf.ru/project/24-24-20112/>).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

У.М. Ибрагимова — разработка методологии, анализ данных, проведение исследования, администрирование проекта, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи, визуализация; Н.В. Валуцкий — разработка методологии, анализ данных, проведение исследования, администрирование проекта, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи; В.Р. Райберг, С.А. Сорокина, К.И. Жукова, Д.К. Дерягин, И.С. Ухоренко, А.А. Григорьева, Д.М. Щевников — разработка методологии, анализ данных, проведение исследования; В.П. Зайцев — разработка методологии, анализ данных, проведение исследования, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи; Р.А. Литвинов — концептуализация, разработка методологии, обеспечение исследования, администрирование проекта, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи, руководство, привлечение финансирования. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Basak T., Saraswati S. Editorial: Fibrotic tissue remodeling as a driver of disease pathogenesis // Front Mol Biosci. — 2023. — Vol. 10. — P. 1278388. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1278388
- Younesi F.S., Miller A.E., Barker T.H., Rossi F.M.V., Hinz B. Fibroblast and myofibroblast activation in normal tissue repair and fibrosis // Nat Rev Mol Cell Biol. — 2024. — Vol. 25, No. 8. — P. 617–638. DOI: 10.1038/s41580-024-00716-0. Erratum in: Nat Rev Mol Cell Biol. — 2024. — Vol. 25, No. 8. — P. 671. DOI: 10.1038/s41580-024-00744-w
- Mack M. Inflammation and fibrosis // Matrix Biol. — 2018. — Vol. 68–69. — P. 106–121. DOI: 10.1016/j.matbio.2017.11.010
- Hao H., Li X., Li Q., Lin H., Chen Z., Xie J., Xuan W., Liao W., Bin J., Huang X., Kitakaze M., Liao Y. FGF23 promotes myocardial fibrosis in mice through activation of β -catenin // Oncotarget. — 2016. — Vol. 7, No. 40. — P. 64649–64664. DOI: 10.18632/oncotarget.11623
- Li Y., Zhao J., Yin Y., Li K., Zhang C., Zheng Y. The Role of IL-6 in Fibrotic Diseases: Molecular and Cellular Mechanisms // Int J Biol Sci. — 2022. — Vol. 18, No. 14. — P. 5405–5414. DOI: 10.7150/ijbs.75876
- O'Reilly S. Interleukin-11 and its eminent role in

- tissue fibrosis: a possible therapeutic target // *Clin Exp Immunol.* – 2023. – Vol. 214, No. 2. – P. 154–161. DOI: 10.1093/cei/uxad108
7. Mayorca-Guiliani A.E., Leeming D.J., Henriksen K., Mortensen J.H., Nielsen S.H., Anstee Q.M., Sanyal A.J., Karsdal M.A., Schuppan D. ECM formation and degradation during fibrosis, repair, and regeneration // *NPJ Metab Health Dis.* – 2025. – Vol. 3, No. 1. – P. 25. DOI: 10.1038/s44324-025-00063-4
8. Roh J.S., Sohn D.H. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases // *Immune Netw.* – 2018. – Vol. 18, No. 4. – P. e27. DOI: 10.4110/in.2018.18.e27
9. Otoupalova E., Smith S., Cheng G., Thannickal V.J. Oxidative Stress in Pulmonary Fibrosis // *Compr Physiol.* – 2020. – Vol. 10, No. 2. – P. 509–547. DOI: 10.1002/cphy.c190017
10. Zhao J., Randive R., Stewart J.A. Molecular mechanisms of AGE/RAGE-mediated fibrosis in the diabetic heart // *World J Diabetes.* – 2014. – Vol. 5, No. 6. – P. 860–867. DOI: 10.4239/wjd.v5.i6.860
11. De Vriese A.S., Flyvbjerg A., Mortier S., Tilton R.G., Lameire N.H. Inhibition of the interaction of AGE-RAGE prevents hyperglycemia-induced fibrosis of the peritoneal membrane // *J Am Soc Nephrol.* – 2003. – Vol. 14, No. 8. – P. 2109–2118. DOI: 10.1681/ASN.V1482109
12. Li L., Li Q., Wei L., Wang Z., Ma W., Liu F., Shen Y., Zhang S., Zhang X., Li H., Qian Y. Dexamethasone combined with berberine is an effective therapy for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats // *Exp Ther Med.* – 2019. – Vol. 18, No. 4. – P. 2385–2392. DOI: 10.3892/etm.2019.7861
13. Gulbrandsen H.S., Serigstad H., Read M.L., Joos I., Gundersen L.L. Formation of 8-Hydroxyphenanthridines by Microwave-Mediated IMDAF Reactions. – Vol. Synthesis Directed towards Lycorine Alkaloids // *Eur J Org Chem.* – 2019. – Vol. – 2019, No. 35. – P. 6044–6052. DOI: 10.1002/ejoc.201901000
14. Read M.L., Krapp A., Miranda P.O., Gundersen L.L. Synthesis of complex fused polycyclic heterocycles utilizing IMDAF reactions of allylamino- or allyloxy-furyl(hetero)arenes // *Tetrahedron.* – 2012. – Vol. 68. – P. 1869–1885. DOI: 10.1016/j.tet.2011.12.079
15. Zubkov F.I., Ershova J.D., Zaytsev V.P., Obushak M.D., Matychuk V.S., Sokolova E.A., Khrustalev V.N., Varlamov A.V. The first example of an intramolecular Diels–Alder furan (IMDAF) reaction of iminium salts and its application in a short and simple synthesis of the isoindolo[1,2-*a*] isoquinoline core of the jamtine and hirsutine alkaloids // *Tetrahedron Lett.* – 2010. – Vol. 51. – P. 6822–6824. DOI: 10.1016/j.tetlet.2010.10.046
16. Zubkov F.I., Ershova J.D., Orlova A.A., Zaytsev V.P., Nikitina E.V., Peregudov A.S., Gurbanov A.V., Borisov R.S., Khrustalev V.N., Maharramov A.M., Varlamov A.V. A new approach to construction of isoindolo[1,2-*a*] isoquinoline alkaloids Nuevamine, Jamtine, and Hirsutine via IMDAF reaction // *Tetrahedron.* – 2009. – Vol. 65. – P. 3789–3803. DOI: 10.1016/j.tet.2009.02.024
17. Zubkov F.I., Nikitina E.V., Galeev T.R., Zaytsev V.P., Khrustalev V.N., Novikov R.A., Orlova D.N., Varlamov A.V. General synthetic approach towards annelated 3a,6-epoxyisoindoles by tandem acylation/IMDAF reaction of furylazaheterocycles. Scope and limitations // *Tetrahedron.* – 2014. – Vol. 70. – P. 1659–1690. DOI: 10.1016/j.tet.2014.01.008
18. Nadirova M.A., Khanova A.V., Zubkov F.I., Mertsalov D.F., Kolesnik I.A., Petkevich S.K., Potkin V.I., Shetnev A.A., Presnukhina S.I., Sinelshchikova A.A., Grigoriev M.S., Zaytsev V.P. Cascade of the Hinsberg/IMDAF reactions in the synthesis of 2-arylsulfonyl-3a,6-epoxyisoindoles and 4a,7-epoxyisoquinolines in water // *Tetrahedron.* – 2021. – Vol. 85. – P. 132032. DOI: 10.1016/j.tet.2021.132032
19. Zubkov F.I., Mertsalov D.F., Zaytsev V.P., Varlamov A.V., Gurbanov A.V., Dorovatovskii P.V., Timofeeva T.V., Khrustalev V.N., Mahmudov K.T. Halogen bonding in Wagner–Meerwein rearrangement products // *J Mol Liq.* – 2018. – Vol. 249. – P. 949–952. DOI: 10.1016/j.molliq.2017.11.116
20. Trastulli Colangeli S., Campana F., Ferlin F., Vaccaro L. A waste-minimized protocol for electrochemical reductive amination and its environmental assessment // *Green Chem.* – 2024. – Vol. 27. – P. 633–641. DOI: 10.1039/d4gc04847d
21. Müller C., Diehl V., Lichtenhaler F.W. Building blocks from sugars. Part 23. Hydrophilic 3-pyridinol from fructose and isomaltulose // *Tetrahedron.* – 1998. – Vol. 54. – P. 10703–10712. DOI: 10.1016/S0040-4020(98)00634-6
22. Deng J., Mo L.P., Zhao F.Y., Hou L.L., Yang L., Zhang Z.H. Sulfonic acid supported on hydroxyapatite-encapsulated γ -Fe₂O₃ nanocrystallites as a magnetically separable catalyst for one-pot reductive amination of carbonyl compounds // *Green Chem.* – 2011. – Vol. 13. – P. 2576–2584. DOI: 10.1039/C1GC15470B
23. Saberi D., Akbari J., Mahdudi S., Heydari A. Reductive amination of aldehydes and ketones catalyzed by deep eutectic solvent using sodium borohydride as a reducing agent // *J Mol Liq.* – 2014. – Vol. 196. – P. 208–210. DOI: 10.1016/j.molliq.2014.03.024
24. Mertsalov D.F., Shchevnikov D.M., Lovtsevich L.V., Novikov R.A., Khrustalev V.N., Grigoriev M.S., Romanycheva A.A., Shetnev A.A., Bychkova O.P., Trenin A.S., Zaytsev V.P. The short route to chalcogenurea-substituted 3a,6-epoxyisoindoles via an intramolecular Diels–Alder furan (IMDAF) reaction. Antibacterial and antifungal activity // *New J Chem.* – 2024. – Vol. 48. – P. 12947–12959. DOI: 10.1039/d4nj01174k
25. Mertsalov D.F., Lovtsevich L.V., Shchevnikov D.M., Dobrushina Yu.M., Sorokina E.A., Grigoriev M.S., Zaytsev V.P. An intramolecular Diels–Alder reaction in the synthesis of N-aryl-3a,6-epoxyisoindole-2-carbothioamides // *Chem Heterocycl Compd.* – 2024. – Vol. 60. – P. 512–523. DOI: 10.1007/s10593-024-03369-1
26. Whiteman M., Li L., Rose P., Tan C.H., Parkinson D.B., Moore P.K. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – Vol. 12, No. 10. – P. 1147–1154. DOI: 10.1089/ars.2009.2899
27. Fathy M., Fawzy M.A., Hintzsche H., Nikaido T., Dandekar T., Othman E.M. Eugenol Exerts Apoptotic Effect and Modulates the Sensitivity of HeLa Cells to Cisplatin and Radiation // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24, No. 21. – P. 3979. DOI: 10.3390/molecules24213979
28. El-Demerdash E. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of methyl palmitate // *Toxicol Appl*

- Pharmacol. – 2011. – Vol. 254, No. 3. – P. 238–244. DOI: 10.1016/j.taap.2011.04.016
29. Plumb J.A., Milroy R., Kaye S.B. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay // *Cancer Res.* – 1989. – Vol. 49, No. 16. – P. 4435–4440.
 30. McComb R.B., Bond L.W., Burnett R.W., Keech R.C., Bowers G.N. Jr. Determination of the molar absorptivity of NADH // *Clin Chem.* – 1976. – Vol. 22, No. 2. – P. 141–150.
 31. Freyer D., Harms C. Kinetic Lactate Dehydrogenase Assay for Detection of Cell Damage in Primary Neuronal Cell Cultures // *Bio Protoc.* – 2017. – Vol. 7, No. 11. – P. e2308. DOI: 10.21769/BioProtoc.2308
 32. Potter T.M., Cedrone E., Neun B.W., Dobrovolskaia M.A. Detection of Nitric Oxide Production by the Macrophage Cell Line RAW264.7: Version 2. 2020. In: National Cancer Institute's Nanotechnology Characterization Laboratory Assay Cascade Protocols [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US). – 2005. NCL Method ITA-7.
 33. Cho S.J., Roman G., Yeboah F., Konishi Y. The road to advanced glycation end products: a mechanistic perspective // *Curr Med Chem.* – 2007. – Vol. 14, No. 15. – P. 1653–1671. DOI: 10.2174/092986707780830989
 34. Yeh W.J., Hsia S.M., Lee W.H., Wu C.H. Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings // *J Food Drug Anal.* – 2017. – Vol. 25, No. 1. – P. 84–92. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.10.017
 35. Spasov A.A., Brel A.K., Litvinov R.A., Lisina S.V., Kucheryavenko A.F., Budaeva Yu.N., Salaznikova O.A., Rashchenko A.I., Shamshina D.D., Batrakov V.V., Ivanov A.V. Evaluation of N-Hydroxy-, N-Methoxy-, and N-Acetoxybenzoyl-Substituted Derivatives of Thymine and Uracil as New Substances for Prevention and Treatment of Long-Term Complications of Diabetes Mellitus // *Russ J Bioorg Chem.* – 2018. – Vol. 44, No. 6. – P. 769–777. DOI: 10.1134/S1068162019010163
 36. Wynn T.A., Ramalingam T.R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease // *Nat Med.* – 2012. – Vol. 18, No. 7. – P. 1028–1040. DOI: 10.1038/nm.2807
 37. Fournet M., Bonté F., Desmoulière A. Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging // *Aging Dis.* – 2018. – Vol. 9, No. 5. – P. 880–900. DOI: 10.14336/AD.2017.1121
 38. Vona R., Pallotta L., Cappelletti M., Severi C., Matarrese P. The Impact of Oxidative Stress in Human Pathology: Focus on Gastrointestinal Disorders // *Antioxidants (Basel).* – 2021. – Vol. 10, No. 2. – P. 201. DOI: 10.3390/antiox10020201
 39. Makena P., Kikalova T., Prasad G.L., Baxter S.A. Oxidative Stress and Lung Fibrosis: Towards an Adverse Outcome Pathway // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24, No. 15. – P. 12490. DOI: 10.3390/ijms241512490
 40. Shroff A., Mamalis A., Jagdeo J. Oxidative Stress and Skin Fibrosis // *Curr Pathobiol Rep.* – 2014. – Vol. 2, No. 4. – P. 257–267. DOI: 10.1007/s40139-014-0062-y
 41. Verzijl N., DeGroot J., Ben Z.C., Brau-Benjamin O., Maroudas A., Bank R.A., Mizrahi J., Schalkwijk C.G., Thorpe S.R., Baynes J.W., Bijlsma J.W., Lefeber F.P., TeKoppele J.M. Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis // *Arthritis Rheum.* – 2002. – Vol. 46, No. 1. – P. 114–123. DOI: 10.1002/1529-0131(200201)46:1<114::AID-ART10025>3.0.CO;2-P
 42. Lloyd S.M., He Y. Exploring Extracellular Matrix Crosslinking as a Therapeutic Approach to Fibrosis // *Cells.* – 2024. – Vol. 13, No. 5. – P. 438. DOI: 10.3390/cells13050438
 43. Lyu C., Kong W., Liu Z., Wang S., Zhao P., Liang K., Niu Y., Yang W., Xiang C., Hu X., Li X., Du Y. Advanced glycation end-products as mediators of the aberrant crosslinking of extracellular matrix in scarred liver tissue // *Nat Biomed Eng.* – 2023. – Vol. 7, No. 11. – P. 1437–1454. DOI: 10.1038/s41551-023-01019-z
 44. Wang K., Wen D., Xu X., Zhao R., Jiang F., Yuan S., Zhang Y., Gao Y., Li Q. Extracellular matrix stiffness-The central cue for skin fibrosis // *Front Mol Biosci.* – 2023. – Vol. 10. – P. 1132353. DOI: 10.3389/fmolb.2023.1132353
 45. Liu R.M., Desai L.P. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis // *Redox Biol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 565–577. DOI: 10.1016/j.redox.2015.09.009
 46. Dong H., Zhang Y., Huang Y., Deng H. Pathophysiology of RAGE in inflammatory diseases // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 931473. DOI: 10.3389/fimmu.2022.931473
 47. Richter K., Kietzmann T. Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison // *Cell Tissue Res.* – 2016. – Vol. 365, No. 3. – P. 591–605. DOI: 10.1007/s00441-016-2445-3
 48. Peng X., Ma J., Chen F., Wang M. Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products // *Food Funct.* – 2011. – Vol. 2, No. 6. – P. 289–301. DOI: 10.1039/c1fo10034c
 49. Augustyniak A., Bartosz G., Cipak A., Duburs G., Horáková L., Luczaj W., Majekova M., Odysseos A.D., Rackova L., Skrzydlewska E., Stefek M., Strosová M., Tirzitis G., Venskutonis P.R., Viskupicova J., Vranka P.S., Zarković N. Natural and synthetic antioxidants: an updated overview // *Free Radic Res.* – 2010. – Vol. 44, No. 10. – P. 1216–1262. DOI: 10.3109/10715762.2010.508495
 50. Reddy V.P., Garrett M.R., Perry G., Smith M.A. Carnosine: a versatile antioxidant and antiglycating agent // *Sci Aging Knowledge Environ.* – 2005. – Vol. 2005, No. 18. – P. pe12. DOI: 10.1126/sageke.2005.18.pe12
 51. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Pugachenko I.S., Novikova N.N., Topunov A.F. Antiglycation and Antioxidant Effect of Nitroxyl towards Hemoglobin // *Antioxidants (Basel).* – 2022. – Vol. 11, No. 10. – P. 2007. DOI: 10.3390/antiox11102007
 52. Liu H., Huo X., Wang S., Yin Z. The inhibitory effects of natural antioxidants on protein glycation as well as aggregation induced by methylglyoxal and underlying mechanisms // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2022. – Vol. 212. – P. 112360. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2022.112360
 53. Intagliata S., Spadaro A., Lorenti M., Panico A., Siciliano E.A., Barbagallo S., Macaluso B., Kamble S.H., Modica M.N., Montenegro L. In Vitro Antioxidant and Anti-Glycation Activity of Resveratrol and Its Novel Triester with Trolox // *Antioxidants (Basel).* – 2020. – Vol. 10, No. 1. – P. 12. DOI: 10.3390/antiox10010012
 54. Caruso G., Di Pietro L., Cardaci V., Maugeri S., Caraci F.

- The therapeutic potential of carnosine: Focus on cellular and molecular mechanisms // *Curr Res Pharmacol Drug Discov.* – 2023. – Vol. 4. – P. 100153. DOI: 10.1016/j.crphar.2023.100153
55. Sirangelo I., Borriello M., Liccardo M., Scafuro M., Russo P., Iannuzzi C. Hydroxytyrosol Selectively Affects Non-Enzymatic Glycation in Human Insulin and Protects by AGEs Cytotoxicity // *Antioxidants (Basel).* – 2021. – Vol. 10, No. 7. – P. 1127. DOI: 10.3390/antiox10071127
56. Ibragimova U.M., Valuisky N.V., Sorokina S.A., Zhukova X.I., Raiberg V.R., Litvinov R.A. Antiglycation Activity of Isoindole Derivatives and Its Prediction Using Frontier Molecular Orbital Energies. *Mol Biol (Mosk).* – 2024. – Vol. 58, No. 6. – P. 1052–1060. DOI: 10.1134/S0026893324700638
57. Speck K., Magauer T. The chemistry of isoindole natural products // *Beilstein J Org Chem.* – 2013. – Vol. 9. – P. 2048–2078. DOI: 10.3762/bjoc.9.243

АВТОРЫ

Ибрагимова Умида Махсатовна — ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-9141-4417. E-mail: iumida888@gmail.com

Валуйский Никита Вадимович — лаборант-исследователь лаборатории метаболитных лекарственных средств ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0009-0000-8539-6590. E-mail: Ajl024FiB@gmail.com

Райберг Виолетта Романовна — лаборант-исследователь лаборатории метаболитных лекарственных средств ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0009-0002-8217-8381. E-mail: vita.raiberg@gmail.com

Сорокина Светлана Александровна — лаборант-исследователь лаборатории метаболитных лекарственных средств ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0009-0000-3110-0213. E-mail: sveta.sorokina182839@gmail.com

Жукова Ксения Ивановна — лаборант-исследователь лаборатории метаболитных лекарственных средств ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0009-0006-7454-8337. E-mail: zhukovaksenia11@gmail.com

Дерягин Денис Константинович — студент

4 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0009-0008-8427-0222. E-mail: denis_deryagin777@mail.ru

Ухоренко Илья Сергеевич — студент 3 курса лечебного факультета ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0009-0005-7613-4317. E-mail: Uxorenko@gmail.com

Григорьева Алеся Александровна — бакалавр 4 года обучения кафедры органической химии РУДН. ORCID ID: 0009-0001-9297-5379. E-mail: elenaaa448@gmail.com

Щевников Дмитрий Михайлович — аспирант 2 года обучения кафедры органической химии РУДН. ORCID ID: 0009-0000-9485-6341. E-mail: shchevnikov.dm@gmail.com

Зайцев Владимир Петрович — кандидат химических наук, доцент кафедры органической химии РУДН. ORCID ID: 0000-0001-9175-7583. E-mail: zaytsev-vp@rudn.ru

Литвинов Роман Александрович — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории метаболитных лекарственных средств ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; генеральный директор ООО «Инновита». ORCID ID: 0000-0002-0162-0653. E-mail: litvinov_r@innovita.com