

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Научная статья

УДК 615.011

doi: 10.19163/1994-9480-2022-19-4-94-103

ПРОИЗВОДНЫЕ 3-АРИЛИДЕН-2-ОКСИНДОЛА КАК АНАЛОГИ МЕЛАТОНИНА, ОБЛАДАЮЩИЕ АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ И СНИЖАЮЩИЕ ВНУТРИГЛАЗНОЕ ДАВЛЕНИЕ

**А.А. Спасов¹, Л.В. Науменко¹, Д.С. Яковлев^{1,3}, А.С. Таран^{1,3}, Е.В. Соколова¹, В.Г. Клочков¹,
А.В. Борисов¹, Е.Н. Безсонова², А.М. Ефремов², Н.А. Лозинская², Д.А. Бабков¹**

¹Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия

Автор, ответственный за переписку: Александр Алексеевич Спасов, aspasov@mail.ru

Резюме. Цель. Глаукома – это целая группа заболеваний, причиной которых является повышенное внутриглазное давление (ВГД), приводящее к атрофии зрительного нерва и необратимой слепоте. Мелатонин обладает широким спектром биологической активности, включая антиоксидантную и антиглаукомную, однако его применение ограничивается недостаточной стабильностью и длительностью действия. Для поиска новых, более эффективных антиглаукомных средств среди производных 3-арилиден-2-оксиндола, аналогов мелатонина, выполнен поиск ингибиторов хинооксидоредуктазы 2 (NQO2), определена антиоксидантная активность и изучено влияние активных соединений на внутриглазное давление.

Материалы и методы. Изучение ингибирующей активности в отношении NQO2 оценивали кинетическим методом с использованием менадиона и *N*-бензил-дигидроникотинамида в качестве субстрата и ко-субстрата, соответственно. Антирадикальную активность изучали по снижению супероксид-зависимой люминесценции в реакционной среде, содержащей гемоглобин, люминол и перекись водорода с помощью микропланшетного ридера Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия), а также по тестам связывания свободных радикалов OH[•], АБТС и ДФПГ. Оценка цитотоксичности проводили с применением стандартного МТТ-теста на клетках линии MCF-7 и HepG2. Внутриглазное давление у лабораторных животных измеряли с помощью контактного ветеринарного тонометра Tonovet (Финляндия).

Результаты. Производные 3-арилиден-2-оксиндола продемонстрировали значительную антиоксидантную активность. Выявлен также ряд ингибиторов NQO2. Наиболее активное соединение ингибирует NQO2 человека с ИК₅₀ 0,4 мкМ. Данное соединение показало также антирадикальную активность, связывая супероксид-анион с ИК₅₀ 6,1 мкМ, превосходя мелатонин по обоим показателям, и низкую цитотоксичность. При местном применении 0,4%-го раствора соединение снижало внутриглазное давление интактных крыс на (40,9 ± 6,4) %, при этом не обладало системным гипотензивным действием.

Заключение. Производные 3-арилиден-2-оксиндола являются перспективными для поиска лекарственных средств для терапии заболеваний глаза, связанных с повышенным внутриглазным давлением или оксидативным стрессом, таких как глаукома, увеит и диабетическая ретинопатия.

Ключевые слова: 2-оксиндол, ингибиторы хинон оксидоредуктазы 2, NQO2, внутриглазное давление

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ, проект 22-15-20025.

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

3-ARILIDENE-2-OXYNDOLE DERIVATIVES AS MELATONIN ANALOGUES WITH ANTIOXIDANT AND INTRAOCULAR PRESSURE LOWERING PROPERTIES

**A.A. Spasov¹, L.V. Naumenko¹, D.S. Yakovlev^{1,3}, A.S. Taran^{1,3}, E.V. Sokolova¹, V.G. Klochkov¹,
A.V. Borisov¹, E.N. Bezsonova², A.M. Efremov², N.A. Lozinskaya², D.A. Babkov¹**

¹Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³Volgograd Medical Scientific Center, Volgograd, Russia

© Спасов А.А., Науменко Л.В., Яковлев Д.С., Таран А.С., Соколова Е.В.,
Клочков В.Г., Борисов А.В., Безсонова Е.Н., Ефремов А.М.,
Лозинская Н.А., Бабков Д.А., 2022

Corresponding author: Alexander A. Spasov, aspasov@mail.ru

Resume. Aim. Glaucoma is a whole group of diseases caused by increased intraocular pressure (IOP), leading to atrophy of the optic nerve and irreversible blindness. Melatonin has a wide range of biological activity, including antioxidant and antiglaucoma, but its use is limited by insufficient stability and duration of action. To search for new, more effective antiglaucoma agents among derivatives of 3-aryliden-2-oxindole, melatonin analogues, a search for quinonoxidoreductase 2 (NQO2) inhibitors was performed, antioxidant activity was determined and the effect of active compounds on intraocular pressure was studied.

Materials and methods. The study of inhibitory activity against NQO2 was evaluated kinetically using menadione and *N*-benzyl-dihydronicotinamide as substrate and co-substrate, respectively. Antiradical activity was studied for reducing superoxide-dependent luminescence in a reaction medium containing hemoglobin, luminol and hydrogen peroxide using the Infinite M200 PRO microplate reader (Tecan, Austria), as well as for free radical binding tests $\text{OH}^\bullet$, ABTS and DPPH. Cytotoxicity assessment was carried out using a standard MTT test on MCF-7 and HepG2 line cells. Intraocular pressure in laboratory animals was measured using a contact veterinary tonometer Tonovet (Finland).

Results. Derivatives of 3-aryliden-2-oxindole have demonstrated significant antioxidant activity. A number of NQO2 inhibitors have also been identified. The most active compound inhibits human NQO2 with an IC_{50} of 0,4 μM . The compound also showed anti-radical activity, binding the superoxide anion to IC_{50} of 6,1 μM , superior to melatonin on both counts, and low cytotoxicity. With topical application of a 0,4% solution, the compound reduced the intraocular pressure of intact rats by $(40,9 \pm 6,4) \%$, while not having a systemic hypotensive effect.

Conclusion. Derivatives of 3-aryliden-2-oxindole are promising for drug discovery for the treatment of eye diseases associated with increased intraocular pressure or oxidative stress, such as glaucoma, uveitis and diabetic retinopathy.

Keywords: 2-oxindole, quinone oxidoreductase 2 inhibitors, NQO2, intraocular pressure

Funding. The research was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation, project 22-15-20025.

Глаукома является прогрессирующей оптической нейропатией и ведущей причиной необратимой слепоты. Заболевание обычно характеризуется повышенным внутриглазным давлением (ВГД). ВГД в настоящее время является единственным модифицируемым фактором риска, который чаще всего лечится местными офтальмогипотензивными препаратами [1].

Нейрогормон мелатонин, производное индола, вырабатывается не только шишковидной железой, но и несколькими структурами глаза – в частности в сетчатке, радужной оболочке, цилиарном теле, хрусталике и слезных железах [2]. Обобщение литературных данных, полученных в проведенных ранее исследованиях на разных живых организмах (птицы, кролики, крысы, человек), позволило предположить следующее распределение мелатониновых рецепторов в структуре глаза: в роговице встречаются все три вида рецепторов; в хрусталике MT2 и MT3; в цилиарном теле MT2; в склере MT1 и MT2; в сосудистой оболочке MT1; в сетчатке расположены все три вида рецепторов, их соотношение зависит от слоя сетчатки [3]. Одной из физиологических ролей мелатонина является снижение внутриглазного давления (ВГД), что предположительно реализуется через взаимодействие с мелатониновыми рецепторами 1-го типа в цилиарном теле. Однако в одном из исследований высказано предположение, что рецептор MT3 является цитозольным ферментом (хинонредуктазой 2) [4]. В отличие от MT1 и MT2, MT3 не связывается с G-белками, имеет 95%-ю гомологию с человеческой хинонредуктазой 2 – цитозольным ферментом, который катализирует восстановление хинонов, таких как менадион и кофермент Q. В настоящее время накоплено большое

количество доказательств участия оксидативного стресса в развитии многих глазных заболеваний, включая катаракту, глаукому, возрастную макулярную дегенерацию (ВМД) и диабетическую ретинопатию. Известно, что мелатонин ингибирует NRH:хинон оксидоредуктазу 2 (NQO2), проявляя антиоксидантную активность [5]. Также мелатонин обладает собственной выраженной антирадикальной и противовоспалительной активностью, может активировать цитопротекторные ферменты, способен поддерживать оптимальный мембранный потенциал митохондрий, сохранять митохондриальные функции и улучшать митохондриальный биогенез, чем ослабляет или противодействует окислительному стрессу и регулирует клеточный метаболизм [6]. Все это делает его перспективным средством для лечения заболеваний глаза, связанных с повышенным внутриглазным давлением и оксидативным стрессом.

Недостатком мелатонина как офтальмологического лекарственного средства является его низкая стабильность и непродолжительность действия, а также слишком широкий спектр биологической активности. В настоящее время поиск структурных аналогов мелатонина является предметом активных исследований, которые, тем не менее, часто касаются соединений с низким структурным разнообразием, сохраняя метокси- и амидную группу, присутствующие в молекуле мелатонина. В настоящей работе мы исследовали 3-арилиден производные 2-оксиндола в качестве изостеров мелатонина для определения их влияния на активность NQO2, антирадикальных свойств и способности снижать внутриглазное давление.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Поиск новых, более эффективных антиглаукомных средств – ингибиторов хиноноксидоредуктазы 2 (NQO2), определение антиоксидантной активности и изучение влияния активных соединений на внутриглазное давление.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Исследуемые соединения были синтезированы на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», как описано ранее [7].

Животные. Все процедуры с животными в исследовании проводились в соответствии с общепринятыми этическими нормами манипуляций с животными. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351.000.3-96 и 51000.4-96), Приказу МЗ и СР РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики», а также отвечали директивам 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г по охране животных, используемых в научных целях. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» IRB 00005839 IORG 0004900, OHRP, Свидетельство № 2021/056 от 15.06.2021. Животные содержались в условиях вивария ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России при температуре 24 °С и относительной влажности 60 % при естественном световом цикле со свободным доступом к корму и воде.

Определение активности NQO2. Изучение ингибирующей активности соединений в отношении рекомбинантной NQO2 человека (Sigma #Q0380, США) оценивали кинетическим методом с использованием менадиона и *N*-бензил-дигидроникотинамида (BNAH) в качестве субстрата и ко-субстрата соответственно. Все реагенты и тестируемые вещества разводили в 50 мМ Neres-KOH, pH 7.4, с добавлением 1 мМ β-октил-D-глюкопиранозид, 0,1 мг/мл БСА и 1 мМ ФАД. В 96-луночный планшет с плоским дном вносили 50 мкл исследуемых веществ в конечной концентрации 10 мкМ для первичного скрининга, а для изучения концентрационной зависимости веществ использовали диапазон конечных концентраций от 10 нМ до 100 мкМ. В качестве препарата сравнения использовали кверцетин. Вещества преинкубировали 5 минут с 50 мкл человеческой рекомбинантной NQO2 (конечная концентрация 42 нг/мл). После вносили 25 мкл менадиона

в конечной концентрации 100 мкМ. Реакцию запускали 25 мкл 100 мкМ BNAH. Измерения проводят по убыванию флуоресценции ко-субстрата BNAH при длине волны возбуждения 370 нм и длине волны испускания 440 нм в условиях постоянной температуры 37 °С.

Связывание гидроксильного радикала. Связывание $\text{OH}^{\bullet}$ радикала изучали по снижению люминесценции в реакционной среде, содержащей гемоглобин, люминол и перекись водорода. Для разведения всех реактивов использовали 50 мМ PBS (pH 7,4). В белый 96-луночный планшет вносили 25 мкл 0,2 мг/мл раствора гемоглобина, 100 мкл 100 мкМ ЭДТА, 25 мкл исследуемого вещества. Для первичного скрининга конечная концентрация исследуемых веществ составляла 100 мкМ, для концентрационного исследования использовался диапазон конечных концентраций от 64 нМ до 1 мМ, конечная концентрация ДМСО не превышала 2 %. В качестве препарата сравнения использовался Тролокс. После вносили 50 мкл раствора люминола (конечная концентрация 1 мкМ), соблюдая непопадание прямого света на реагент. Реакцию запускали 50 мкл 0,025%-го раствора H_2O_2 и тут же переносили планшет в микропланшетный ридер Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия) для регистрации люминесценции в течение 30 минут с интервалом в 20 сек. Расчет ингибирования свободнорадикального процесса производили по величине площадей под кривыми сигнал-время.

Связывание радикала ДФПГ. Связывание $\text{DPP}^{\bullet}$ радикала определяли по изменению оптической плотности спиртового раствора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ, DPPH). Конечная концентрация веществ составляла 100 мкМ. Все реактивы и исследуемые соединения растворяли в 95%-м этиловом спирте. В микропланшет вносили 200 мкл 0,5 мМ раствора ДФПГ, 20 мкл исследуемого вещества или этилового спирта. В качестве препаратов-сравнения использовали тролокс и кверцетин. Для определения активности соединений измеряли оптическую плотность полученной смеси спектрофотометрически при λ_{max} 517 нм в микропланшетном ридере Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия) через 24 ч. Для предотвращения испарения спиртовых растворов, на время между определениями, микропланшет заклеивался специальной пленкой.

Связывание радикала АБТС. Связывание радикала $\text{ABTS}^{\bullet}$ определяли по изменению оптической плотности спиртового раствора 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазол-6-сульфоновой кислоты) (АБТС, ABTS). Генерацию радикала обеспечивает добавление в реакционную среду системы пероксид водорода (конечная

концентрация 0,025 %) – гемоглобин (1 мг/мл) реактива АБТС (конечная концентрация 150 мкМ). В микропланшет добавляли 50 мкл раствора АБТС*, 50 мкл этилового спирта и 50 мкл раствора исследуемых веществ или препаратов сравнения. Для скрининга использовалась концентрация 100 мкМ, после выявления соединений-лидеров проводилось исследование в диапазоне концентраций от 25,6 нМ до 1 мМ. Концентрацию АБТС* определяли спектрофотометрически при длине волны 734 нм с использованием микропланшетного ридера Tecan Infinite M200 PRO (Tecan, Австрия).

Определение цитотоксичности. Оценку цитотоксичности наиболее активных соединений проводили с помощью МТТ-теста [8] на клетках эпителиальных линий MCF-7 (аденокарцинома протоков молочной железы человека, ATCC® HTB-22™) и HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека, ATCC® HB-8065™). Культивацию проводили в ростовой среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 1%-го раствора незаменимых аминокислот (Sigma-Aldrich, США), раствора пирувата натрия 2 мМ (Sigma-Aldrich, США) для MCF-7 либо ростовой среде F-12 (ПанЭко, Россия), содержащей 0,002М L-глутамин (ПанЭко, Россия) для HepG2, с добавлением 10%-й эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия), 1%-го пенициллина-стрептомицина (Gibco, США), в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Вещества исследовали в диапазоне концентраций от 0,01–100 мкМ с инкубацией в течение 48 ч. Жизнеспособность клеток, коррелирующую со способностью митохондриальных дегидрогеназ превращать МТТ-реагент (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) в формазан, определяли по данным оптической плотности при 555 нм (референсная длина волны 650 нм) с использованием планшетного ридера CLARIOstar (BMG LabTech, США). Обработку данных и расчет CC₅₀ (концентрация, подавляющая жизнедеятельность клеток на 50 % относительно интактного контроля) проводили с помощью программного обеспечения MARS Data Analysis Software и GraphPad Prism v.7.0.

Определение внутриглазного давления у крыс. Изучение влияния производных 3-арилиден-2-оксиндола на внутриглазное давление проводили на лабораторных животных – беспородных крысах обоего пола (питомник «Рапполово», Ленинградская обл.) методом тонометрии по методике с помощью контактного ветеринарного тонометра Topovet iCare (Финляндия), позволяющего осуществлять измерение без использования поверхностной анестезии роговицы. Всем животным в правый (тестируемый) глаз закапывали 0,4%-е растворы исследуемых веществ или препарата

сравнения в объеме 50 мкл, в левый (контрольный) глаз инстиллировали деионизированную воду в том же объеме. Внутриглазное давление измеряли в обоих глазах в течение четырех часов каждый час. Левый глаз, в свою очередь, служил для оценки возможного резорбтивного действия исследуемых соединений.

Расчет молекулярных свойств. Для каждого соединения выполнен расчет характеристик, относящихся к лекарственному подобию, включая молекулярный вес M , показатель липофильности $cLogP$, количество доноров и акцепторов водородных связей H_{Donors} и $H_{Acceptors}$, количество атомов галогенов $N_{Halogens}$, количество тяжелых атомов N_{Heavy} , площадь полярной поверхности PSA . Все описанные расчеты выполнены с помощью программы OSIRIS DartaWarrior (Idorsia, Inc.).

Расчет проницаемости роговицы для соединений. Расчет показателя проницаемости роговицы глаза для соединений $LogPapp$ выполнен в соответствии с двумя ранее опубликованными QSAR-моделям [9, 10] по уравнениям:

$$LogPapp_1 = -4,002 - 0,169 \times (H_{Acceptors} + H_{Donors}) + 0,265 \times LogP$$

$$LogPapp_2 = -4,6823 - 0,767 \times Log(PSA) - 0,1346 \times H_{Donors} + 3,0024 \times N_{Halogens}/N_{Heavy}$$

Статистическая обработка. Статистическую обработку проводили в Prism 8.0 (GraphPad Inc.) с расчетом среднего арифметического и стандартного отклонения. При сравнении групп использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Величины полуэффективных концентраций определяли с помощью нелинейной 3-параметрической регрессии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Производные 3-арилиден-2-оксиндола были синтезированы и исследованы как структурные аналоги мелатонина. Из 8 исследованных на ингибирующую активность NQO2, 6 соединений по величине IC₅₀ существенно превосходили активность мелатонина. Возможно, это связано с большим сродством данных соединений к ФАД-ассоциированному центру связывания за счет плоской π-сопряженной системы. Соединения 1, 2 и 8 показали максимальное ингибирование, общим в их структуре является наличие электронодонорных заместителей в 3-фенилиденовом фрагменте. Соединения 4 и 6 оказались лишены активности.

По способности связывать супероксид-анион соединения 1-4 были наиболее активными, превосходя мелатонин. Производные 5 и 6 уступали ему, а 7 и 8 не проявили антирадикальную активность. Выявлено, что наибольшей NQO2-ингибирующей

активностью и антирадикальным действием обладают соединения, содержащие электронодонорные заместители в 3-арилитеновом фрагменте. Стерические особенности мало влияли на антиоксидантную активность.

Для предварительной оценки фармакокинетических свойств соединений был выполнен расчет их основных физико-химических свойств. Полученные

значения были использованы для определения расчетной проницаемости соединений через покровы глаза с использованием ранее опубликованных QSAR-моделей. Показано, что согласно прогнозу, исследуемые соединения обладают способностью преодолевать роговицу сопоставимо с мелатонином. Соединения 6 и 7 превосходили мелатонин по этому показателю согласно обеим моделям (табл. 1, 2, рис. 1–3).

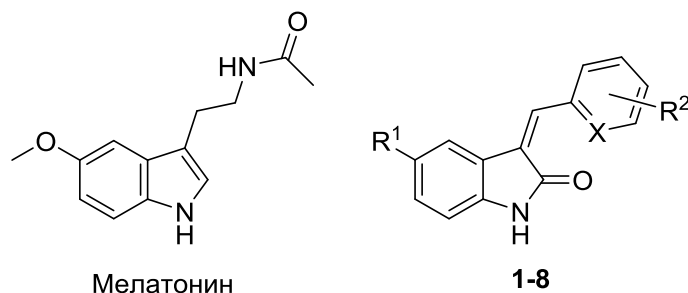


Рис. 1. Химическая структура мелатонина и исследуемых веществ 1–8, его структурных аналогов

Таблица 1

Биологическая активность исследованных соединений *in vitro*

Соединение	R ¹	R ²	X	NQO2 ИК ₅₀ ± SE, мкМ
1	CH ₃ OCONH	OH	CH	0,40 ± 0,06
2	Фурил-CONH	OH	CH	0,43 ± 0,02
3	Фенил-CONH	OH	CH	3,99 ± 0,36
4	NO ₂	H	N	>100
5	CH ₃ OCONH	NO ₂	CH	1,51 ± 0,29
6	H	H	N	>100
7	–	–	–	0,87 ± 0,20
8	CH ₃ CONH	3,4,5-(CH ₃ O) ₃	CH	0,45 ± 0,06
Мелатонин	–	–	–	63,5 ± 26,7
Кверцетин	–	–	–	0,08 ± 0,02
Тролокс	–	–	–	–

*Статистическая значимость к контролю (Манна – Уитни), $p > 0,05$.

Таблица 2

Антиоксидантная активность исследованных соединений *in vitro*

Соединение	Связывание OH [•] , ИК ₅₀ ± SE, мкМ	Связывание DPP [•] , m ± SD, 100 мкМ, %	Связывание ABTS [•] %, m ± SD, 100 мкМ, % (ИК ₅₀ ± SE, мкМ)
1	6,1 ± 1,6	16,96 ± 0,90*	89,79 ± 0,63* (18,16 ± 3,95)
2	6,47 ± 1,50	2,51 ± 3,21	79,04 ± 3,23* (35,99 ± 3,45)
3	8,61 ± 1,80	3,62 ± 0,73	85,80 ± 2,65* (104,9 ± 2,12)
4	8,49 ± 2,30	19,27 ± 5,55	49,40 ± 3,43* (>100)
5	57,8 ± 5,5	–4,81 ± 1,16	–4,54 ± 3,79
6	67,4 ± 12,8	–0,41 ± 0,87	4,49 ± 0,63
7	>100	1,78 ± 2,56	5,35 ± 7,83
8	>100	–1,40 ± 0,63	35,10 ± 7,91
Мелатонин	21,3 ± 2,8	3,16 ± 0,89	98,76 ± 3,01* (4,56 ± 0,76)
Кверцетин	0,302 ± 0,019	79,62 ± 0,64*	61,45 ± 0,90* (79,57 ± 4,36)
Тролокс	5,75 ± 0,41	90,45 ± 0,13*	102,10 ± 2,48* (37,80 ± 11,38)

*Статистическая значимость к контролю (Манна – Уитни), $p < 0,05$.

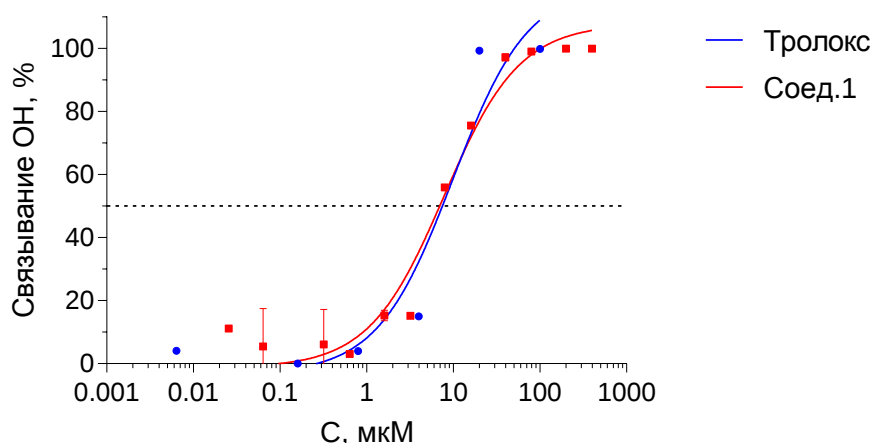


Рис. 2. Связывание $\text{OH}^\bullet$ тролоксом и соединением 1 в зависимости от конечной концентрации, %

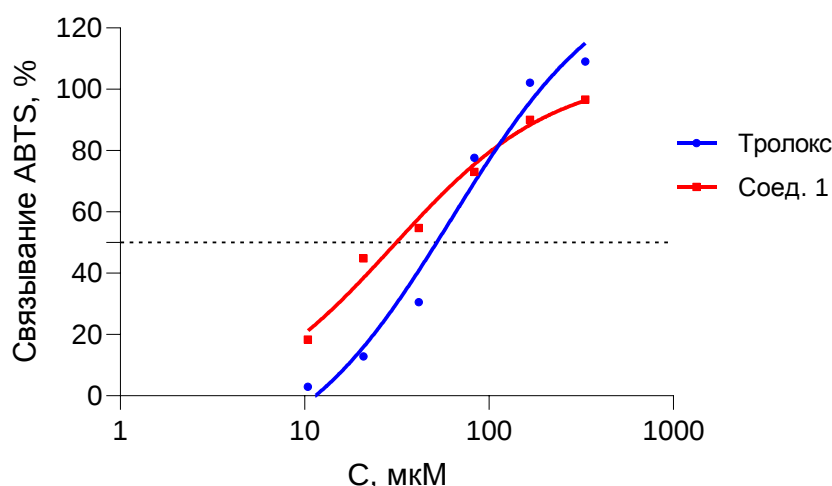


Рис. 3. Связывание $\text{ABTS}^{\bullet-}$ тролоксом и соединением 1 в зависимости от конечной концентрации, %

Таким образом, в результате в качестве соединения-лидера было выбрано соединение **1**, которое сочетает ингибирующую NQO2 человека активность (IK_{50} 0,4 мкМ) с антирадикальной активностью (IK_{50} по связыванию супероксид-аниона 6,1 мкМ), превосходя мелатонин по обоим показателям (табл. 3).

Учитывая предполагаемое местное применение (инстилляционная в глаза), для наиболее перспективного соединения **1** предварительно была оценена цитотоксичность на стабильных линиях клеток (MCF-7, HepG2). Показано, что величина средней цитотоксической концентрации превышает величину 100 мкМ как для соединения **1** ($R^2 = 0,9$), так и для мелатонина ($R^2 = 0,9$) после 48 часовой инкубации в МТТ-тесте, что соответствует веществам с низкой цитотоксичностью. Далее, соединение **1** было исследовано *in vivo* на наличие офтальмогипотензивного действия. При местном применении 0,4%-го раствора соединение **1** приводило к снижению ВГД

опытных крыс на $(40,9 \pm 6,4) \%$, не оказывая значимого влияния на величину ВГД коллатерального глаза, что позволяет предположить отсутствие системного гипотензивного действия. Инстилляционная 0,4%-го раствора мелатонина приводила к максимальному снижению ВГД на $(28,0 \pm 11,3) \%$ (рис. 4).

Для обоих соединений развитие максимального офтальмогипотензивного эффекта наступало через 3 часа после применения.

Показано, что среди мелатониновых биоизостеров — производных 3-арилден-2-оксидола наибольшей NQO2-ингибирующей активностью обладают соединения, содержащие электронодонорные заместители в 3-арилденном фрагменте (**1**, **2**, **7**, **8**). Наиболее активное соединение **1** ингибирует NQO2 человека с IK_{50} 0,4 мкМ и проявляет антирадикальную активность, связывая супероксид-анион с IK_{50} 6,1 мкМ, превосходя мелатонин по обоим показателям (21,3 мкМ).

Таблица 3

Расчетные физико-химические характеристики соединений

Соединение	<i>cLogP</i>	Н-Акцепторы	Н-Доноры	Площадь полярной поверхности	<i>LogPapp₂</i>	<i>LogPapp₁</i>
Мелатонин	1,47	4	2	54,12	-6,28	-4,63
1	1,83	6	3	87,66	-6,58	-5,04
2	2,26	6	3	91,57	-6,59	-4,93
3	3,07	5	3	78,43	-6,54	-4,54
4	0,53	6	1	88,06	-6,31	-5,04
5	1,25	8	2	113,25	-6,53	-5,36
6	1,32	3	1	41,99	-6,06	-4,33
7	2,05	3	1	46,17	-6,09	-4,14
8	1,76	7	2	85,89	-6,43	-5,06

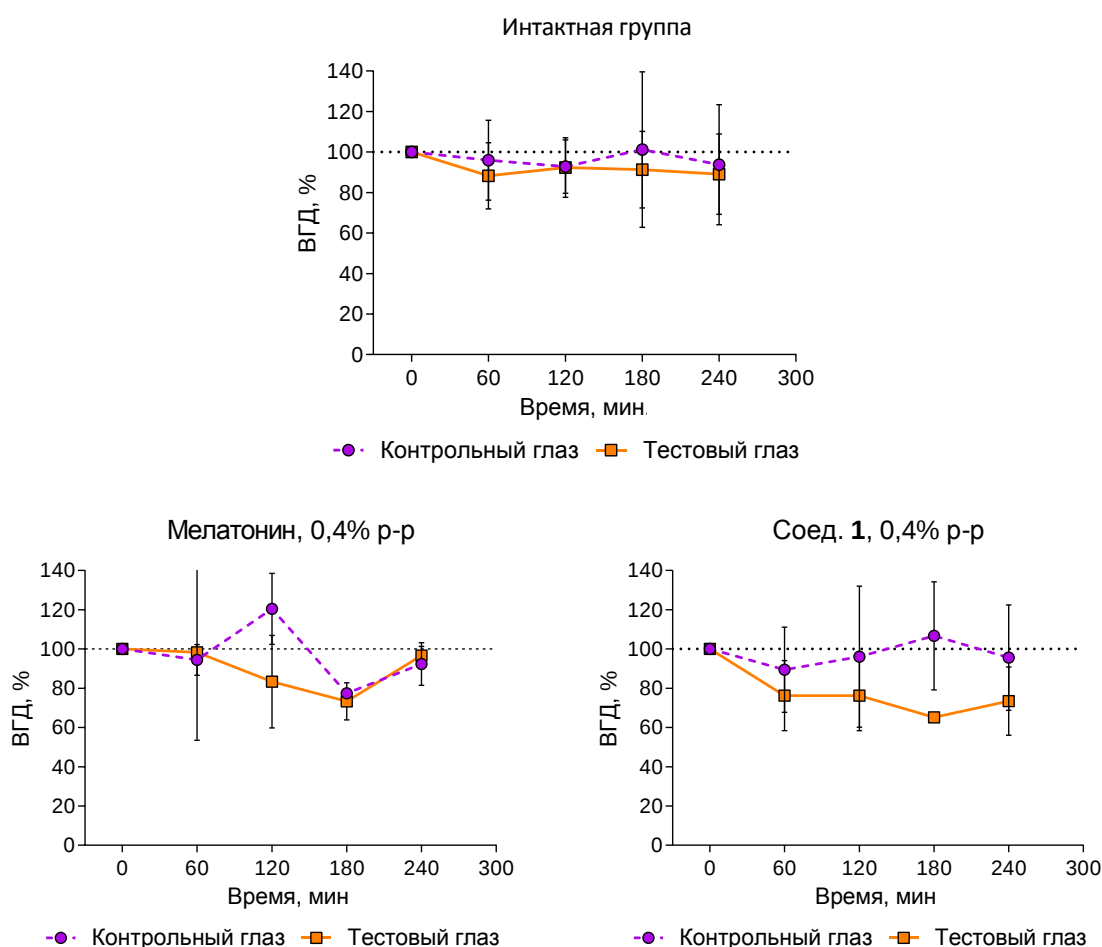


Рис. 4. Влияние мелатонина и соединения 1 на ВГД интактных крыс, % (среднее $\pm$ SD, $n = 3$)

Соединение отличается низкой цитотоксичностью по отношению к фибробластам крыс. Согласно расчетным данным, оно обладает достаточной способностью проникать через роговицу глаза.

При местном применении соединение **1** в концентрации 0,4 % приводило к снижению внутриглазного давления исследуемых животных на $(40,9 \pm 6,4)$ %, при этом не проявляя системное действие

и превосходя по офтальмогипотензивной активности препарат сравнения мелатонин, $(28,0 \pm 11,3)$ %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, исследованные производные 3-арилден-2-оксиндола, которые являются биоизостерами мелатонина, а, проявили себя как перспективный

класс соединений при поиске новых лекарственных средств для терапии заболеваний глаза, связанных с повышенным ВГД или оксидативным стрессом, таких как глаукома, увеит и диабетическая ретинопатия, а также могут быть использованы в качестве фармакофоров с целью модификации структур и получения более эффективных соединений.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Sustained release glaucoma therapies: Novel modalities for overcoming key treatment barriers associated with topical medications / A. Belamkar, A. Harris, R. Zukerman [et al.] // *Annals of Medicine*. 2022. No. 1 (54). P. 343–358.
2. Influence of Circadian Rhythm in the Eye: Significance of Melatonin in Glaucoma / A. Martínez-Águila, A. Martín-Gil, C. Carpena-Torres [et al.] // *Biomolecules*. 2021. No. 3 (11). P. 340.
3. Alkozi H.A. Melatonin and melanopsin in the eye: friends or foes? // *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2019. No. 1 (85). P. 49–59.
4. Molecular and cellular pharmacological properties of 5-methoxycarbonylamino-*N*-acetyltryptamine (MCA-NAT): a nonspecific MT3 ligand / L. Vincent, W. Cohen, P. Delagrangé [et al.] // *Journal of Pineal Research*. 2010. No. 3 (48). P. 222–229.
5. Boutin J.A. Quinone reductase 2 as a promising target of melatonin therapeutic actions // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2016. No. 3 (20). P. 303–317.
6. Role of melatonin in human eye physiology and its implications for ophthalmic diseases treatment (Review) / N.S. Khodzhaev, A.A. Stadnikov, A.D. Chuprov [et al.] // *Ophthalmology in Russia*. 2021. No. 2 (18). P. 234–239.
7. Synthesis and biological evaluation of 3-substituted 2-oxindole derivatives as new glycogen synthase kinase 3 β inhibitors / N.A. Lozinskaya, D.A. Babkov, E.V. Zaryanova [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2019. No. 9 (27). P. 1804–1817.
8. Оптимизация МТТ-теста для определения цитотоксичности новых химических соединений на клеточной линии MCF-7 / Д.С. Яковлев, К.Т. Султанова, Е.А. Золотова [и др.] // *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 2020. № 1. С. 58–61.
9. Thombre A.G., Himmelstein K.J. Quantitative evaluation of topically applied pilocarpine in the precorneal area // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1984. No. 2 (73). P. 219–222.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информация об авторах

Александр Алексеевич Спасов – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7185-4826>

Алёна Сергеевна Таран – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной фармакологии, Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8477-254X>, alena-beretta-taran@mail.ru.

10. Carbonic anhydrase inhibitors: *in vitro* inhibition of α isoforms (hCA I, hCA II, bCA III, hCA IV) by flavonoids / D. Ekinici, L. Karagoz, D. Ekinici [et al.] // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2013. No. 2 (28). P. 283–288.

REFERENCES

1. Belamkar A., Harris A., Zukerman R. et al. A. Sustained release glaucoma therapies: Novel modalities for overcoming key treatment barriers associated with topical medications. *Annals of Medicine*. 2022;1(54):343–358.
2. Martínez-Águila A., Martín-Gil A., Carpena-Torres C., Pastrana C., Carracedo G. Influence of Circadian Rhythm in the Eye: Significance of Melatonin in Glaucoma. *Biomolecules*. 2021;3(11):340.
3. Alkozi H. A. Melatonin and melanopsin in the eye: friends or foes? *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2019;1(85):49–59.
4. Vincent L., Cohen W., Delagrangé P., Boutin J. A., Nosjean O. Molecular and cellular pharmacological properties of 5-methoxycarbonylamino-*N*-acetyltryptamine (MCA-NAT): a nonspecific MT3 ligand. *Journal of Pineal Research*. 2010;3(48):222–229.
5. Boutin J.A. Quinone reductase 2 as a promising target of melatonin therapeutic actions. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2016;3(20):303–317.
6. Khodzhaev N.S., Stadnikov A.A., Chuprov A.D., Kim S.M., Marshinskaya O.V. Role of melatonin in human eye physiology and its implications for ophthalmic diseases treatment (Review). *Ophthalmology in Russia*. 2021;2(18):234–239.
7. Lozinskaya N.A., Babkov D.A., Zaryanova E.V. et al. Synthesis and biological evaluation of 3-substituted 2-oxindole derivatives as new glycogen synthase kinase 3 β inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2019;9(27):1804–1817.
8. Yakovlev D.S., Sultanova K.T., Zolotova E.A., Gasajnieva A.G., Spasov A.A. Optimization of the MTT test to determine the cytotoxicity of new chemical compounds on the MCF-7 cell line. *Volgogradskij nauchno-meditsinskij zhurnal = Volgograd Scientific and Medical Journal*. 2020;1:58–61. (In Russ.).
9. Thombre A. G., Himmelstein K. J. Quantitative evaluation of topically applied pilocarpine in the precorneal area. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1984;2(73):219–222.
10. Ekinici D., Karagoz L., Ekinici D., Senturk M., Supuran C.T. Carbonic anhydrase inhibitors: *in vitro* inhibition of α isoforms (hCA I, hCA II, bCA III, hCA IV) by flavonoids. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2013;2(28):283–288.

Людмила Владимировна Науменко – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2119-4233>, milanaumenko@mail.ru

Елена Вячеславовна Соколова – аспирант кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4914-2507>, Sokolova210795@gmail.com

Владлен Геннадиевич Клочков – кандидат фармацевтических наук, ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9645-3324>, klochkovvladlen@gmail.com

Александр Владимирович Борисов – научный сотрудник лаборатории сердечно-сосудистых средств, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0202-0008>, borissow1978@rambler.ru

Наталья Александровна Лозинская – кандидат химических наук, доцент кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-2518-3694>, natalylozinskaya@mail.ru

Александр Михайлович Ефремов – аспирант кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1777-7081>, sash-ka.e@yandex.ru

Елена Николаевна Безсонова – аспирант кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9804-5447>, zetsu45999@mail.ru

Денис Александрович Бабков – кандидат химических наук, доцент кафедры фармакологии и биоинформатики, старший научный сотрудник лаборатории метаболитных лекарственных средств, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, denis.a.babkov@gmail.com

Дмитрий Сергеевич Яковлев – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной фармакологии, Волгоградский научный медицинский центр, Волгоград, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8980-6016>, dypharm@list.ru

Статья поступила в редакцию 14.10.2022; одобрена после рецензирования 28.11.2022; принята к публикации 06.12.2022.

The authors declare no conflicts of interests.

Information about the authors

Alexander A. Spasov – Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7185-4826>

Alyona S. Taran – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology and Bioinformatics, Volgograd State Medical University, Junior Researcher at the Laboratory of Experimental Pharmacology, Volgograd Medical Research Center, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8477-254X>, alena-beretta-taran@mail.ru

Lyudmila V. Naumenko – MD, Associate Professor, Professor of the Department of Pharmacology and Bioinformatics, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2119-4233>, milanaumenko@mail.ru

Elena V. Sokolova – Postgraduate Student of the Department of Pharmacology and Bioinformatics, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4914-2507>, Sokolova210795@gmail.com

Vladlen G. Klochkov – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Assistant of the Department of Pharmacology and Bioinformatics, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9645-3324>, klochkovvladlen@gmail.com

Alexander V. Borisov – Researcher at the Laboratory of Cardiovascular Drugs, Research Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0202-0008>, borissow1978@rambler.ru

Natalia A. Lozinskaya – Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor of the Department of Medical Chemistry and Fine Organic Synthesis, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-2518-3694>, natalylozinskaya@mail.ru

Alexander M. Efremov – Postgraduate Student of the Department of Medical Chemistry and Fine Organic Synthesis of the Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1777-7081>, sash-ka.e@yandex.ru

Elena N. Bezsonova – Postgraduate Student of the Department of Medical Chemistry and Fine Organic Synthesis of the Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9804-5447>, zetsu45999@mail.ru

Denis A. Babkov – Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology and Bioinformatics, Senior Researcher at the Laboratory of Metabotropic Medicines, Research Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, denis.a.babkov@gmail.com

Dmitry S. Yakovlev – MD, Associate Professor, Professor of the Department of Pharmacology and Bioinformatics, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia, Senior Researcher at the Laboratory of Experimental Pharmacology, Volgograd Scientific Medical Center, Volgograd, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8980-6016>, dypharm@list.ru

The article was submitted 14.10.2022; approved after reviewing 28.11.2022; accepted for publication 06.12.2022.