Оригинальное исследование
УДК 615.015;577.151.042
http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2025-2-13

IN SILICO И IN VITRO ИССЛЕДОВАНИЕ БЛОКАТОРОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ 2 И 9 НА ОСНОВЕ ОКСИМОВ ПРОИЗВОДНЫХ ХРОМОНА

Дмитрий Игоревич Поздняков[1]✉, Диана Романовна Буржумова[2], Аркадий Вальтерович Арльт[3], Кристина Хореновна Саркисян[4]

[1,2,3]Пятигорский медико-фармацевтический институт, Пятигорск, Россия
[1]✉pozdniackow.dmitry@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0002-5595-8182
[2]diana.mirzahanova18@mail.ru, https://orcid.org/0009-0009-3360-148X
[3]arltav@bk.ru, https://orcid.org/0000-0001-5721-0613
[4]kristyfarm@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0002-1756-0026

Аннотация. В работе изучается ингибирующая активность оксимов производных хромона по отношению к матриксным металлопротеиназам 2 и 9 типов с применением *in silico* и *in vitro* тестов. Методом молекулярного докинга анализировали изменение энергии связывания изучаемых соединений, а также стандартных ингибиторов с указанными ферментами. Предварительно оценивали соответствие исследуемых веществ критериям лекарствооподобия. В ходе *in vitro* теста определяли IC_{50} μM/мл для каждого изучаемого соединения и стандартного ингибитора. В ходе проведенного исследования было показано, что все анализируемые оксимы производных хромона соответствуют критериям лекарствоподобия, а их энергия связывания с активным центром матриксных металлоротеиназ 2 и 9 не отличается от таковой у стандартных ингибиторов. В тоже время *in vitro* анализ показал, что наиболее выраженной ингибирующей активностью (сравнимой с референтами) обладают 6-метил и 6-метокси-замещенные оксимы производных хромона. Таким образом, представляется актуальным дальнейшее изучение 6-метил и 6-метокси-замещенных оксимов производных хромона в качестве блокаторов матриксных металлопротеиназ 2 и 9 типов.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы, оксимы, производные хромона, лекарствоподобие, молекулярный докинг

Для цитирования: In silico и in vitro исследование блокаторов матриксных металлопротеиназ 2 и 9 на основе оксимов производных хромона / Д.И. Поздняков, Д.Р. Буржумова, А.В. Арльт и др. // Дальневосточный медицинский журнал. – 2025. – № 2. – С. 75-79. http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2025-2-13.

IN SILICO AND IN VITRO STUDY OF BLOCKERS OF MATRIX METALLOPROTEINASES 2 AND 9 BASED ON OXYMES OF CHROMONE DERIVATIVES

Dmitry I. Pozdnyakov[1]✉, Diana R. Burzhumova[2], Arkady V. Arlt[3], Kristina Kh. Sarkisyan[4]

[1,2,3]Pyatigorsk Medical-pharmaceutical Institute, Pyatigorsk, Russia
[1]✉pozdniackow.dmitry@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0002-5595-8182
[2]diana.mirzahanova18@mail.ru, https://orcid.org/0009-0009-3360-148X
[3]arltav@bk.ru, https://orcid.org/0000-0001-5721-0613
[4]kristyfarm@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0002-1756-0026

Abstract. The inhibitory activity of chromone derivative oximes in relation to matrix metalloproteinases of types 2 and 9 is studied using *in silico* and *in vitro* tests. The molecular docking method was used to analyze the change in binding energy of the studied compounds, as well as standard inhibitors with tested enzymes. The compliance of the studied substances with the criteria of drug-likeness was preliminarily assessed. During the *in vitro* test, IC_{50} μM/ml was determined for each tested compound and a standard inhibitor. In the course of the study, it was shown that all analyzed chromone derivatives oximes meet the criteria of drug similarity, and their binding energy to the active center of matrix metalloproteinases 2 and 9 does not differ from that of standard inhibitors. At the same time, *in vitro* analysis showed that 6-methyl and 6-methoxy-substituted oximes of chromone derivatives have the most pronounced inhibitory activity

(comparable to the reference ones). Thus, it seems relevant to further study 6-methyl and 6-methoxy-substituted oxime of chromone derivatives as blockers of matrix metalloproteinases of types 2 and 9.

Keywords: matrix metalloproteinases, oximes, chromone derivatives, drug-likeness, molecular docking

For citation: In silico and in vitro study of blockers of matrix metalloproteinases 2 and 9 based on oxymes of chromone derivatives / D.I. Pozdnyakov, D.R. Burzhumova, A.V. Arlt, et al. // Far Eastern medical journal. – 2025. – № 2. – P. 76-79. http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2025-2-13.

Матриксные металлопротеиназы (ММП) – группа цинк-зависимых эндопептидаз, участвующих в деградации межклеточного матрикса. ММП представляют собой группу ферментов с высокой субстратной специфичностью, на основании чего выделяют несколько классов МПП: коллагеназы (ММП 1, 18, 13), желатиназы (ММП 2, 9), стромелизины (ММП 3, 10, 11, 19) матрилизины (ММП 7, 26), макрофагальная эластаза (ММП-12) и мембранные ММП. Физиологическая роль МПП сводится к регуляции ангиогенеза, ремоделирования костной ткани, менструального цикла, регенерации и нейрогенеза [1]. Однако сверхэкспрессия МПП может негативно отражаться на функциональном состоянии органов и тканей, что в свою очередь приводит к развитию ряда МПП-ассоциированных патологий. Повышение активности ММП играет существенную роль в патогенезе артрита, онкологических заболеваний, глаукомы, черепно-мозговой травмы [2]. В патофизиологическом аспекте наиболее изученными МПП являются ММП-2 и ММП-9. Данные желатиназы играют одну из ключевых ролей в формировании отека головного мозга при черепно-мозговой травме, когнитивных нарушений, активируют реакции апоптоза и фиброгенез [3, 4]. В связи с этим ММП, в частности, ММП-2 и ММП-9, представляют собой перспективные фармакотерапевтические мишени, что актуализирует разработку ингибиторов данных ферментов. Наиболее известным классом соединений, обладающих ММП-ингибирующими свойствами, являются производные гидроксамовой кислоты (маримастат, приномастат, ципемастат), которые находятся на разных этапах жизненного цикла лекарственных средств. Одним из главных недостатков гидроксаматов является неселективный характер действия, заключающийся в блокаде каталитической активности не только ММП, но и других ферментов, например, ФНО-α-превращающего фермента, что в свою очередь способствует развитию ряда нежелательных лекарственных реакций (повреждение скелетных мышц), регистрируемых в клинических исследованиях [5]. К числу негидроксаматных ингибиторов ММП можно отнести соединения, проявляющие выраженные металл-хелатирующие свойства: карбоксилаты и гидантоины [5]. Одними из перспективных блокаторов ММП могут вещества, содержащие оксимную группу. Оксимы, прежде всего, известны в качестве антидотов, используемых при отравлении антихолинэстеразными средствами необратимого действия, но могут проявлять и различные плейотропные эффекты, например, противовоспалительный или антинеопластический [6]. Также важно, что оксимы являются предшественниками гидроксаматов (для получения используется реакция Кастаньоли-Кушмана), которые имеют аналогичные функциональные группы (N-OH), отвечающие за блокаду ММП [6].

Цель исследования – оценить ММП-ингибирующие свойства некоторых оксимов производных хромона *in silico* и *in vitro*.

Материалы и методы

Анализируемые оксимы производных хромона были получены на кафедре органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института под руководством профессора, д.ф.н. Оганесяна Э.Т. Структуры соединений 3-[(E)-(гидроксимино)метил]-4H-1-бензопиран-4-он (шифр ХТ-1); 6-фторо-4-оксохромен-3-карбальдегид оксим (шифр ХТ-2), 6-хлор-4-оксо-хромен-3-карбальдегид оксим (шифр ХТ-3), 6-йод-4-оксо-4H-1-бензопиран-3-карбальдегид оксим (шифр ХТ-4), 6-метил-4-оксо-хромен-3-карбальдегид оксим (шифр ХТ-5) и 6-метокси-4-оксо-хромен-3-карбальдегид оксим (шифр ХТ-6) были подтверждены методом ЯМР-спектроскопии. С целью определения соответствия анализируемых соединений критериям лекарствоподобия (правило Липински) использовали *web* сервис SwissADME. *In silico* прогноз вероятности взаимодействия исследуемых соединений с ферментами ММП-2 и ММП-9 осуществляли методом молекулярного докинга с применением возможностей сервиса SwissDock в модификации Attracting Cavities 2.0 [7]. Структуры ферментов соответствовали PDB 4H3X (ММП-9) и PDB 8H78 (ММП-2).

In vitro скрининг ММП-ингибириующих свойств анализируемых оксимов проводили применяя спектрофотометрический метод детекции изменения окраски хромогенного субстрата на фоне блокады ММП-2 и ММП-9 специфическими ингибиторами или анализируемыми веществами. В качестве стандартного ингибитора ММП-2 использовали *цис*-9-октадеценоил-N-гидроксиламид (Sigma-Aldrich, Германия, далее ONGA), блокатора ММП-9 – N-изобутил-N-(4-метоксифенилсульфонил)глицилгидроксамовую кислоту (Sigma-Aldrich, Германия, далее NMGH). Ход анализа: в лунки планшета добавляли буферный раствор для колориметрии (90 μл в холостую пробу, 70 μл – в контрольную пробу, 50 μл – в пробы со стандартным ингибитором или раствором

анализируемого вещества), затем к контрольной и опытным пробам добавляли раствор фермента ММП-2 и ММП-9 соответственно (9 ЕД/мл) и вносили в соответствующие позиции растворы двукратных разведений стандартных ингибиторов или анализируемых веществ в диметилсульфоксиде (диапазон концентраций двукратных разведений составил 1 мг/мл, 500 μг/мл, 250 μг/мл, 125 μг/мл и 62,5 μг/мл) в объеме 20 μл. Пробы инкубировали при 37 ˚С 60 минут, после чего вносили 10 μл раствора ММП-субстрата (тиопептолид) в концентрации 100 μМ. Далее считывали оптическую плотность образцов при 412 нм с интервалом 2 мин. на протяжение 20 мин. На основании полученных данных строили график зависимости «оптическая плотность-время реакции», определяли показатель наклона графика функциональной зависимости. Далее рассчитывали процент ингибирования активности ферментов, равный отношению показателя наклона графика функциональной зависимости контрольного образца и показателя наклона графика функциональной зависимости образца со стандартным ингибитором или анализируемым соединением. Процент ингибирования использовали для расчета коэффициента полуингибирования (IC_{50}), значение которого выражали в μМ/мл [8]. Все тесты выполнялись в триплетном варианте. Результаты представлены в виде M (среднее значение) ± SD (стандартное отклонение). Нормальность рядов данных оценивали в тесте Шапиро-Уилка, однородность дисперсий в тесте Левене. Сравнение полученных показателей осуществляли методом однофакторного дисперсионного анализа с пост-процессингом по Тьюки. Различия между сравниваемыми показателями считались значимыми при $p<0,05$. IC_{50} μМ/мл рассчитывали методом пробит-анализа. В ходе статистического анализа данных применяли программный пакет StatPlus 7.0 (AnalystSoft, США).

Результаты и обсуждение

Важным критерием для определения перспективности изучения новых фармакологически активных соединений является соответствие анализируемой молекулы критериям лекарствоподобия, сформулированными Lipinski C.A., et al., 2001: в структуре вещества не должно присутствовать более 5 водорододонорных групп, не более 10 акцепторов водородных групп, молекулярная масса не должна превышать 500, коэффициент распределения Моригучи – не более 4,15 [9]. Результаты оценки лекарствоподобия анализируемых соединений представлены в таблице 1. Как видно из полученных данных все изучаемые вещества соответствуют критериям «правила пяти» Lipinski C.A., et al., 2001 (табл. 1).

Таблица 1 – Результаты оценки соответствия анализируемых соединений критериям лекарствоподобия (Lipinski C.A., et al., 2001)

Соединение	ХТ-1	ХТ-2	ХТ-3	ХТ-4	ХТ-5	ХТ-6
Количество доноров водородной связи	1	1	1	1	1	1
Количество акцепторов водородной связи	4	4	4	4	5	5
Молекулярная масса	189,17	203,19	223,61	315,06	207,16	219,19
Коэффициент распределения Моригучи	0,14	0,43	0,70	0,98	0,56	0,13

Проведенный молекулярный докинг позволил установить, что при моделировании взаимодействия изучаемых веществ и стандартных ингибиторов с ММП-2 и ММП-9 имеется 48 интерактирующих кластеров. Было продемонстрировано, что средняя энергия взаимодействия (по всем 48 кластерам) анализируемых соединений достоверно не отличается от таковой у стандартных ингибиторов, что предполагает наличие у исследуемых оксимов ММП-ингибирующих свойств (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты молекулярного докинга для изучаемых соединений с ферментами ММП-2 и ММП-9

Соединение	Энергия взаимодействия с ММП-2, ккал/моль	Энергия взаимодействия с ММП-9, ккал/моль
ХТ-1	-6,05±0,09	-6,13±0,12
ХТ-2	-6,47±0,09	-6,47±0,1
ХТ-3	-6,59±0,12	-6,5±0,12
ХТ-4	-6,75±0,09	-6,17±0,09
ХТ-5	-6,31±0,11	-6,69±0,14
ХТ-6	-6,73±0,06	-6,98±0,07
ONGA	-7,61±0,12	-
NMGH	-	-7,7±0,12

Примечание. Во всех случаях $p<0,05$.

Оценка ММП-ингибирующих свойств анализируемых соединений показала, что максимальный процент ингибирования ММП-2 и ММП-9 у исследуемых веществ достоверно не отличался от аналогичного показателя у стандартных ингибиторов. В тоже время наиболее выраженные ММП-2 блокирующие свойства были установлены для соединений под шифрами ХТ-5 и ХТ-6, IC_{50} которых был достоверно ($p<0,05$) ниже, чем у остальных исследуемых соединений (табл. 3). ММП-9 ингибирующая активность также была выше у веществ ХТ-5 и ХТ-6, при этом IC_{50} значимо не отличался от такового у референта.

В итоге было показано, что анализируемые оксимы производных хромона обладают ММП-ингибирующими свойствами. В частности, для метил- и метокси-замещенных веществ под шифрами ХТ-5 и ХТ-6 были получены показатели IC_{50} (как для ММП-2, так и для ММП-9) статистически значимо не отличающиеся от таковых у ингибиторов-референтов. 6-галоген-замещенные оксимы

производных хромона характеризовались менее выраженной ММП-блокирующей активностью, чем соединения, содержащие в своей структуре метильную и метоксильную группу в 6 положении. Полученное различие в уровне активности для оксимов хромонов может объясняться более выраженным (чем у атомов галогенов) положительным мезомерным эффектом метоксильного заместителя, в результате чего электронная плотность сопряженной системы смещается с формированием координационных центров, в результате чего повышается сродство к ферменту. Подобный эффект был установлен Leite, 2009 при изучении ММП-1 блокирующих свойств лекарственных препаратов – производных оксикама [10]. Полученные данные актуализируют дальнейшее изучение оксимов хромона. Учитывая выраженный нейротропный характер действия некоторых соединений, содержащих скаффолд хромона [11], ММП-ингибирующие свойства веществ, анализируемых в данной работе, могут открывать определенные перспективы для их дальнейшего исследования в условиях экспериментальных моделей заболеваний, в которых активация ММП играет особую патогенетическую роль, например, черепно-мозговой травме.

Таблица 3 – Результаты оценки ММП-ингибирующих свойств анализируемых соединений

Соединение	Максимальный % ингибирования ММП-2	Максимальный % ингибирования ММП-9	ММП-2 IC_{50}, μМ/мл	ММП-9 IC_{50}, μМ/мл
ХТ-1	87,9±0,39	86,8±0,3	4,9±0,07#Δα	3,9±0,21* Δα
ХТ-2	87,1±0,46	89,2±0,29	3,8±0,03# Δα	3,4±0,14* Δα
ХТ-3	82,3±0,62	85,5±0,16	5,1±0,07# Δα	3,6±0,05* Δα
ХТ-4	89,2±0,43	91,7±0,45	4,3±0,13# Δα	4,2±0,04* Δα
ХТ-5	81,5±0,81	82,9±0,43	2,4±0,0195	2,3±0,04
ХТ-6	92,2±0,36	93,6±0,88	2,6±0,05	2,2±0,09
ONGA	95,3±0,9	-	2,1±0,01	-
NMGH	-	96,0±0,79	-	2,0±0,06

Примечание. # – достоверно относительно ONGA (тест Тьюки $p<0,05$); * – достоверно относительно NMGH (тест Тьюки $p<0,05$); Δ – достоверно относительно соединения ХТ-5 (тест Тьюки $p<0,05$); α – достоверно относительно соединения ХТ-6 (тест Тьюки $p<0,05$).

Выводы

1. Исследуемые оксимы производных хромона соответствуют критериям лекарствоподобия Lipinski C.A., et al., 2001.

2. Результаты молекулярного докинга показали, что энергия связывания анализируемых соединений с активным центром ММП-2 и ММП-9 достоверно не отличается от таковой у стандартных ингибиторов *цис*- 9-октадеценоил-N-гидроксиламида и N-изобутил-N-(4-метоксифенилсульфонил)глицилгидроксамовой кислоты.

3. *In vitro* анализ позволил установить, что в ряду изучаемых оксимов производных хромона наиболее выраженными ММП-ингибирующими свойствами обладают 6-метил и 6-метокси-замещенные соединения под шифрами ХТ-5 и ХТ-6 соответственно.

Список источников

1. Biel C., Faber K.N., Bank R.A., Olinga P. Matrix metalloproteinases in intestinal fibrosis // Journal of Crohn's and Colitis. – 2024. – № 3. – P. 462-478.
2. De Almeida L.G.N., Thode H., Eslambolchi Y. Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology // Pharmacol Rev. – 2022. – T. 74, № 3. – P. 714-770.
3. Park S.-B., Jung S.H., Jin H., Kim S.J. Bioluminescence Imaging of Matrix Metalloproteinases-2 and -9 Activities in Ethanol-injured Cornea of Mice // In Vivo. – 2021. – T. 35, № 3. – P. 1521-1528.
4. Barichello T., Generoso J.S., Michelon C.M.. Inhibition of matrix metalloproteinases-2 and -9 prevents cognitive impairment induced by pneumococcal meningitis in Wistar rats // Exp Biol Med (Maywood). – 2014. – T. 239, № 2. – P. 225-231.
5. Fischer T., Riedl R. Challenges with matrix metalloproteinase inhibition and future drug discovery avenues // Expert Opinion on Drug Discovery. – 2021. – T. 16, № 1. – P. 75-88.
6. Schepetkin I.A., Plotnikov M.B., Khlebnikov A.I., Plotnikova T.M. Oximes: Novel Therapeutics with Anticancer and Anti-Inflammatory Potential // Biomolecules. – 2021. – T. 11, № 6. – P. 777.
7. Röhrig U.F.,Goullieux M., Bugnon M., Zoete V. Attracting Cavities 2.0: Improving the Flexibility and Robustness for Small-Molecule Docking // J. Chem. Inf. Model. – 2023. – T. 63, № 12. – P. 3925-3940.
8. Weingarten H., Feder J. Spectrophotometric assay for vertebrate collagenase // Analytical Biochemistry. – 1985. – T. 147, № 2. – P. 437-440.
9. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1 // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2001. – T. 46, № 1-3. – P. 3-26.
10. Leite SRDA. Inhibitors of human collagenase, MMP1 // Eclet Quim. – 2009. – T. 34. – P. 87-102.

11. Pozdnyakov D.I., Voronkov A.V., Rukovitsyna V.M. Chromon-3-aldehyde derivatives restore mitochondrial function in rat cerebral ischemia // Iranian Journal of Basic Medical Sciences. – 2020. – Т. 23, № 9. – P. 1172-1183.

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.
The authors declare no conflicts of interests.

Статья принята к публикации 12.04.2025.
The article was accepted for publication 12.04.2025.

❑❑❑