

©Коллектив авторов

ВОЗМОЖНОСТИ ОЦЕНОК *IN SILICO* ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ФАРМКОМПОЗИЦИИ ФИТОЛАДАПТОГЕН, ЦИТОТОКСИЧНОЙ ДЛЯ КЛЕТОК РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

Н.С. Ионов^{1*}, М.А. Барышникова², Е.В. Бочаров², П.В. Погодин¹, А.А. Лагунин¹, Д.А. Филимонов¹, Р.В. Карпова², В.С. Косоруков², И.С. Стилиди², В.Б. Матвеев², О.А. Бочарова², В.В. Поройков¹

¹Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; *эл. почта: ionov.nikita.serg@gmail.com

²Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина,
115478, Москва, Каширское шоссе, 23

На основе прогноза спектров биологической активности для ряда вторичных метаболитов лекарственных растений с использованием компьютерной программы PASS и валидации результатов предсказаний *in vitro* определено приоритетное направление разработки фармацевтической композиции Фитоадаптоген (ФЛА). Анализируемая фармацевтическая композиция представляет собой комплекс структурно разнообразных низкомолекулярных органических соединений, в том числе биологически активных веществ фитоадаптогенов (гинзенозидов из женьшеня, родионина из родиолы розовой и других), составленный с учётом ранее разработанных фармкомпозиций. Были рассмотрены два варианта фармацевтической композиции — мажорный (22 соединения) и минорный (13 соединений). Для мажорного варианта фармацевтической композиции вероятность наличия активности превышает вероятность её отсутствия для 1400 из 1945 прогнозируемых PASS фармакологических эффектов и механизмов действия. Широкий набор прогнозируемых активностей, главным образом, обусловлен низким структурным сходством соединений между собой. Прогноз *in silico* указывает на возможность проявления противоопухолевого действия в отношении рака мочевого пузыря, желудка, толстой кишки, яичников и шейки матки как минорным, так и мажорным составами ФЛА. Установлено, что наивысшие вероятностные оценки проявления активности прогнозируются для трёх механизмов, которые, по оценке программы PharmaExpert, связаны с противоопухолевым эффектом в отношении рака мочевого пузыря: агонист апоптоза, стимулятор каспазы-3 и ингибитор транскрипционного фактора NF-κB. Экспериментальная валидация была проведена *in vitro* на клеточной линии рака мочевого пузыря человека RT-112. В результате МТТ теста по определению цитотоксического действия мажорного и минорного вариантов фармкомпозиции установлено, что цитотоксичность мажорного набора выше, чем минорного. Также в экспериментах *in vitro* двумя методами — двойным окрашиванием аннексином V и йодидом пропидия, а также детектированием в клетках активной каспазы 3 — подтверждена гибель опухолевых клеток рака мочевого пузыря по механизму апоптоза. Полученные экспериментальные данные соответствуют результатам прогноза и свидетельствуют о преимуществах мажорного состава ФЛА. ФЛА может служить основой для разработки препарата с противоопухолевой активностью в отношении рака мочевого пузыря. Прогнозируемая PASS противоопухолевая активность для других нозологий указывает направления дальнейших исследований.

Ключевые слова: природные соединения; гинзенозиды; родионин; оценка *in silico*; PASS; PharmaExpert; валидация *in vitro*

DOI: 10.18097/PBMC20216703278

ВВЕДЕНИЕ

Согласно статистическим данным, в настоящее время злокачественные новообразования входят в десятку наиболее частых причин смертности в странах с высоким уровнем дохода [1]. При этом количество ежегодно регистрируемых случаев заболевания раком постоянно растёт. В 2020 году было выявлено 19,3 млн новых случаев. При этом, по экспертным оценкам, при сохранении текущей динамики роста к 2040 году количество новых случаев достигнет 28,4 млн. [2]. В связи с этим возрастает актуальность поиска и разработки новых эффективных фармакологических веществ с противоопухолевой активностью.

Природные биологически активные вещества (БАВ), в сравнении с синтетическими, характеризуются более высоким химическим разнообразием и широким набором проявляемых видов биологической активности [3]. Известно, что с 1981 по 2019 гг.

более 70% всех лекарств разработаны на основе природных соединений [4]. Исследования природных веществ в качестве источника новых противоопухолевых соединений продолжают с 1950 года. Как результат, в настоящее время природные соединения составляют свыше 60% от всех низкомолекулярных веществ, используемых в терапии новообразований [5]. При этом высокий фармакологический потенциал природных соединений, а также современный уровень развития методов химического синтеза позволяют рассматривать их в качестве перспективных “кандидатов” для поиска новых веществ с противоопухолевой активностью.

Скрининг *in vitro* с целью выявления биологической активности отдельных природных соединений, определение их фармакодинамических, фармакокинетических и токсикологических характеристик является длительным и ресурсоёмким процессом [6]. Применение методов оценки *in silico* даёт возможность определить перспективные



направления исследований и, как следствие, снизить временные и финансовые издержки на разработку препаратов, особенно включающих комплексы природных соединений.

Фитоадаптоген (ФЛА) — новая фармацевтическая композиция, представляющая собой масляный раствор суммы природных соединений, в том числе БАВ фитоадаптогенов (гинзенозидов из женьшеня, родионина из родиолы розовой и др.), частично входящих в разработанную ранее фармкомпозицию, проявляющую противоопухолевое действие, а также антимуtagenные, антиоксидантные, иммуномодулирующие, в том числе адгезиогенные и интерферогенные эффекты [7, 8].

Целью данной работы была компьютерная оценка профилей противоопухолевого действия минорного и мажорного состава фармкомпозиции ФЛА с использованием компьютерных программ PASS и PharmaExpert, а также валидация полученных *in silico* результатов в экспериментах *in vitro*.

МЕТОДИКА

Исследуемая фармацевтическая композиция

Структурные формулы основных фитокомпонентов, из которых составлены два варианта фармкомпозиции ФЛА — мажорной (22 соединения) и минорной (13 соединений) — приведены на рисунке 1.

Компьютерная программа PASS

Спектры биологической активности отдельных фитокомпонентов были оценены с использованием новой версии компьютерной программы PASS —

PASS 2020 Refined, прогнозирующей 1945 видов активности со средней точностью около 97% [9].

Входной информацией для компьютерной программы PASS являются структурные формулы лекарственно-подобных веществ, представленные в формате SDF. Результатом расчёта является список биологических активностей, прогнозируемых для отдельных соединений, а также соответствующие оценки вероятности: Pa — наличия и Pi — отсутствия активности.

Для проведения прогноза структуры молекул должны отвечать следующим требованиям [10]:

- молекулярная масса молекулы должна быть в диапазоне от 50 до 1250 атомных единиц массы;
- молекула должна быть электронейтральной;
- в состав молекулы должно входить не менее 3 атомов углерода.

Оценка сходства структур химических соединений

В процессе работы мы оценили сходство отдельных фитокомпонентов мажорного и минорного составов между собой. Оценка сходства проводилась с использованием MNA-дескрипторов и коэффициента Танимото. Коэффициент Танимото (T) рассчитывали по формуле 1.

$$T = \frac{N_c}{(N_a + N_b - N_c)} \quad (1)$$

где N_a — количество элементов в множестве a ; N_b — количество элементов в множестве b ; N_c — количество элементов в пересечении множеств a и b .

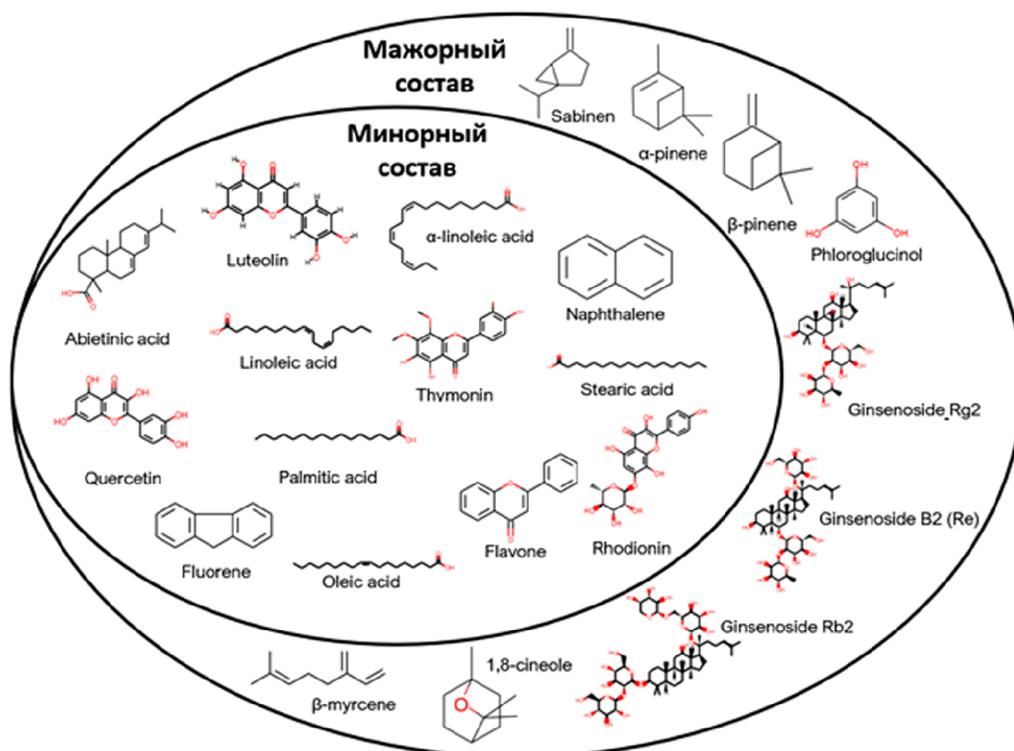


Рисунок 1. Структурные формулы фитокомпонентов, входящих в мажорный и минорный варианты фармацевтической композиции Фитоадаптоген.

MNA-дескрипторы — представление структурной формулы, в котором учитываются валентности и заряды атомов, явно указываются все атомы водорода и не учитываются типы связей. Рекурсивная схема генерации MNA-дескрипторов имеет следующий вид [11]:

- дескриптор MNA 0-го уровня — метка X самого атома;
- дескриптор MNA любого следующего уровня представляют собой условное обозначение структурного фрагмента $X(D_1D_2...D_i...)$, где D_i — дескриптор MNA предыдущего уровня для i -го непосредственного соседа данного атома с меткой A.

При этом генерация MNA дескрипторов может быть продолжена до любого уровня.

Пример представления структуры химического соединения в виде MNA-дескрипторов представлен на рисунке 2.

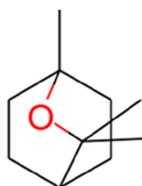
Компьютерная программа PharmaExpert

Анализ интегрального действия смеси фитокомпонентов с учётом возможных межлекарственных взаимодействий проводили с помощью программы PharmaExpert.

Входной информацией компьютерной программы PharmaExpert являются результаты прогноза PASS. На основе базы знаний о более чем 15 тысячах известных взаимосвязей между фармакологическими эффектами и механизмами действия PharmaExpert позволяет проводить анализ между предсказанными видами биологической активности, оценку возможных положительных и отрицательных межлекарственных взаимодействий, а также поиск фитокомпонентов с несколькими механизмами действия [12, 13].

In vitro оценка цитотоксичности фармацевтических композиций. МТТ-тест

Для оценки цитотоксической активности фармацевтических композиций использовали МТТ-тест, впервые предложенный Mosmann [14].



MNA/1	MNA/2
HC	C(C(CCC-H)C(CC-H-H)-H(C)-H(C))
CHNC	C(C(CCC-H)O(C)-C(C-H-H-H)-C(C-H-H-H))
CHNC	C(C(CCO-C)C(CC-H-H)-H(C)-H(C))
CHCC	C(C(CC-H-H)C(CC-H-H)C(CO-C-C)-H(C))
CHCCO	C(C(CC-H-H)C(CC-H-H)O(CC)-C(C-H-H-H))
OCC	O(C(CCO-C)C(CO-C-C)) -H(C(CCC-H)) -H(C(CC-H-H)) -H(C(C-H-H-H)) -C(C(CCO-C)-H(C)-H(C)-H(C)) -C(C(CO-C-C)-H(C)-H(C)-H(C))

Рисунок 2. Представление химической структуры 1,8-цинеола в виде MNA-дескрипторов первого и второго уровней.

3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) — жёлтый водорастворимый тетразолиевый краситель, который проникает через плазматическую и митохондриальные мембраны клетки. В митохондриях жизнеспособных и гликолитически активных клеток МТТ восстанавливается действием NAD- или NADPH-зависимых дегидрогеназ в нерастворимый фиолетовый формазан. Количество выработанного в результате этой реакции формазана зависит от числа клеток и их жизнеспособности. Когда эта реакция завершается, оставшиеся жизнеспособные клетки погибают, формазан растворяют и измеряют оптическую плотность, которая отражает количество клеток, представленное в конце оцениваемого периода.

Исследование проводили на клеточной линии рака мочевого пузыря человека линии RT112 из банка клеточных культур Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина. Клетки культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), 10 мМ HEPES (“Sigma”, США), 2 мМ L-глутамин (“Sigma”), 40 нг/мл гентамицина (“ICN”, США), аминокислоты, пируват натрия и раствор витаминов (“ПанЭко”, Россия), при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки рассаживали в 180 мкл полной среды RPMI-1640 в 96-луночные плоскодонные планшеты (“Costar”, США) по 5 тыс. клеток на лунку. Через сутки в лунки с клетками добавляли исследуемые экстракты в разведениях с шагом в 2 раза (по 20 мкл/лунку). Каждую исследуемую концентрацию повторяли в трёх лунках. В контрольные лунки с клетками добавляли по 20 мкл среды, которую использовали для приготовления разведений экстрактов. Планшеты с клетками, обработанными ФЛА, инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 24 ч, после чего добавляли в лунки 20 мкл раствора МТТ [3-(4,5-диметилтиазолин-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид] (исходный раствор 5 мг/мл, конечная концентрация 1 мг/мл), и инкубировали 4 ч при 37°C в 5% CO₂. После образования формазана надосадочную жидкость удаляли, осадок растворяли в 150 мкл диметилсульфоксида. Далее планшеты помещали на 10 мин в термостат при температуре 37°C для растворения кристаллов формазана, затем 10 мин встряхивали на шейкере для равномерного распределения в лунках раствора кристаллов формазана, после чего интенсивность окрашивания среды измеряли на фотометрическом анализаторе иммуноферментных реакций Multiskan EX (“Thermo Labsystems”, Китай) при λ=540 нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток.

Цитотоксичность определяли в процентах (Ц, %) по формуле (2):

$$Ц = \left(1 - \frac{O_0}{O_K}\right) \times 100\% \quad (2)$$

где O_K — оптическая плотность в контрольных лунках; O_0 — оптическая плотность в опытных лунках.

Определение механизма клеточной гибели. Двойное окрашивание аннексином V и йодидом пропидия

Механизм клеточной гибели определяли с помощью метода двойного окрашивания аннексином V (AnnV) и йодидом пропидия (PI) и определения активной каспазы-3. Окрашивание AnnV, меченным FITC (AnnV-FITC), является показателем ранней стадии апоптоза. AnnV — 35-36 кДа Ca^{2+} -зависимый фосфолипид-связывающий белок, который обладает высокой аффинностью к фосфатидилсерину. На ранней стадии апоптоза мембранный фосфолипид фосфатидилсерин перемещается с внутренней поверхности плазматической мембраны на наружную. На поздних стадиях клеточной гибели через апоптотический или некротический пути происходит нарушение целостности плазматической мембраны, и ДНК клетки становится доступным для окрашивания йодидом пропидия. Подтверждением апоптотической гибели клеток является детекция того, как клетки последовательно проходят через раннюю и позднюю стадии апоптоза (AnnV⁺/PI⁻, затем AnnV⁺/PI⁺), детекция только двойного окрашивания (AnnV⁺/PI⁺) может быть признаком как апоптоза, так и некроза.

Методом двойного окрашивания AnnV и PI определяли вид клеточной гибели (апоптоз/некроз) и количество живых/погибших клеток в процентах.

Клетки рака мочевого пузыря человека линии RT112 рассаживали в 6-луночные планшеты в количестве 200 тыс. на лунку в 4 мл полной среды RPMI-1640 с 10% ФБС. Через сутки в лунки с клетками добавляли исследуемые препараты в концентрациях, ранее определенных в МТТ-тесте (IC_{50} для 10% мажорный вариант — разведение 1:8, IC_{50} для 10% минорный вариант — разведение 1:16, для сравнения взяли для каждого препарата по 2 разведения — 1:8 и 1:16). В контрольных лунках клетки инкубировали без препаратов. Через 24 ч инкубации клетки снимали 500 мкл раствора Версена и отмывали. Для оценки клеточной гибели использовали FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (“BD Bioscience”, США). Клетки помещали в пробирки для проточной цитометрии в 100 мкл аннексин-связывающего буфера, добавляли по 5 мкл (AnnV-FITC) и 5 мкл PI. Образцы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Далее к пробам добавляли 400 мкл аннексин-связывающего буфера и проводили анализ на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (“Becton Dickinson”, США).

Анализ апоптотических клеток, окрашенных AnnV-FITC/PI, проводили по следующим параметрам: интактные (живые) клетки AnnV-FITC-/PI⁻; ранний апоптоз AnnV-FITC⁺/PI⁻ и поздний апоптоз или некроз AnnV-FITC⁺/PI⁺.

Определение активной каспазы-3

Для определения активации каспазы-3 использовали FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit (“BD Pharmingen”, США) согласно приложенному к набору протоколу.

Клетки рака мочевого пузыря человека линии RT112 рассаживали в 6-луночные планшеты в количестве 200 тыс./лунка в 4 мл полной среды RPMI-1640 с 10% ФБС. Через сутки в лунки с клетками добавляли исследуемые препараты в концентрациях, ранее определенных в МТТ-тесте (IC_{50} для 10% мажорного варианта — разведение 1:8; IC_{50} для 10% минорного варианта — разведение 1:16; для сравнения взяли для каждого препарата по 2 разведения — 1:8 и 1:16). В контрольных лунках клетки инкубировали без препаратов. Через 24 ч инкубации клетки снимали 500 мкл раствора Версена и отмывали.

Для постановки реакции клетки дважды отмывали холодным PBS (“ПанЭко”), затем ресуспендировали в холодном Cytofix/Cytoperm буфере (“BD Pharmingen”) в концентрации 1×10^6 клеток/0,5 мл буфера. В течение 20 мин инкубировали клетки на льду. Затем отмывали от Cytofix/Cytoperm дважды в Perm/wash буфере (“BD Pharmingen”) (0,5 мл буфера на 1×10^6 клеток) при комнатной температуре. Разводили антитела к активной каспазе-3 в Perm/wash буфере (на одну пробирку 20 мкл антител в 100 мкл буфера). Клетки ресуспендировали в полученном растворе с антителами и инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. Далее отмывали каждый образец в 1 мл Perm/wash буфера, ресуспендировали в 0,5 мл Perm/wash буфера и анализировали на проточном цитометре FACSCanto II (“Becton Dickinson”).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты оценки общего спектра биологических активностей, прогнозируемых PASS для соединений мажорного и минорного вариантов фармкомпозиции, приведены на рисунке 3.

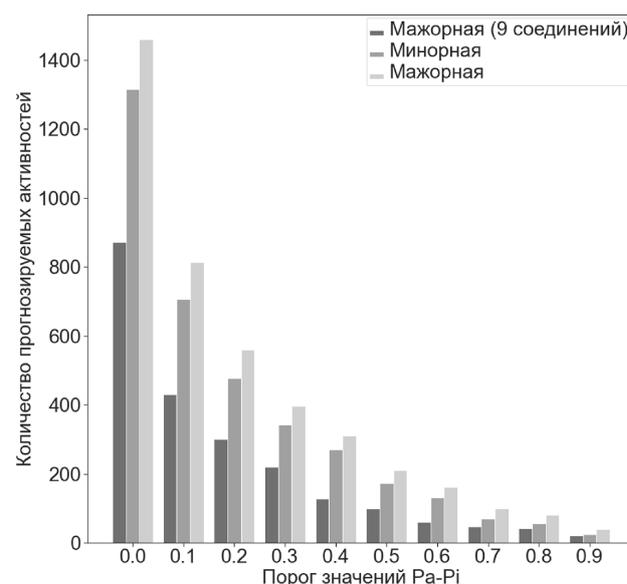


Рисунок 3. Число уникальных активностей, прогнозируемых для мажорного и минорного состава фитокомпонентов при различных порогах отсека значений Pa-Pi.

ОЦЕНКА *IN SILICO* БИОАКТИВНОСТИ ФИТОЛАДАПТОГЕНА

Как видно из рисунка 3, число активностей, прогнозируемых при условии, что вероятность проявления существенно превышает вероятность отсутствия активности ($P_{a-Pi} > 0,5$), для минорного набора составляет 273, для мажорного набора — 324. Для 9 соединений мажорного набора, не входящих в минорный, при заданном пороге прогнозируется 165 биологических активностей.

Для полного мажорного набора при пороге $P_{a-Pi} > 0$ предсказывается свыше 1400 биологических активностей, что составляет более 71% от всех фармакологических эффектов и механизмов действия, прогнозируемых PASS. Широкий набор прогнозируемых активностей связан со структурным разнообразием веществ, входящих в смеси, что подтверждается низким сходством структур между собой. Результаты оценки сходства представлены на рисунке 4.

Из приведённых на рисунке 4 данных видно, что соединения, представленные в фармацевтической композиции, в большинстве случаев характеризуются низкими оценками сходства между собой. Среднее значение оценки сходства составляет $0,09 \pm 0,08$. Превышающие 0,6 значения оценок сходства получены для органических кислот (линоленовой,

альфа-линоленовой, олеиновой, стеариновой и пальмитиновой) и представителей класса гинзенозидов (гинзенозид B2 (Re), гинзенозид Rb2 и гинзенозид Rg2). Прогноз *in silico* указывает на возможность проявления противоопухолевого действия в отношении рака мочевого пузыря, желудка, толстой кишки, яичников и шейки матки как минорным, так и мажорным составами ФЛА.

Исследуемая фармацевтическая композиция разрабатывается как противоопухолевый препарат, поэтому в дальнейшем мы рассматриваем только механизмы, которые, согласно базе знаний программы PharmaExpert, связаны с противоопухолевым действием. Вероятностные оценки для противоопухолевых механизмов, полученные для соединений фармацевтической композиции, приведены на рисунке 5, а распределение соединений с наибольшими значениями P_{a-Pi} между двумя вариантами фармацевтической композиции изображено на рисунке 6.

Из представленных на рисунке 5 данных видно, что наибольшие значения оценок наличия активности получены для трёх механизмов: агонист апоптоза, ингибитор транскрипционного фактора NF- κ B и стимулятор каспазы-3.

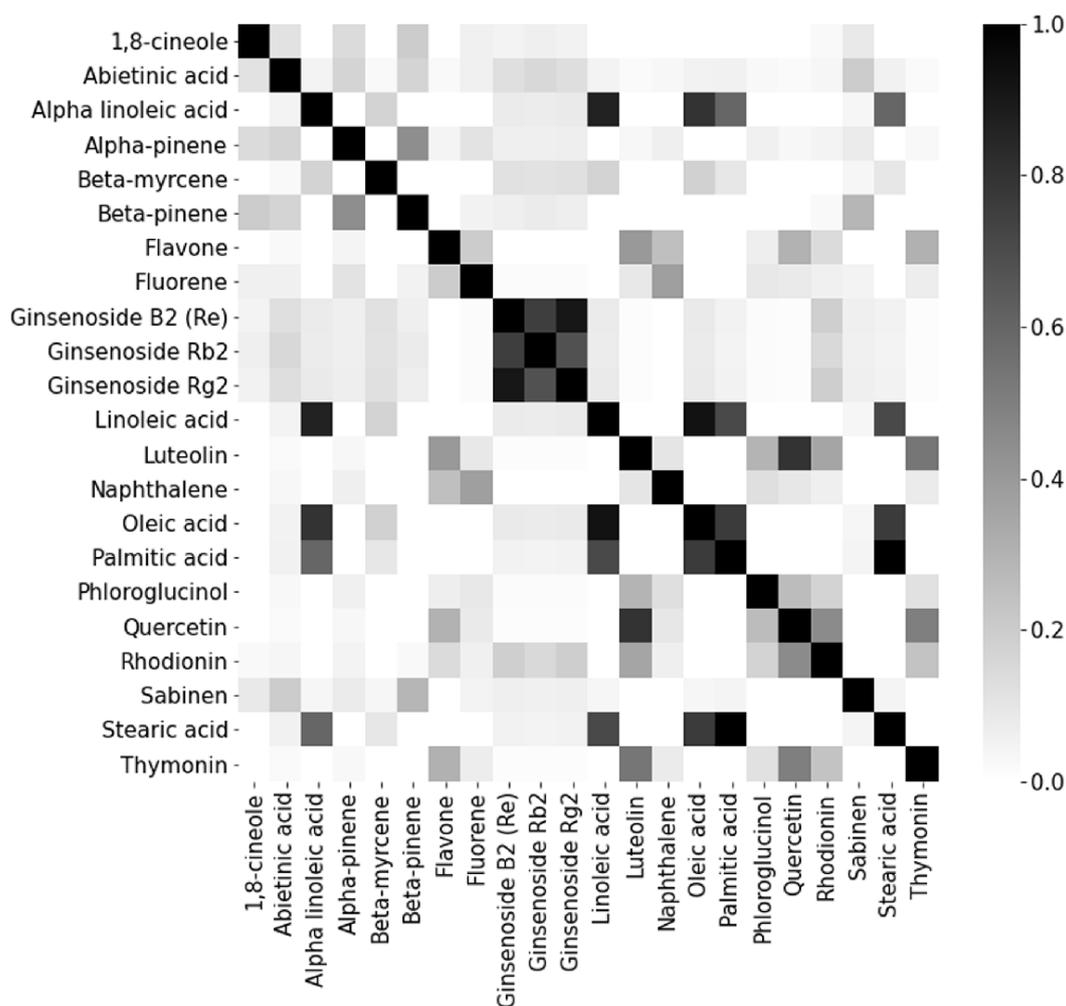


Рисунок 4. Тепловая карта оценок сходства между уникальными соединениями мажорного и минорного вариантов фармакокомпозиции ФЛА, полученных на основе MNA-дескрипторов и коэффициента Танимото.

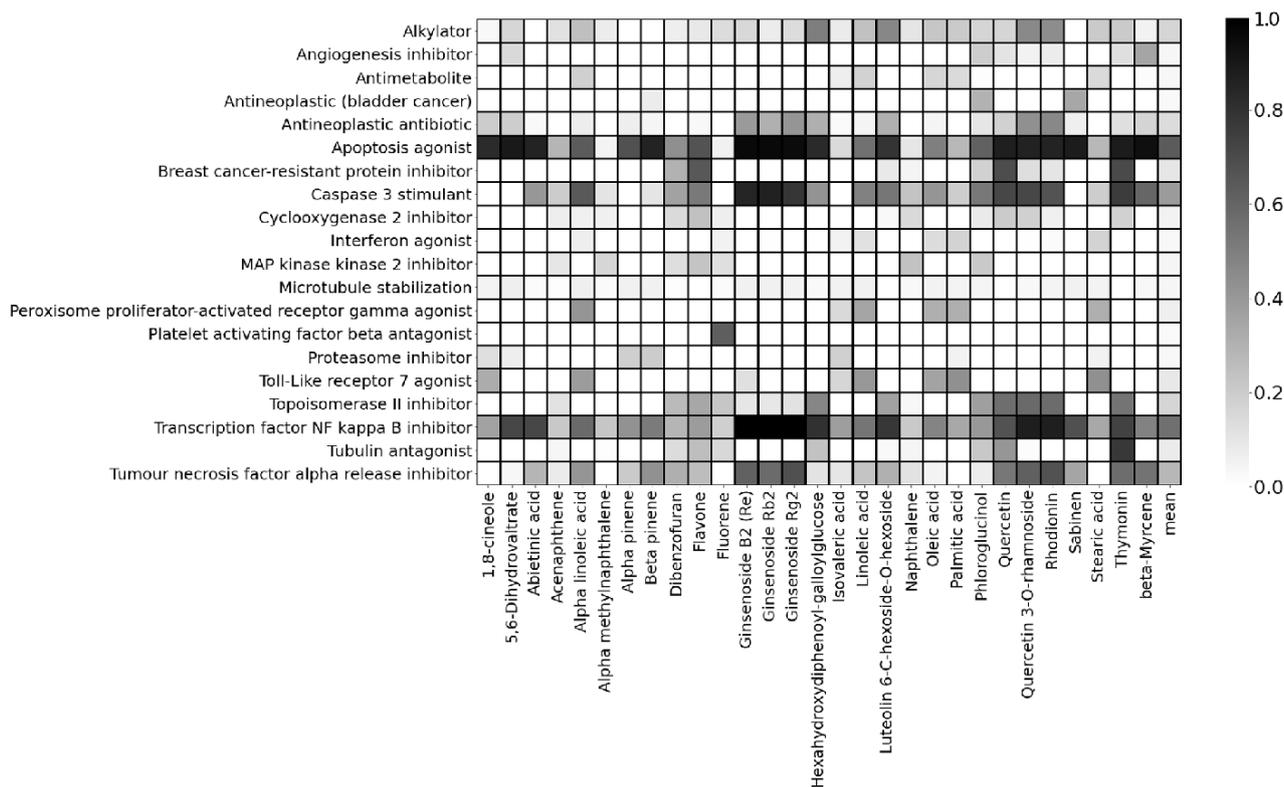


Рисунок 5. Предсказанные значения оценок Pa-Pi для механизмов действия, ассоциированных с противоопухолевым эффектом.

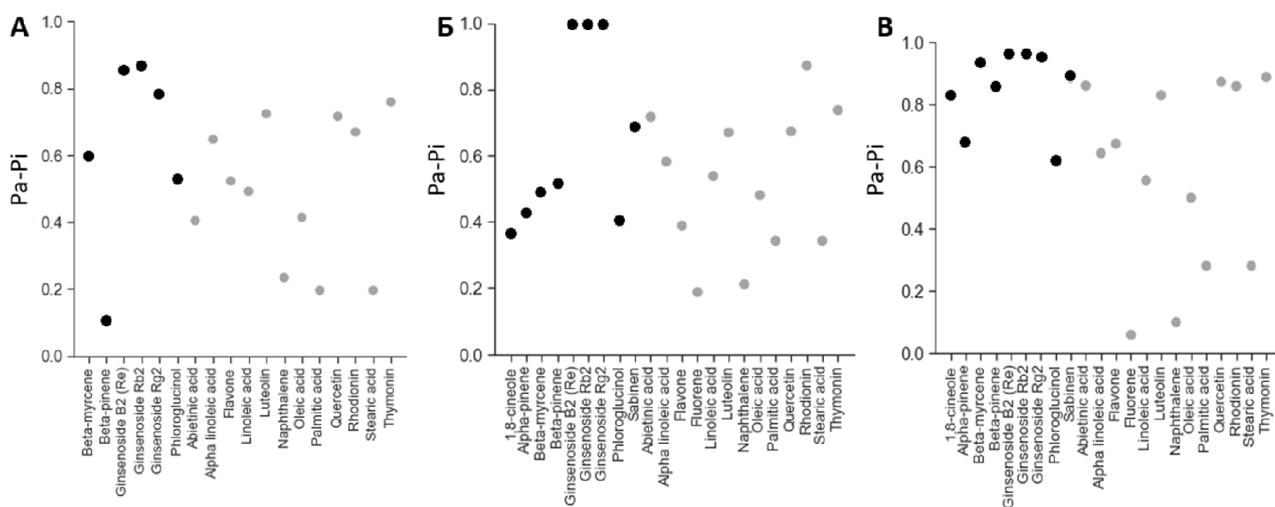


Рисунок 6. Распределение соединений с наивысшими вероятностными оценками проявления активности между двумя вариантами фармацевтической композиции. А — стимулятор каспазы-3, Б — ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ, В — агонист апоптоза. Серым цветом обозначены соединения минорного варианта фармкомпозиции ФЛА, чёрным — соединения мажорного варианты, не входящие в минорный.

Также, как видно из рисунка 6, соединения, для которых в отношении указанных выше механизмов получены наиболее высокие значения вероятностных оценок ($Pa-Pi > 0,9$), представлены преимущественно в мажорном варианте ФЛА. Значения вероятностных оценок приведены в таблице 1.

Согласно представленной в программе PharmaExpert информации, описанные выше механизмы ассоциированы с воздействием

на рак мочевого пузыря. Поэтому экспериментальное тестирование *in vitro* было проведено на клетках рака мочевого пузыря человека линии RT-112. Результаты определения цитотоксичности мажорного и минорного составов ФЛА приведены на рисунке 7.

Из приведённых на рисунке 7 данных видно, что цитотоксичность мажорного состава ФЛА выше, чем у минорного. Результаты двойного окрашивания AnnV и PI представлены в таблице 2 и на рисунке 8.

ОЦЕНКА *IN SILICO* БИОАКТИВНОСТИ ФИТОЛАДАПТОГЕНА

Таблица 1. Наивысшие значения оценок Ра-Рi, полученные для механизмов агонист апоптоза, стимулятор каспазы-3 и ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ.

Соединение	Механизм	Значения Ра-Рi
1,8-цинеол	Агонист апоптоза	0,83
Абиетиновая кислота	Агонист апоптоза	0,86
Альфа линолевая кислота	Агонист апоптоза	0,64
Альфа-пинен	Агонист апоптоза	0,68
Бета-мирцен	Агонист апоптоза	0,94
Бета-пинен	Агонист апоптоза	0,86
Флаван	Агонист апоптоза	0,67
Флуорен	Агонист апоптоза	0,06
Гинзенозид В2 (Re)	Агонист апоптоза	0,96
Гинзенозид Rb2	Агонист апоптоза	0,96
Гинзенозид Rg2	Агонист апоптоза	0,95
Линолевая кислота	Агонист апоптоза	0,55
Лютеолин	Агонист апоптоза	0,83
Флороглюцин	Агонист апоптоза	0,62
Кверцетин	Агонист апоптоза	0,87
Родионин	Агонист апоптоза	0,86
Сабинен	Агонист апоптоза	0,89
Тимонин	Агонист апоптоза	0,89
Альфа линолевая кислота	Стимулятор каспазы 3	0,65
Бета-мирцен	Стимулятор каспазы 3	0,60
Флаван	Стимулятор каспазы 3	0,52
Гинзенозид В2 (Re)	Стимулятор каспазы 3	0,85
Гинзенозид Rb2	Стимулятор каспазы 3	0,86
Гинзенозид Rg2	Стимулятор каспазы 3	0,78
Лютеолин	Стимулятор каспазы 3	0,72
Флороглюцин	Стимулятор каспазы 3	0,53
Кверцетин	Стимулятор каспазы 3	0,72
Родионин	Стимулятор каспазы 3	0,67
Тимонин	Стимулятор каспазы 3	0,76
Абиетиновая кислота	Ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ	0,73
Альфа линолевая кислота	Ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ	0,58
Бета-пинен	Ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ	0,51
Флаван	Ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ	0,39
Гинзенозид В2 (Re)	Ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ	0,99
Гинзенозид Rb2	Ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ	0,99
Гинзенозид Rg2	Ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ	0,99
Линолевая кислота	Ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ	0,54
Лютеолин	Ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ	0,67
Кверцетин	Ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ	0,67
Родионин	Ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ	0,87
Сабинен	Ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ	0,68
Тимонин	Ингибитор транскрипционного фактора NF-κВ	0,74

Таблица 2. Влияние мажорного и минорного варианта ФЛА на гибель клеток рака мочевого пузыря RT-112.

Вариант фармкомпозиции	Живые клетки (AnnV /PI), %	Ранний апоптоз (AnnV ⁺ /PI), %	Поздний апоптоз (AnnV ⁺ /PI ⁺), %	Некроз (AnnV/PI ⁺), %
Контроль (необработанные клетки)	87,0±3,1	4,0±0,4	8,0±1,7	1,0±0,0
Мажорный состав (разведение 1:8)	8,5±2,4	46,7±3,8	43,6±2,6	1,2±0,3
Минорный состав (разведение 1:8)	41,6±3,0	20,0±1,1	21,2±1,1	16,7±2,8
Мажорный состав (разведение 1:16)	44,9±4,7	32,7±4,4	15,7±2,4	6,6±1,0
Минорный состав (разведение 1:16)	85,1±6,8	8,7±1,2	4,3±1,0	1,9±0,1

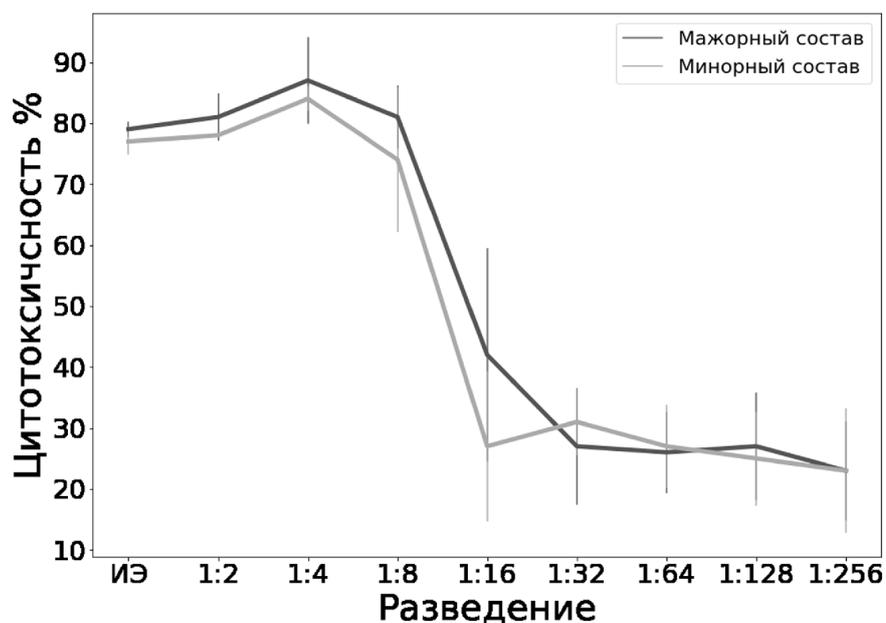


Рисунок 7. Результаты МТТ-теста по определению цитотоксического действия мажорного и минорного вариантов ФЛА на клетки рака мочевого пузыря линии RT112. ИЭ — исходный экстракт.

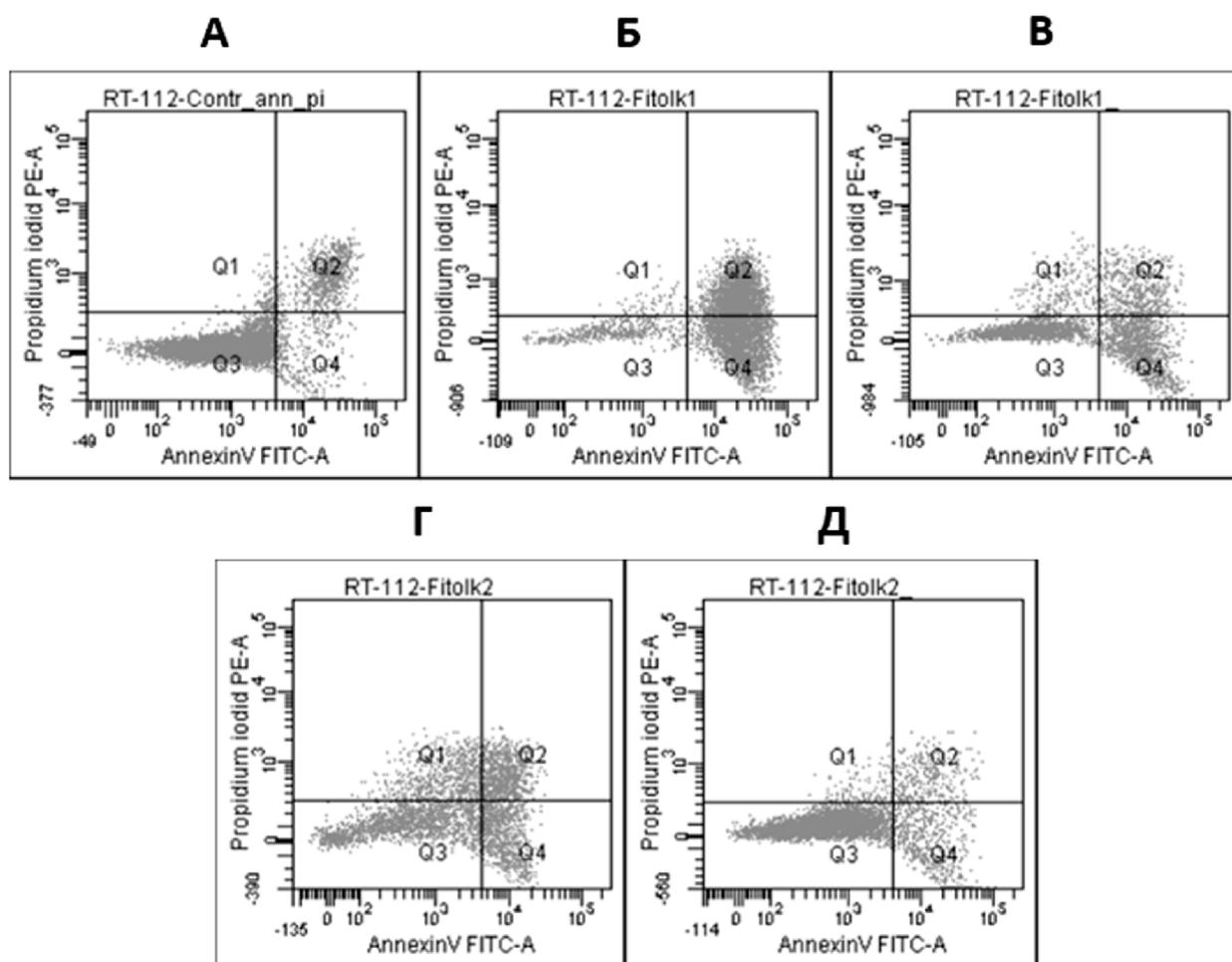


Рисунок 8. Двойное окрашивание клеток AnnV-FITC и PI. **А** — контроль (интактные клетки); **Б** — клетки, обработанные мажорным вариантом ФЛА в разведении 1:8; **В** — клетки, обработанные мажорным вариантом ФЛА в разведении 1:16; **Г** — клетки, обработанные минорным вариантом ФЛА в разведении 1:8; **Д** — клетки, обработанные минорным ФЛА в разведении 1:16.

Из приведённых в таблице 2 и на рисунке 8 данных видно, что результаты двойного окрашивания AppV и PI подтвердили данные МТТ-теста. Мажорная фармкомпозиция ФЛА в разведении 1:8 вызвала гибель более 90% клеток рака мочевого пузыря человека линии RT-112, а в разведении 1:16 — 50%. Минорная фармкомпозиция ФЛА в разведении 1:8 вызвала гибель более 50% клеток, в разведении 1:16 — не повлияла на их жизнеспособность (сравнимо с контролем).

Результаты определения активной каспазы-3 приведены на рисунке 9 и на рисунке 10.

Из рисунка 9 видно, что как мажорный, так и минорный варианты ФЛА активируют эффекторную каспазу-3. Таким образом, гибель клеток рака мочевого пузыря человека линии RT-112 по типу апоптоза была подтверждена в экспериментах *in vitro* двумя методами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Природные БАВ широко изучаются как источник новых соединений, обладающих противоопухолевой активностью. Однако лабораторные исследования *in vitro* сопряжены с рядом сложностей, которые обусловлены разнообразием химических структур данной группы веществ и, как следствие, их полифармакологическим действием. Применение методов *in silico* позволяет сократить временные и финансовые затраты на определение приоритетных путей разработки, особенно комплексных препаратов.

Прогноз *in silico* биологической активности для новой фармкомпозиции Фитоадаптоген, включающей БАВ фитоадаптогенов, указывает на возможность проявления противоопухолевого действия в отношении рака мочевого пузыря, желудка, толстой кишки, яичников и шейки матки как минорным, так и мажорным составами ФЛА.

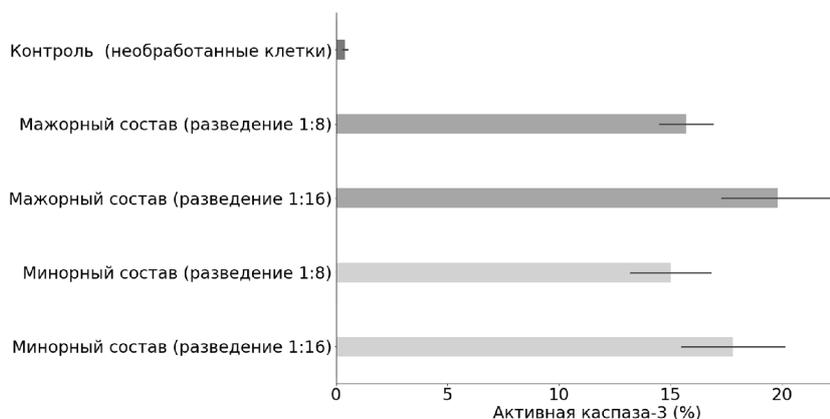


Рисунок 9. Влияние мажорного и минорного варианта Фитоадаптогена на активацию каспазы-3.

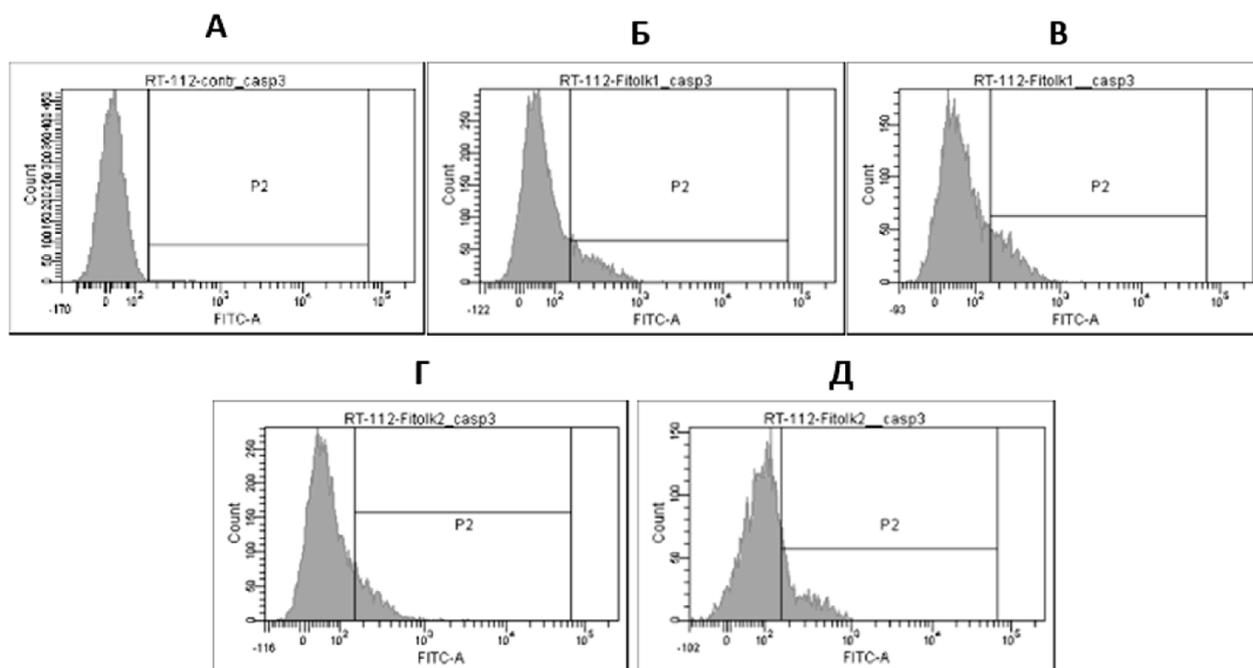


Рисунок 10. Активная каспаза-3: А — контроль (интактные клетки); Б — клетки, обработанные мажорным вариантом ФЛА в разведении 1:8; В — клетки, обработанные мажорным вариантом ФЛА в разведении 1:16; Г — клетки, обработанные минорным вариантом ФЛА в разведении 1:8; Д — клетки, обработанные минорным вариантом ФЛА в разведении 1:16.

Используя компьютерные программы PASS и PharmaExpert, мы оценили профили противоопухолевого действия двух вариантов новой фармацевтической композиции Фитоладаптоген — мажорного и его усеченного варианта, минорного. Результаты компьютерного прогноза были подтверждены в эксперименте *in vitro*.

Согласно прогнозу PASS, наиболее вероятными (Pa-Pi>0,5) механизмами противоопухолевого действия анализируемых соединений являются: агонист апоптоза, ингибитор транскрипционного фактора NF-κB и стимулятор каспазы-3. При этом наиболее высокие оценки Pa-Pi получены для соединений, преимущественно входящих в мажорный вариант фармкомпозиции. Согласно информации из базы знаний программы PharmaExpert, эти механизмы действия связаны с противоопухолевым эффектом в отношении рака мочевого пузыря.

В результате валидации прогноза PASS *in vitro* продемонстрирована более высокая цитотоксичность мажорной фармкомпозиции Фитоладаптоген в отношении клеток рака мочевого пузыря человека линии RT-112. Также в экспериментах *in vitro* двумя методами — двойным окрашиванием аннексином V и йодидом пропидия, а также детектированием в клетках активной каспазы-3 — подтверждена гибель опухолевых клеток рака мочевого пузыря по механизму апоптоза.

Полученные экспериментальные данные *in vitro* соответствуют результатам компьютерного прогноза *in silico*, указывая на преимущества мажорного состава фармкомпозиции Фитоладаптоген.

Прогнозируемая PASS противоопухолевая активность для других нозологий указывает на направления возможных дальнейших экспериментальных исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rana J.S., Khan S.S., Lloyd-Jones D.M., Sidney S. (2020) J. General Internal Med., 1-2.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. (2018) CA: a cancer journal for clinicians, **68**(6), 394-424.
3. Wang S., Dong G., Sheng C. (2019) Chemical Rev., **119**(6), 4180-4220.
4. Newman D.J., Cragg G.M. (2020) J. Natural Products, **83**(3), 770-803.
5. Bhanot A., Sharma R., Noolvi M.N. (2011) Int. J. Phytomed., **3**(1), 9-26.
6. Chen Y., Kirchmair J. (2020) Molecular Informatics, **39**(12), 2000171. 1. DOI: 10.1002/minf.202000171.
7. Бочарова О.А., Барышникова М.А., Зайчик Б.Ц., Карпова Р.В., Бочаров Е.В., Ваишакмадзе Л.А., Казеев И.В., Кучеряну В.Г., Косоруков В.С., Матвеев В.Б., Студида И.С. (2021) Патент РФ № 2747147. [Bocharova O.A., Baryshnikova M.A., Zajchik B.C., Karpova R.V., Bocharov E.V., Vashakmadze L.A., Kazeev I.V., Kucheryanu V.G., Kosorukov V.S., Matveev V.B., Stilidi I.S. (2021) Patent RF No. 2747147.]
8. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В., Вершинская А.А., Барышникова М.А., Казеев И.В., Кучеряну В.Г., Киселевский М.В. (2020) Росс. Биотер. Журн., **19**(4), 12-20. [Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V., Verzhinskaya A.A., Baryshnikova M.A., Kazeev I.V., Kucheryanu V.G., Kiselevskiy M.V. (2020) Ross. Bioter. Journ., **19**(4), 12-20.
9. Пороиков В.В. (2020) Биомедицинская химия, **66**(1), 30-41. [Poroikov V.V. (2020) Biomeditsinskaya Khimiya, **66**(1), 30-41.]
10. Filimonov D.A., Druzhilovskiy D.S., Lagunin A.A., Glorizova T.A., Rudik A.V., Dmitriev A.V., Pogodin P.V., Poroikov V.V. (2018) Biomedical Chemistry: Research and Methods, **1**(1), e00004. DOI: 10.18097/BMCRM00004.
11. Filimonov D., Poroikov V., Borodina Y., Glorizova T. (1999) J. Chem. Inform. Comput. Sci., **39**(4), 666-670.
12. Lagunin A.A., Goel R.K., Gawande D.Y., Pahwa P., Glorizova T.A., Dmitriev A.V., Ivanov M.S., Rudik A.V., Konova V.I., Pogodin P.V., Druzhilovsky D.S., Poroikov V.V. (2014) Natural Product Reports, **31**(11), 1585-1611.
13. Goel R.K., Gawande D.Y., Lagunin A.A., Poroikov V.V. (2018) SAR QSAR Environ. Res., **29**(1), 69-81.
14. Mosmann T. (1983) J. Immunol. Methods, **65**(1-2), 55-63.

Поступила в редакцию: 16. 04. 2021.
После доработки: 01. 05. 2021.
Принята к печати: 11. 05. 2021.

POSSIBILITIES OF *IN SILICO* ESTIMATIONS FOR THE DEVELOPMENT OF PHARMACEUTICAL COMPOSITION PHYTOLADAPTOGENE CYTOTOXIC FOR BLADDER CANCER CELLS

N.S. Ionov^{1*}, *M.A. Baryshnikova*², *E.V. Bocharov*², *P.V. Pogodin*¹, *A.A. Lagunin*¹, *D.A. Filimonov*¹,
*R.V. Karpova*², *V.S. Kosorukov*², *I.S. Stilidi*², *V.B. Matveev*², *O.A. Bocharova*², *V.V. Poroikov*¹

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: ionov.nikita.serg@gmail.com

²Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation,
24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478 Russia

Based on the prediction of biological activity spectra for several secondary metabolites of medicinal plants using the PASS computer program and validation *in vitro* of the predictions results the priority direction of the pharmaceutical composition Phytoladaptoгене (PLA) development was determined. PLA is a complex of structurally diverse small organic compounds including biologically active substances of phytoadaptogenes (ginsenosides from *Panax ginseng*, rhodionin from *Rhodiola rosea* and others) compiled considering previously developed pharmaceutical compositions. Two variants of the pharmaceutical composition were studied: — the major and minor variants included 22 and 13 compounds, respectively. The probability of activity exceeds the probability of inactivity for 1400 out of 1945 pharmacological effects and mechanisms predicted by PASS for the major variant of PLA. The wide range of predicted activities is mainly due to the low structural similarity of constituent compounds. An *in silico* prediction indicates the possibilities of antitumor properties against bladder, stomach, colon, ovarian and cervical cancers both for minor and major PLA compositions. It was found that the highest probability values of activity were predicted for three mechanisms: apoptosis agonist, caspase-3 stimulant, and transcription factor NF- κ B inhibitor. According to the PharmaExpert program they are associated with the antitumor effect against bladder cancer. Experimental validation was using the human bladder cancer cell line RT-112. The results of the MTT test have shown that the cytotoxicity of the major PLA variant is higher than that of the minor PLA variant. *In vitro* experiments performed using two methods (double staining with annexin V and propidium iodide and detection of active caspase-3 in cells) confirmed that the death of bladder cancer cells occurred via the apoptotic mechanism. The data obtained correspond to the results of the prediction and indicate advantages of the major PLA composition. Thus, PLA can become the basis for the development of a drug with the antitumor activity against bladder cancer. The antitumor activity predicted by PASS for other cancers may be the subject of further studies.

Key words: natural products; phytoadaptogenes; *in silico* estimation; PASS; PharmaExpert; *in vitro* validation

Funding. The work was performed in the framework of the Russian Federation Fundamental Research Program for the long-term period for 2021-2030.

Received: 16.04.2021, revised: 01.05.2021, accepted: 11.05.2021.