

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ГОРЬКОГО МЁДА НА ИНФЛАММАСОМ-ЗАВИСИМУЮ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК ПРИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ МАЛЯРИИ: ОЦЕНКА НА ОСНОВЕ СЕТЕВОЙ ФАРМАКОЛОГИИ

М.О. Даниян^{1*}, О.Б. Адеое², Э. Осирим^{1,3}, И.Д. Асиянбола^{1,4}

¹Faculty of Pharmacy, Obafemi Awolowo University,

Ile-Ife, Osun State, Nigeria; *e-mail: mdaniyan@oauife.edu.ng

²Benjamin Carson (Snr.) School of Basic Medical Sciences, Babcock University, Ilishan-Remo, Ogun State, Nigeria

³Faculty of Basic Medical Science, Redeemer's University, Ede, Osun State, Nigeria

⁴College of Health Sciences, Osun State University, Osogbo, Osun State, Nigeria

Церебральная малярия (ЦМ) — смертельно опасное осложнение инфекции, вызванной *Plasmodium falciparum*. Биологическая и физиологическая связь между ЦМ, воспалением и формированием инфламмасом свидетельствует о сложности патологического процесса. Возникновение резистентности к доступным недорогим лекарственным препаратам и усугубляющийся экономический кризис обуславливают необходимость поиска новой эффективной фармакотерапии на основе интеграции подходов официальной и традиционной медицины. Ранее мы изучили лечебные свойства горького мёда и определили его ботанические и биологически активные характеристики, включая ингибирование активности панкреатической альфа-амилазы, антидислипидемические, кардиопротекторные эффекты, а также регенерирующее действие при гепаторенальном синдроме у крыс с диабетом, индуцированным стрептозотоцином. В настоящем исследовании с помощью газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) были определены фитохимические соединения горького мёда (ГМ), с использованием диаграмм Венна были обнаружены 9 мишеней среди генов, связанных с ЦМ, воспалением, инфламмасомами и фитоконпонентами ГМ. Сетевой анализ выявил значимые функциональные и физические взаимодействия между белками-мишенями, кодируемыми этими генами, и белками, содержащими NOD- и LRR-домены, а также содержащим пириновый домен белком 3 (NLRP3). Молекулярный докинг фитоконпонентов горького мёда к этим мишеням позволил определить три наиболее перспективных соединения для дальнейшей экспериментальной проверки. На основе полученных данных можно предполагать, что горький мёд может способствовать подавлению инфламмасом-зависимой гибели клеток при ЦМ благодаря взаимодействию с установленными в результате исследования мишенями.

Ключевые слова: церебральная малярия; воспаление; инфламмасома; горький мёд; фитоконпоненты; сетевая фармакология

DOI: 10.18097/PBMC20247006442

ВВЕДЕНИЕ

В 2022 году в мире зарегистрировано 249 миллионов случаев заболевания малярией, что превышает соответствующие показатели за 2021 год на 5 миллионов. Это привело к гибели 608000 человек, причём наиболее уязвимой группой являются дети в возрасте до пяти лет [1]. Африканский континент продолжает оставаться основным местом заболеваемости и смертности от малярии; при этом на Нигерию, наиболее густонаселённую страну, приходится 27% заболеваемости и 31% смертности [1]. Преимущества комбинированной терапии на основе артемизинина (КТА), обусловленные высокой эффективностью и краткосрочным курсом лечения, которые определяют применение данной терапии и снижение заболеваемости и смертности, находятся под угрозой из-за появления устойчивых к артемизинину малярийных плазмодиев [1, 2]. Зарегистрированные случаи снижения чувствительности малярийного паразита к КТА вызывают серьёзную озабоченность и могут иметь серьёзные последствия для глобального контроля распространения малярии.

Церебральная малярия (ЦМ) — смертельно опасный неврологический синдром, вызванный инфекцией *Plasmodium falciparum*, который может приводить к инвалидности и/или смерти; при этом особенно уязвимы к развитию ЦМ дети [3]. Возникновение ЦМ наблюдается лишь примерно в 1% инфицированных *P. falciparum*, при этом смертность составляет 15–25% [4]. У выживших могут наблюдаться острые или длительные физические и неврологические нарушения, сохраняющиеся после излечения от инфекционного заболевания [4, 5]. Они варьируют у детей и взрослых и зависят от начала и тяжести инфекции и сопутствующих симптомов, таких как кома, эпилепсия, очаговые осложнения, гиперактивность, двигательные расстройства, нарушения зрения и речи. Качественное лечение больных с ЦМ и сопутствующих неврологических нарушений возможно только при точной и ранней диагностике, основанной на улучшении нашего понимания патогенеза заболевания и особенностей инфекционного процесса [4, 5]. Основная цель лечения ЦМ — снижение смертности и повышение качества жизни, что позволяет контролировать неврологические синдромы, возникающие даже

после эффективного применения противомаларийных препаратов. Поэтому необходимо продолжать поиск новых способов фармакотерапии, которые не только останавливают прогрессирование болезни, но и обратят вспять патологические процессы в мозге [4]. Подробное описание патологии ЦМ и связанных с ней неврологических синдромов было представлено в работе [5].

Природные соединения играют важную роль в лечении малярии, поскольку лекарственные растения стали источниками высокоэффективных противомаларийных препаратов, таких как хинин и артемизинин. С возрождением интереса к интеграции традиционной и официальной медицины возрастает необходимость в более глубоком понимании фармакологии природных соединений. Мёд является одним из наиболее широко используемых продуктов природного происхождения, обладающих различными полезными для здоровья свойствами [6]. Опираясь на доступные научные данные, можно говорить о том, что мёд обладает антиоксидантными, противовоспалительными, антигипергликемическими и другими свойствами [6, 7]. Однако следует отметить, что лечебные свойства мёда во многом зависят от нектара, который используют пчелы [8]. Горький мёд (ГМ) — это разновидность мёда, вырабатываемого пчёлами преимущественно из нектара растений, содержащих характерные горькие биологически активные соединения [8]. Наш коллектив, исследуя лечебные свойства горького мёда, определил его ботанические и биологически активные характеристики, включая ингибирование активности панкреатической альфа-амилазы, антидислипидемические, кардиопротекторные эффекты, а также регенерирующее действие при гепаторенальном синдроме у крыс с диабетом, индуцированным стрептозотоцином [8–11]. Поэтому горький мёд потенциально полезен для облегчения неврологических синдромов и предотвращения инфламмасом-зависимой гибели клеток при ЦМ.

Известно, что многие лекарственные соединения действуют на несколько мишеней. В наше время, используя вычислительные методы, основанные на сетевой фармакологии для интеграции и анализа данных из различных источников, можно выявить основные биологические механизмы действия и потенциальные мишени лекарств. Сетевая фармакология — это междисциплинарная область исследований, направленная на понимание мультифакторных взаимодействий между биологическими системами и препаратами на молекулярном уровне [12]. Она используется для исследования молекулярных механизмов заболеваний, выявления новых мишеней лекарств, комбинаций препаратов, перепрофилирования существующих лекарств, а также для повышения безопасности и эффективности лечения тяжёлых заболеваний [12, 13].

Ранее мы представили подробный обзор, в котором были рассмотрены некоторые биохимические и молекулярные факторы в патологии ЦМ с особым акцентом на функциональное взаимодействие

медиаторов воспаления, нейротрансмиттеров и молекулярных шаперонов, как у человека, так и у плазмодия [5]. В данном исследовании мы выявили фитохимические соединения, связанные с горьким мёдом, и мишени, ассоциированные с ЦМ, воспалением, инфламмасомами и фитокомпонентами горького мёда. Анализ был проведён с использованием подхода сетевой фармакологии, интегрированного с молекулярным докингом.

МЕТОДИКА

Схема работы подхода сетевой фармакологии с интегрированным молекулярным докингом, использованная в данном исследовании, представлена на рисунке 1.

Фитохимическое профилирование горького мёда с помощью ГХ-МС

Фитохимическое профилирование образцов горького мёда проводилось с использованием газового хроматографа Agilent 8860 (ГХ), сопряжённого с масс-спектрометрическим детектором 5977B (МСД), оснащённого капиллярной колонкой HP5, покрытой 5% фенилметилсилоксаном (длина 30 м, диаметр 0,32 мм, толщина плёнки 0,25 мкм), с пакетом программного обеспечения GC/MSD Chemstation (MassHunter) (“Agilent Technologies”, США). Протокол для фитохимического профилирования с помощью ГХ-МС был описан ранее [14, 15]. Вкратце, 1 мкл образцов вводили с использованием автоматического жидкостного пробоотборника Agilent 8860 (ALS) без разделения, при температуре инжектора 250°C. Давление на входе было установлено на 10296 фунтов на кв. дюйм, а общий поток — 45,2 мл/мин. Продувочный поток к разделительному клапану составлял 40 мл/мин при 0,5 мин. В качестве газа-носителя использовали гелий (с чистотой 99,9%) при постоянном потоке через колонку 1 мл/мин. Температуру печи ГХ первоначально программировали на 80°C (2,0 мин), затем повышали на 30°C/мин до 320°C (5 мин). Температура МСД была установлена на 300°C с потоком водорода и воздуха 20 мл/мин и 30 мл/мин соответственно. Определение уровней фитохимических соединений, подаваемых на ГХ, в образце проводили с использованием ГХ-МС в режиме сканирования МСД. После того, как прибор был подготовлен для анализа, была создана последовательность образцов с помощью программного обеспечения Masshunter GC-MS Acquisition. Затем последовательность была проанализирована, а полученные данные были обработаны на программном обеспечении Agilent Data Analysis (версия 12.1). 3D-структуры и представления SMILES фитокомпонентов были извлечены из базы данных PubChem [16]. Локальная база данных фитокомпонентов была создана в формате SDF из 3D-структур с использованием Discovery Studio Visualizer [17].

Извлечение и генерация консенсусных генов

Гены, связанные с ЦМ, воспалением и инфламмасомой, были извлечены из Open Targets и

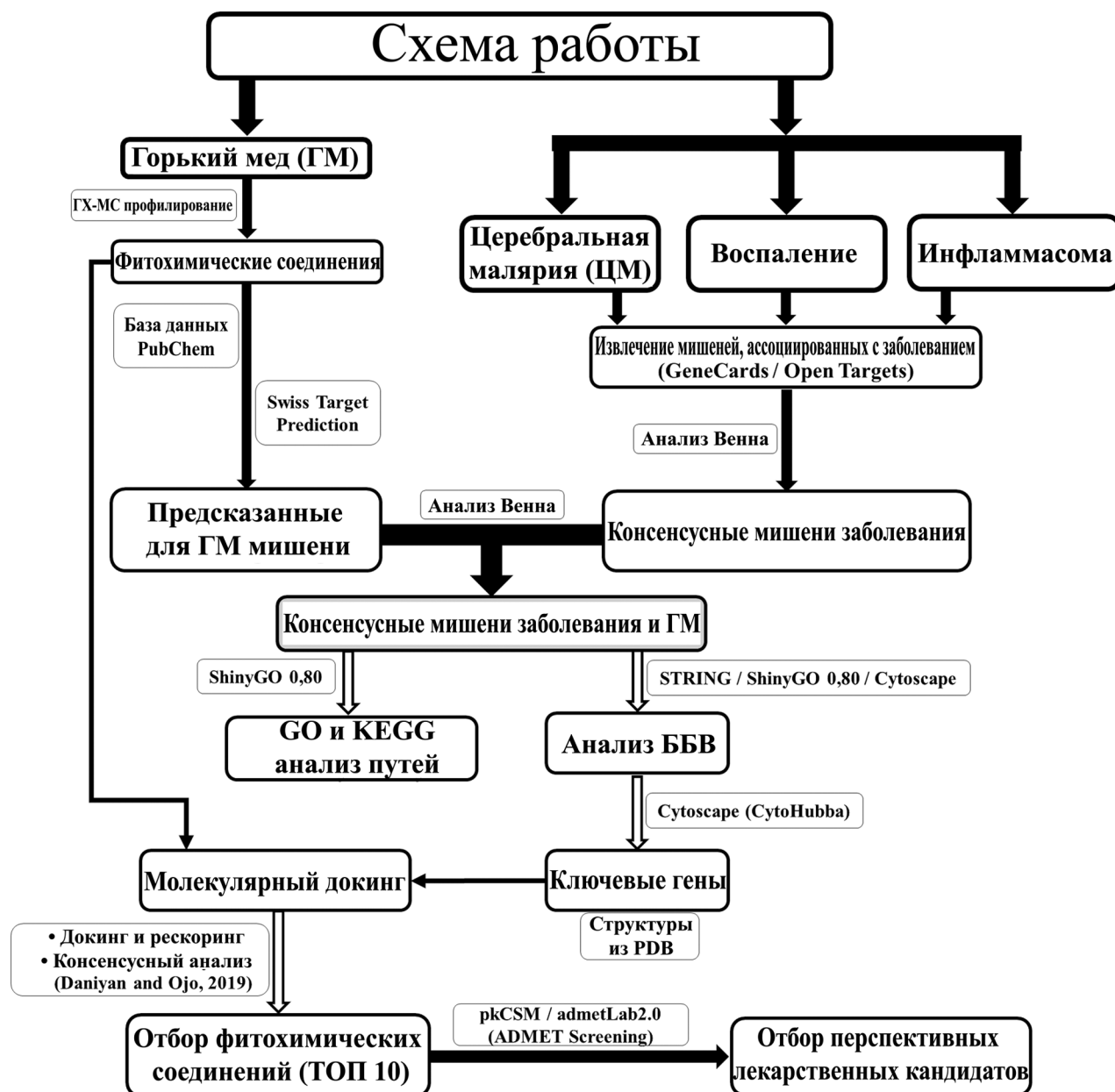


Рисунок 1. Схема работы подхода сетевой фармакологии с интегрированным молекулярным докингом. ББВ – белок-белковое взаимодействие; GO – генная онтология; KEGG – Киотская энциклопедия генов и геномов; ГМ – горький мёд; ADMET – адсорбция, распределение, метаболизм, выведение и токсичность. Онлайн-ресурсы pkCSM, admetLab2.0, STRING, ShinyGO, Swiss Target Prediction, Venn, Gene Cards, KEGG и Open Targets. Cytoscape – это программное обеспечение, позволяющее взаимодействовать с онлайн-ресурсами, такими как база данных STRING.

базы данных Human Genes [18, 19]. Дублированные записи были удалены из каждого набора генов и сохранены в Microsoft Excel для последующего использования. Предсказание взаимодействующих генов для каждого фитохимического соединения горького мёда выполняли с использованием Swiss Target Prediction [20]. Предсказанные гены для всех фитохимических соединений были объединены, а дубликаты также были удалены. Онлайн-инструмент Venn Diagram [21] использовали для создания консенсусных генов.

Сетевой анализ консенсусных генов

Сетевой анализ, включающий анализ онтологии генов (GO) и обогащения путей [22], для финальных консенсусных генов проводился с использованием онлайн-серверов STRING и ShinyGO (версия 0.80) [23, 24], с дополнительным анализом, идентификацией и ранжированием ключевых генов с использованием Cytoscape [25]. Сеть белок-белковых взаимодействий (ББВ) была получена из STRING с использованием полной

сети STRING при средней надёжности 0,4000 и строгих параметрах FDR (уровень ложно положительных прогнозов) 0,5. Настройки не позволяли автоматически включать дополнительные белки, кроме тех, которые были указаны в качестве целевых. ББВ были получены из STRING через веб-интерфейс ShinyGO 0.80, рёбра ББВ указывают как функциональные, так и физические ассоциации белков. Для дальнейшей оценки функциональной роли этих генов был включён NLRP3, один из наиболее изученных генов инфламماسомы, с целью определения потенциальных функциональных связей с консенсусными генами и в качестве функционального контроля.

Молекулярный докинг фитокомпонентов ГМ в консенсусных генах

Репрезентативные белковые структуры для всех выявленных мишеней были получены из банка данных белковых структур [26] и подготовлены для докинга, как нами было описано ранее [27]. К ним относятся: ADORA2A (PDB: 3PWH), C5AR1 (PDB: 8HK5), FCGR1A (PDB: 4X4M), ITGB2 (PDB: 3K72), NOS2 (PDB: 4NOS), PTGS2 (PDB: 3HS5), STAT3 (PDB: 6NJS), VDR (PDB: 5V39), VEGFA (PDB: 4KZN и 6ZFL), а также добавлен NLRP3 (PDB: 8ETR). Вкратце, загруженные структуры сначала проверяли и корректировали на наличие отсутствующих атомов с использованием Swiss-PDB viewer [28]. Затем, используя платформу VEGA ZZ [29], удаляли воду и водород, нормализовали координаты и проверяли распределение зарядов. Аминокислотные остатки активного центра картировали вокруг сокристаллизованных лигандов с радиусом 5 Å, после чего удаляли сокристаллизованные лиганды для создания необходимого пространства для докинга, как это реализовано в VEGA ZZ [29]. Докинг фитохимических соединений горького мёда к этим мишеням производили с помощью Autodock Vina [30], соответствующие сокристаллизованные лиганды были использованы в качестве контроля. Полученные взаимодействия из Autodock Vina были повторно оценены с использованием программ PLANTS, XScore и NNSCORE [29, 31, 32], а результаты подвергали консенсусному анализу, как описано ранее [27]. Полученные оценки ранжировали, и ранжированные оценки анализировались для определения фитокомпонентов с наибольшей вероятностью потенциального взаимодействия с несколькими мишенями.

ADMET скрининг in silico фитокомпонентов ГМ

Локальная база данных в форматах SDF и SMILES, в которой представлены ранжированные 10 фитокомпонентов с наибольшей вероятностью потенциального взаимодействия с несколькими мишенями, была создана из локальной базы данных фитокомпонентов горького мёда с использованием ADSV [17]. ADMET-оценки получали с использованием онлайн-серверов pkCSM и admetlab 2.0 [33, 34].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ целевых генов, связанных с фитокомпонентами ГМ

Сравнительный анализ был проведён с генами, для которых прогнозировалась ассоциация с ЦМ, воспалением и инфламмасомой. Анализ с использованием диаграмм Венна показал, что значительная часть генов, предсказанных как ассоциированные с инфламмасомой (1948 генов) и ЦМ (391 ген), являются подмножествами генов, связанных с воспалением (13646) (Дополнительные материалы рис. S1A и S1B). Дальнейший анализ показал, что гены, консенсусные для ЦМ-инфламماسомы (134), также ассоциированы с воспалением (Дополнительные материалы рис. S1C и S1D). Химическое профилирование ГМ с использованием ГХ-МС выявило 28 фитокомпонентов (Дополнительные материалы табл. S4 и S5). Количественный анализ этих фитокомпонентов, приведён в таблице S7 Дополнительных материалов. Большая часть генов, ассоциированных с ГМ (329), была связана с воспалением (303 гена) (Дополнительные материалы рис. S2B), часть из которых ассоциирована с ЦМ (28) (Дополнительные материалы рис. S2A и S2D) и инфламмасомой (66) (Дополнительные материалы рис. S2C и S2F). Наименьшая ассоциация была у ГМ-ЦМ-инфламмасома, которая выявила 9 консенсусных генов (Дополнительные материалы рис. S2E). Интересно то, что консенсусный анализ ЦМ-воспаление-инфламмасома (ЦМ-В-И) с генами, связанными с ГМ, также выявил 9 генов (рис. 2A), аналогично консенсусу ГМ-ЦМ-инфламмасома (Дополнительные материалы рис. S2E и S3C). Также все гены, ассоциированные с ГМ (329), связаны с воспалением, из которых 66 генов также связаны с инфламмасомой (рис. 2D). Однако в контексте генов ГМ, ассоциированных с ЦМ и воспалением при ЦМ, было выявлено 28 генов, из которых 9 генов показали ассоциацию с ЦМ, воспалением и инфламмасомой. Таким образом, данный анализ выявил 9 мишеней, связанных с ГМ, которые также вовлечены в патогенетические механизмы ЦМ, воспаления и инфламماسомы. Этими мишенями являются: ADORA2A, C5AR1, FCGR1A, ITGB2, NOS2, PTGS2, STAT3, VDR и VEGFA.

Анализ ББВ

Анализ ББВ предоставляет возможность оценить функциональные связи между выявленными мишенями. Тем не менее, для более полного понимания функциональной роли этих мишеней был включён NLRP3 — один из наиболее изученных белков инфламماسомы [36–38], в качестве белка функционального контроля, чтобы подтвердить возможное функциональное взаимодействие с выявленными мишенями. Был проведён сравнительный анализ функциональных взаимодействий между этими мишенями с NLRP3 и без его включения. Анализ ББВ для 9 мишеней отдельно и с включением NLRP3 показан на рисунке 3.

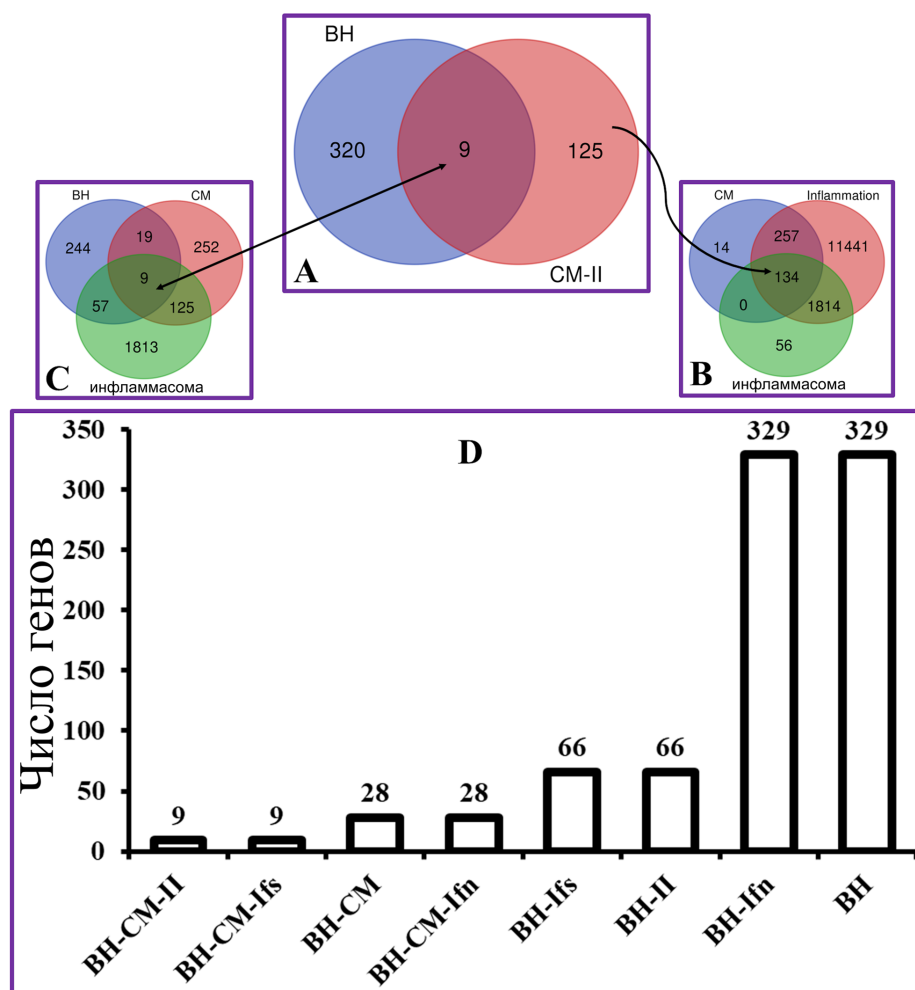


Рисунок 2. Сравнительный анализ ассоциированных с ГМ генов с ассоциированными ЦМ генами воспаления и инфламماسомы. ВН – горький мёд; СМ – церебральная малярия; Ifs – инфламماسома; Ifn – воспаление; II – инфламмасома-воспаление. Диаграммы Венна показывают консенсус (А) ВН-СМ-II, (В) СМ-Ifn-II и (С) ВН-СМ-II. (D) – Гистограмма ассоциированных с ГМ генов в консенсусе с генами ЦМ, воспаления и инфламماسомы. Гистограмма была построена в Microsoft Excel, а изображения подготовлены с помощью Microsoft PowerPoint и GIMP 2.10.14 [35].

Он выявил 38 ($p=1,05 \times 10^{-11}$) (рис. 3В) и 29 ($p=2,64 \times 10^{-8}$) (рис. 3А) функциональных и физических взаимодействий белков с и без включения NLRP3 соответственно. Это указывает на то, что присутствие NLRP3 увеличивает вероятность функциональных взаимодействий среди выявленных белковых продуктов генов-мишеней.

Генная онтология и анализ обогащения

Всего было выявлено 162 и 146 обогащённых биологических функций (БФ) при включении или исключении NLRP3 соответственно (Дополнительные материалы табл. S1). Из них 134 совпадали, и, несмотря на численные различия в некоторых биологических функциях (БФ), процент встречаемости выявленных мишеней в этих БФ незначительно отличался при включении и исключении NLRP3. Анализ ассоциаций выявленных мишеней с БФ (табл. 1, верхняя часть) показал, что все 9 мишеней связаны с 8 БФ, а именно: положительная регуляция клеточного процесса, регуляция каталитической активности, регуляция метаболического процесса

клетки, регуляция метаболического процесса соединений азота, регуляция основного метаболического процесса, ответ на органическое вещество и передача сигнала (Дополнительные материалы табл. S1). Также стоит отметить, что NLRP3 также был связан с этими БФ (Дополнительные материалы табл. S1). Кроме того, NLRP3 был ассоциирован с большим количеством БФ, которые в свою очередь ассоциированы с 8, 7, 6 и 5 выявленной мишенью (табл. 1, верхняя часть), что предполагает возможные функциональные связи между NLRP3 и генами-мишенями.

Аналогичный анализ показал, что всего 96 путей KEGG были связаны с мишенями, как с включением, так и без включения NLRP3 (Дополнительные материалы табл. S2). Из них только пять путей были ассоциированы с NLRP3 и одной или двумя мишенями, из которых только один (коклюш) оказался в числе 20 лучших путей (табл. 1, нижняя панель; табл. 2 и Дополнительные материалы табл. S2). Дополнительные шесть путей были ассоциированы только с NLRP3 (Дополнительные материалы табл. S2).

Таблица 1. Анализ ассоциации генов с биологическими функциями и путями KEGG с NLRP3 или без его включения

Ассоциации консенсусных генов с биологическими функциями (БФ)			
Число консенсусных генов	Число ассоциированных БФ	Количество ассоциированных БФ с NLRP3	% ассоциаций с NLRP3
9	8	8	100,00
8	14	11	78,57
7	13	8	61,54
6	15	8	53,33
5	17	10	58,82
4	23	8	34,78
3	21	4	19,05
2	23	0	0
Ассоциации консенсусных генов с путями KEGG			
Число консенсусных генов	Число ассоциированных путей KEGG	Число ассоциированных путей KEGG с NLRP3	% ассоциаций с NLRP3
4	3	0	0
3	9	0	0
2	20	2	10,00
1	64	3	4,69
0	0	6	0

Таблица 2. Анализ обогащения биологических путей KEGG и ассоциированные консенсусные гены

№.	Путь KEGG	Гены	Обогащение	
			Кратность обогащения	FDR
1	Лейшманиоз	FCGR1A, ITGB2, NOS2, PTGS2	133,81	1,37E-006
2	Сигнальный путь VEGF	PTGS2, VEGFA	86,18	0,001753
3	Инфекция, вызванная золотистым стафилококком	FCGR1A, ITGB2, C5AR1	81,14	0,000181
4	Острый миелоидный лейкоз	FCGR1A, STAT3	75,89	0,002101
5	Сигнальный путь HIF-1	NOS2, STAT3, VEGFA	69,97	0,000212
6	Рак поджелудочной железы	STAT3, VEGFA	66,90	0,002365
7	Коклюш	ITGB2, NOS2, NLRP3	66,90	0,002365
8	Резистентность к ингибиторам EGFR тирозинкиназы	STAT3, VEGFA	64,36	0,002405
9	Каскады комплемента и коагуляции	ITGB2, C5AR1	59,82	0,002628
10	Туберкулёз	FCGR1A, ITGB2, NOS2, VDR	56,81	2,17E-005
11	Мелкоклеточный рак лёгких	NOS2, PTGS2	55,27	0,002770
12	Ревматоидный артрит	ITGB2, VEGFA	55,27	0,002770
13	МикроРНК при раке	PTGS2, STAT3, VEGFA	47,37	0,000534
14	Нетоз	FCGR1A, ITGB2, C5AR1	40,35	0,000553
15	Герпесвирус, ассоциированный с саркомой Капоши	PTGS2, STAT3, VEGFA	39,31	0,000553
16	Химическая активация рецептора канцерогенеза	STAT3, VDR, VEGFA	38,72	0,000553
17	Сигнальный путь Rap1	ADORA2A, ITGB2, VEGFA	36,32	0,000602
18	Цитомегаловирусная инфекция	PTGS2, STAT3, VEGFA	34,05	0,000663
19	Кальциевый сигнальный путь	ADORA2A, NOS2, VEGFA	31,78	0,000746
20	Пути возникновения рака	NOS2, PTGS2, STAT3, VEGFA	19,19	0,000534

Примечание: * – путь KEGG, ассоциированный с NLRP3.

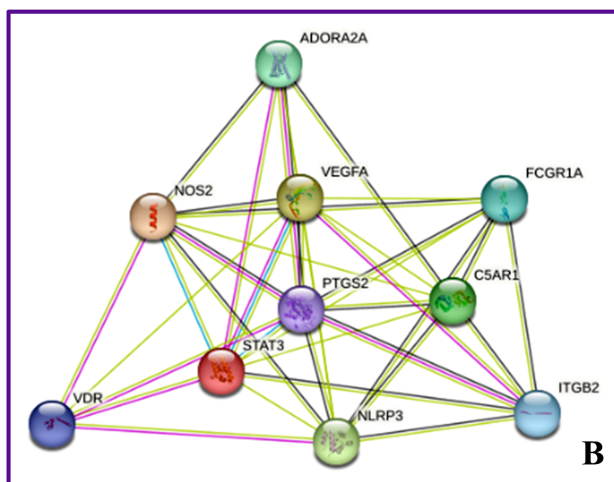
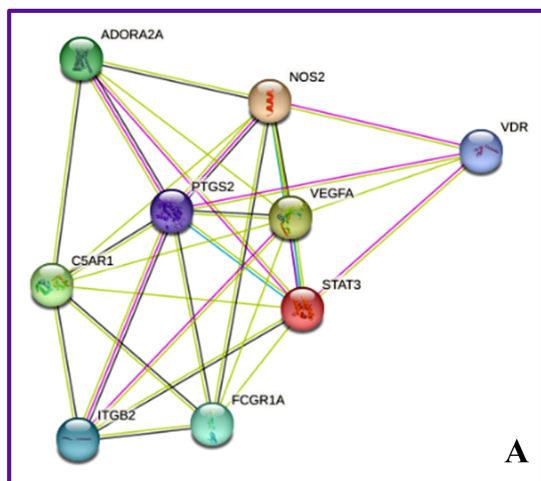


Рисунок 3. Анализ ББВ идентифицированных мишеней отдельно (А) и с NLRP3 (В). Узлы, представляющие каждый белок, представлены в виде сферических фигур, а заполненные узлы указывают на то, что 3D-структура известна или предсказана. Рёбрами показаны взаимодействия, предсказанные на основе экспериментально определённых данных (фиолетовый), гомологии белков (голубой), коэкспрессии (чёрный), соседства генов (зелёный) и коэкспрессии генов (синий). Изображения были получены из ShinyGO-String, рисунок построен с помощью Microsoft PowerPoint и GIMP 2.10.14 [35].

Отсутствие значимой связи между NLRP3 и другими мишенями в путях KEGG указывает на различия в функциональной ассоциации для большинства выявленных путей KEGG. Анализ частоты ассоциации генов показал, что максимальное число генов, связанное с тремя путями, ассоциированными с заболеваниями, а именно, с лейшманиозом, туберкулёзом и путями в онкологии равно 4 (табл. 1 и 2 и Дополнительные материалы табл. S2). Далее следуют 9, 20 и 64 пути, ассоциированные с 3, 2 и 1 путём(ями) соответственно (табл. 1, нижняя панель; табл. 2 и Дополнительные материалы табл. S2).

Таким образом, присутствие NLRP3 не изменяет ассоциацию целевых генов с путями KEGG, что подтверждается диаграммами, описывающими анализ обогащения функциональных путей

и деревьями иерархической кластеризации (Дополнительные материалы рис. S4). Анализ показал, что, за исключением замены ревматоидного артрита на COVID-19, добавление NLRP3 не привело к значительным изменениям путей обогащения KEGG. Однако были изменены значения обогащения и количество генов, ассоциированных с каждым путём. Деревья иерархической кластеризации также позволяют понять корреляцию между значимыми путями (Дополнительные материалы рис. S4A) через объединение путей, которые имеют общие гены. Иерархическая кластеризация выявила более значимые *p*-значения для туберкулёза и лейшманиоза.

Кроме того, для ранжирования генов было использовано 12 оценочных функций плагина cytoHubba в Cytoscape [25]. Консенсусный анализ показателей cytoHubba, проведённый без NLRP3, позволил определить шесть узловых генов, ранжированных следующим образом: STAT3 (1), ITGB2 (2), FCGR1A (3), C5AR1 (4), PTGS2 (5) и NOS2 (6); при анализе с NLRP3 ранжирование было следующим: STAT3 (1), PTGS2 (2), C5AR1 (3), FCGR1A (4), NLRP3 (5), ITGB2 (6) и NOS2 (7). Результаты свидетельствуют о том, что наличие NLRP3 действительно изменяет ББВ среди целевых генов, как и предполагалось ранее.

Скрининг и идентификация наиболее перспективных фитохимических соединений ГМ

Мы провели скрининг функционального взаимодействия фитокомпонентов ГМ методом *in silico* с выявленными мишенями и NLRP3 с целью выявления соединений, которые могут влиять на инфламмасом-зависимую смерть клеток, индуцированную ЦМ. В качестве контрольных веществ были использованы малые молекулы, сокристаллизованные с белками, загруженными из базы PDB, для каждого белка. Оценки энергии связывания по результатам виртуального скрининга представлены в таблице S4 Дополнительные материалов. После консенсусного анализа результатов докинга фитохимических соединений для каждого рецепторного сайта выгруженных белков и NLRP3, вещества были ранжированы от наименьшего\наилучшего (ранг 1) до наибольшего\наихудшего значения (ранг 29 — фитохимические вещества ГМ и контрольное сокристаллизованное соединение) (Дополнительные материалы табл. S5). Консенсусный анализ оценочной функции показал, что большинство фитохимических соединений горького мёда взаимодействуют с белками лучше, чем их сокристаллизованные аналоги. Положение десяти лучших фитохимических соединений ГМ и контрольного соединения среди 29 лигандов представлено в таблице 3. 2D-структуры этих 10 фитохимических веществ ГМ приведены на рисунке 4, а представительные сокристаллизованные лиганды — на рисунке S3 Дополнительные материалов. Консенсусный анализ продемонстрировал, что фитокомпоненты ГМ обладают потенциалом для функционального взаимодействия со всеми целевыми белками, особенно низкие значения показали первые 3 соединения (табл. 3).

Таблица 3. Ранговые оценки 10 наиболее перспективных соединений горького мёда после докинга с целевыми белками

Соединение	ADORA2A	C5AR1	FCGR1A	ITGB2	NLRP3	NOS2	PTGS2	STAT3	VDR	VEGFA	Средняя	
											Оценка	Ранг
Ergosta-5,22-dien-3-ol	1	1	1	3	1	2	3	2	6	2	2,2	1
Friedelan-3-one	4	2	2	1	2	4	1	3	7	1	2,6	2
Alpha-Amyrin	7	3	3	1	3	3	1	4	13	3	4,3	3
Aciphyllene	3	4	6	7	6	6	4	5	11	4	5,6	4
(E)-2-bromobutyloxychalcone	5	5	4	17	5	5	5	11	2	8	6,7	5
Beta-Guaiene	6	9	7	4	10	8	6	9	4	5	6,8	6
5-Acetamido-4,7-dioxo-4,7-dihydrobenzofurazan	15	10	5	4	8	11	8	6	7	6	8,0	7
Octahydronaphthalene	9	5	8	7	11	10	7	11	5	9	8,2	8
aR-Turmerone	7	7	9	9	8	9	9	14	10	7	8,9	9
1H-Cyclopropa[a]naphthalene	10	7	10	14	7	7	10	11	14	10	10,0	10
Контроль (Сокристаллизованный лиганд)	2	25	19	12	4	1	25	1	1	24	—	—

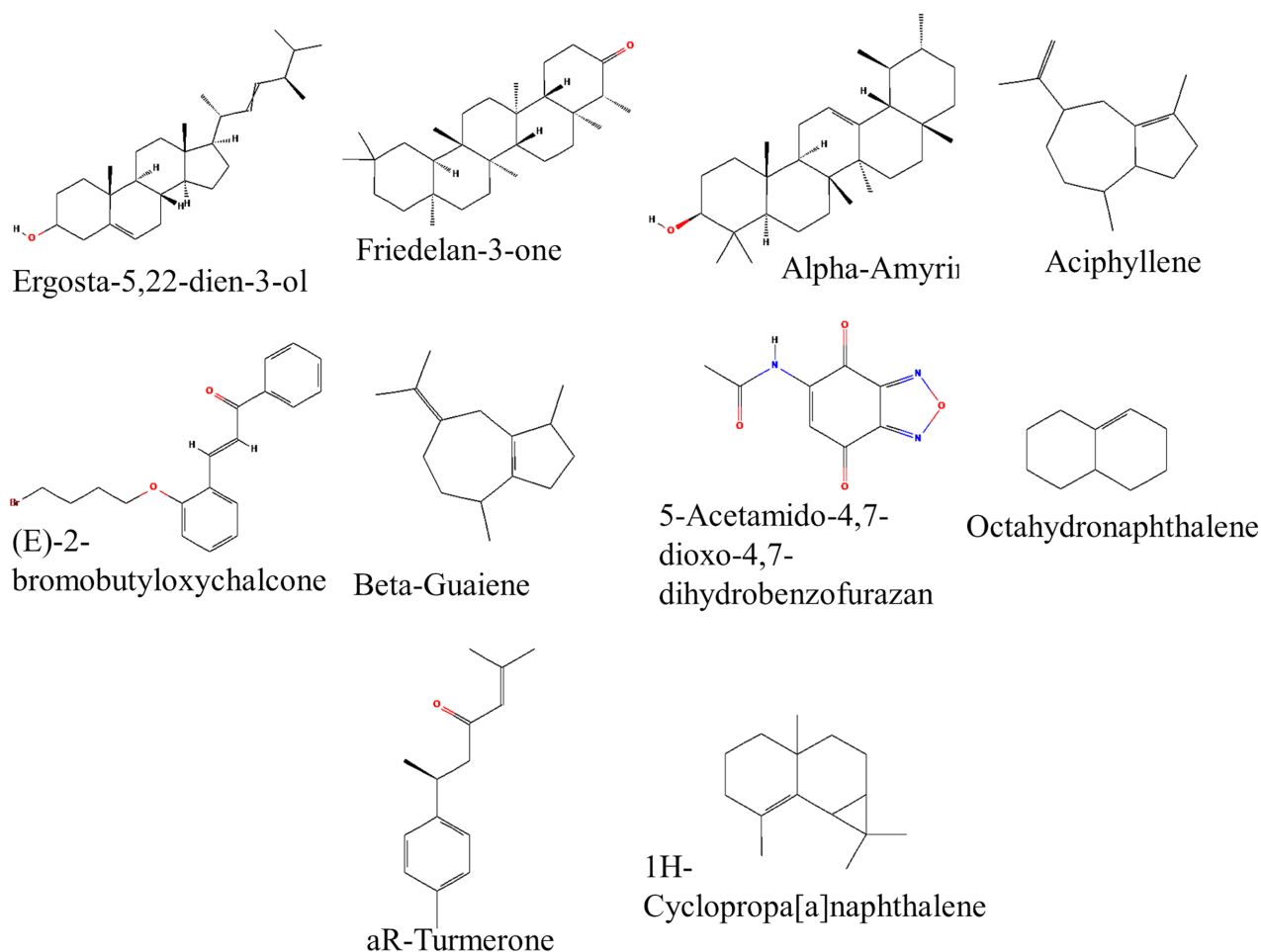


Рисунок 4. 2D-структуры 10 наиболее перспективных фитохимических соединений, полученных из ГМ, имеющих функциональное взаимодействие с идентифицированными белками-мишенями и NLRP3.

ГОРЬКИЙ МЁД В ПОДАВЛЕНИИ ИНФЛАММАСОМ-ЗАВИСИМОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК

Мы также оценили ADMET свойства 10 фитохимических соединений с наименьшим значением оценочной функции с помощью онлайн-сервисов pkCSM и admetlab2.0 [33, 34]. Наш анализ показал, что выбранные фитохимические вещества обладают хорошими ADMET-свойствами (табл. 4 и Дополнительные материалы табл. S6). В частности, три лучших соединения продемонстрировали высокую вероятность кишечной абсорбции, проницаемости через гематоэнцефалический (ГЭБ) барьер в ЦНС, а также очень низкую потенциальную токсичность (табл. 4). Эти соединения имеют схожие структурные осто́вы (рис. 4), что представляет собой

дополнительное преимущество, которое можно использовать для повышения активности, направленной на индуцированную инфламмасомой клеточную гибель при церебральной малярии. Интересно, что три лучших фитоконпонента в основном занимали 1 и 3 места по взаимодействию с узловыми генами (белковыми продуктами), что ещё раз подтверждает их потенциальное функциональное взаимодействие с несколькими мишенями.

Схема взаимодействия для фитохимического соединения с наименьшим показателем оценочной функции и контрольного сокристаллизованного лиганда для каждого из целевых белков и NLRP3 представлена на рисунке 5. Анализ

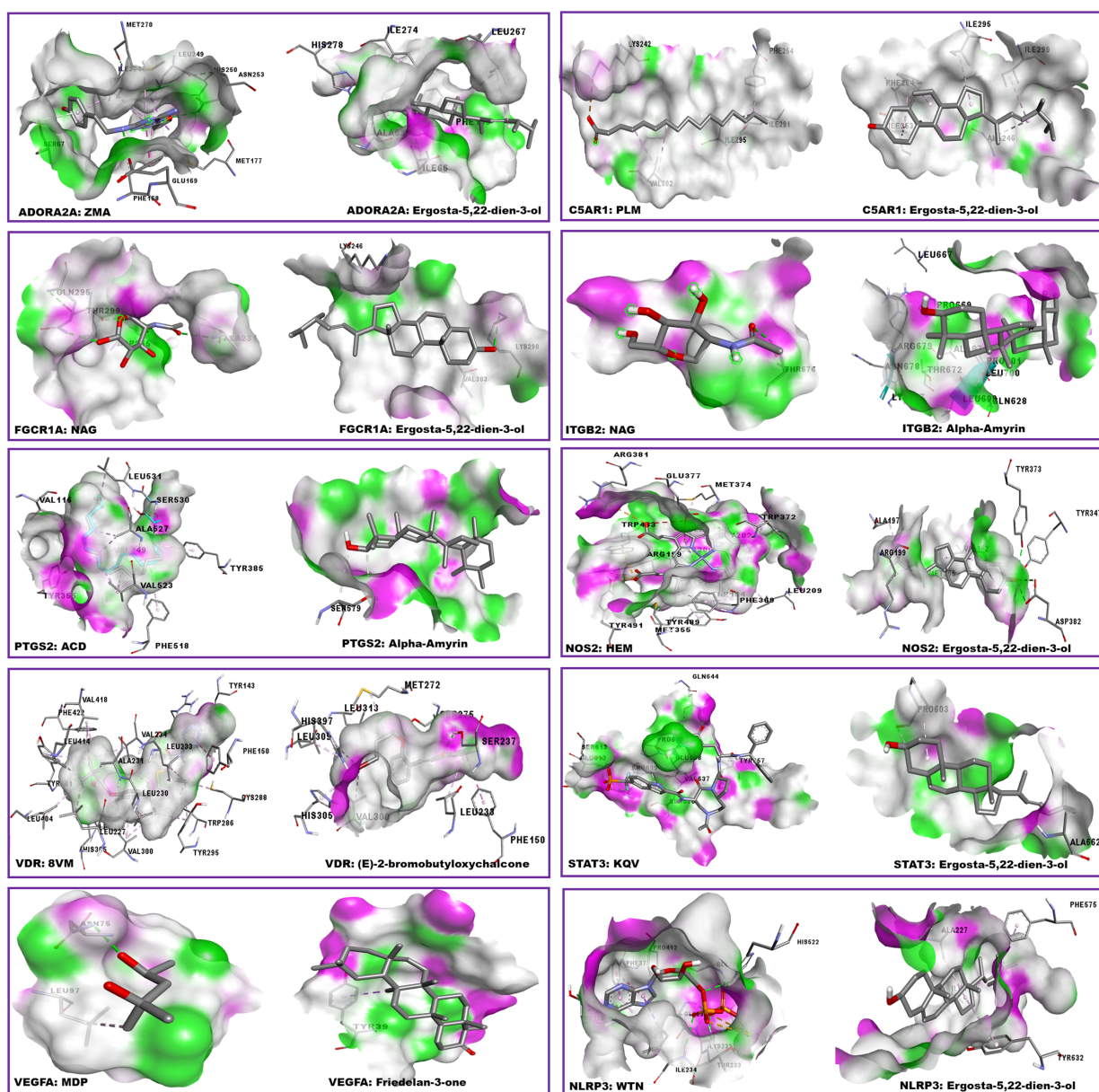


Рисунок 5. Репрезентативный анализ взаимодействия наиболее перспективных фитохимических соединений и сокристаллизованных лигандов с выбранными белками. Изображения помечены как “белок : лиганд”. Лиганды и взаимодействующие с ними остатки белков представлены в виде палочек, окрашенных по элементам. Водородные связи показаны в виде поверхности с оттенками фиолетового и зелёного, обозначающими донор и акцептор водорода соответственно. Взаимодействие водородных связей обозначено зелёными прерывистыми линиями. Изображения были созданы с помощью ADSV, представлены с помощью Microsoft PowerPoint и подготовлены с помощью GIMP 2.10.14 [35]. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи на сайте журнала.

Таблица 4. Некоторые ADMET свойства 10 наиболее перспективных соединений горького мёда

Соединение	Липински	Экскреция	Pgn		Проницаемость						Токсичность			Ранг
			INH	SUB	Caco2	I#	Кожа	ЦНС	ГЭБ	DILI	Ames	C*		
Ergosta-5,22-dien-3-ol	YES	Moderate	0,064	0,001	1,213	94,515	-2,819	-1,719	0,857	0,114	0,030	0,047	1	
Friedelan-3-one	YES	High	0,086	0	1,236	97,452	-2,722	-1,471	0,484	0,022	0,038	0,012	2	
Alpha-Amyrin	YES	High	0,181	0	1,327	94,156	-2,811	-1,809	0,762	0,012	0,011	0,017	3	
Aciphyllene	YES	Moderate	0,200	0	1,408	94,084	-1,518	-2,182	0,884	0,394	0,015	0,602	4	
(E)-2-bromobutyloxychalcone	YES	Low	0,991	0,001	1,288	93,522	-2,654	-1,382	0,109	0,745	0,653	0,744	5	
Beta-Guaiene	YES	Moderate	0,922	0,001	1,416	94,704	-1,596	-2,149	0,377	0,729	0,011	0,583	6	
5-Acetamido-4,7-dioxo-4,7-dihydrobenzofurazan	YES	Low	0,247	0,001	0,133	78,303	-2,88	-3,199	0,982	0,992	0,950	0,943	7	
Octahydronaphthalene	YES	High	0,002	0	1,415	94,484	-1,434	-1,858	0,890	0,045	0,011	0,770	8	
aR-Turmerone	YES	Moderate	0,766	0,002	1,667	95,352	-1,377	-1,707	0,202	0,259	0,015	0,475	9	
1H-Cyclopropa[a]naphthalene	YES	Moderate	0,024	0,008	1,591	95,848	-1,728	-1,292	0,845	0,879	0,873	0,881	10	

Примечание. Pgn – P-гликопротеины; INH – ингибитор; SUB – субстрат; I# – кишечник; ЦНС – центральная нервная система; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; DILI – лекарственно-индуцированное поражение печени; C* – канцерогенность. Pgn (INH и SUB), ГЭБ и токсичность (DILI, Ames и C*) оцениваются по шкале вероятности от 0 (НЕТ) до 1 (ДА). Caco2 > 0,90, кишечник > 90%, кожа < -2,50 и ЦНС > -2 рассматривались, как соответствующие требованиям.

взаимодействий показал, что за исключением VDR, для которого было показано предпочтительное взаимодействие с (E)-2-bromobutyloxuchalcone, наилучшее взаимодействие с другими целевыми белками и NLRP3 демонстрируют три перспективных фитохимических соединения: Ergosta-5,22-dien-3-ol, Friedelan-3-one и Alpha-Amyrin. Среди них Ergosta-5,22-dien-3-ol занял первое место во взаимодействии с шестью мишенями. Кроме того, это вещества доступны на рынке, а их количество в ГМ по данным ГХ-МС составляет 3,18%, 13,55% и 1,08% для Ergosta-5,22-dien-3-ol, Friedelan-3-one и Alpha-Amyrin соответственно (Дополнительные материалы табл. S7). Несмотря на то, что фитохимические соединения взаимодействуют с аминокислотными остатками в пределах картированного рецепторного сайта, с некоторыми сходными остатками контрольного сокристаллизованного лиганда, и образуют водородные связи с ключевыми аминокислотными остатками, что предполагает стабильность взаимодействия, функциональная значимость этих взаимодействий требует дальнейшего изучения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Инфламмасомы — это сложные белковые комплексы, расположенные в цитозоле. Их формирование происходит под действием стимулов, связанных с инфекцией или стрессом [39]. Они являются ключевым компонентом системы врождённого иммунитета и участвуют в распознавании внутриклеточных патогенов, а также эндогенных сигналов опасности, известных как повреждающие молекулярные паттерны (DAMPs) [40]. Активация инфламмасомы может быть инициирована широким спектром микробных патогенов, и её основная функция заключается в участии в защитном механизме хозяина путём быстрого запуска воспалительного ответа и ограничения репликации патогена [41]. Последние исследования показали, что инфламмасома, помимо своего участия в иммунной защите, играет ключевую роль в регуляции воспалительных реакций и клеточном апоптозе [42]. Существует несколько типов инфламмасом, но наиболее изученной и хорошо охарактеризованной является инфламмасома семейства NOD, содержащая белок NLRP3. Аберрантная активация NLRP3 инфламмасомы, в частности, была связана с несколькими неврологическими заболеваниями, включая ЦМ [36, 38]. Таким образом, NLRP3 является критическим фактором в ЦМ, и любое прямое или косвенное взаимодействие с малыми молекулами может оказывать глубокое влияние на пути активации NLRP3 инфламмасомы.

При церебральной малярии (ЦМ) факторы, выделяемые паразитами *P. falciparum*, а также молекулы, поступающие от хозяина, могут активировать инфламмасому NLRP3 [36]. Как сообщалось ранее [5], это, несомненно, сложное взаимодействие многих факторов, таких как нейротрансмиттеры, молекулярные шапероны, медиаторы воспаления и инфламмасомы. В данном

исследовании, используя комбинацию сравнительного анализа генов и сетевой фармакологии, мы выявили 9 генов-мишеней, связанных с воспалением, инфламмасомой, ЦМ и обладающих потенциалом функционального и физического взаимодействия. Анализ ББВ выявил значимые ($p = 2,64e-08$) функциональные и физические взаимодействия между этими генами (белковыми продуктами). Далее мы изучили потенциал функционального взаимодействия продуктов этих генов с NLRP3, хорошо изученным белком инфламмасомы. Увеличение числа значимых ($p=1,05e-11$) функциональных и физических взаимодействий с 29 до 38 наглядно демонстрирует потенциальное функциональное взаимодействие между 9 консенсусными белками и NLRP3, а также потенциал выявленных мишеней для модуляции активности NLRP3. Это также подтверждается анализом генной онтологии и обогащения, который показал, что NLRP3 также был обнаружен в ассоциации с этими генами в нескольких БФ. Идентифицированными генами являются: ADORA2A, C5AR1, FCGR1A, ITGB2, NOS2, PTGS2, STAT3, VEGFA и VDR. Однако анализ Cytoscape определил шесть из них в качестве узловых генов (C5AR1, FCGR1A, ITGB2, NOS2, PTGS2, STAT3). Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что эти гены обладают потенциалом функционального взаимодействия с NLRP3, играют активную роль в воспалении, инфламмасоме и ЦМ и могут служить лекарственными мишенями при ЦМ и связанных с ним инфламмасомными путями [36, 43]. Кроме того, гибель клеток является фундаментальным биологическим процессом, происходящим в различных физиологических и патологических условиях, и в ряде работ были получены сведения о механизмах клеточной гибели при ЦМ с чёткой связью с медиаторами воспаления и инфламмасомой [43]. Данное исследование подтвердило, что значительная часть генов, связанных с ЦМ и инфламмасомой, также связана с воспалением.

В свете вышеуказанной важности идентифицированных мишеней, мы дополнительно изучили функциональное взаимодействие 9 мишеней, связанных с ЦМ-инфламмасомой, с фитохимическими соединениями, полученными из ГМ. *In silico* скрининг фитокомпонентов ГМ с этими мишенями и NLRP3 с помощью молекулярного докинга и ADMET выявил 10 наиболее перспективных соединений ГМ со значительно более высоким функциональным взаимодействием по сравнению с их соответствующими сокристаллизованными лигандами. Однако, учитывая такие сопутствующие преимущества, как высокая вероятность кишечной абсорбции, проницаемость через ГЭБ в ЦНС и очень низкий уровень прогнозируемой токсичности (табл. 4 и Дополнительные материалы табл. S6), три фитокомпонента ГМ с наименьшим значением оценочной функции могут быть исследованы в качестве “соединений-лидеров” против ЦМ и связанной с ним инфламмасомо-опосредованной гибелью клеток. Эти фитокомпоненты ГМ (Ergosta-5,22-dien-3-ol, Friedelan-3-one и Alpha-Amyrin), обладающие некоторым структурным сходством,

также показали очень сильное функциональное взаимодействие с шестью узловыми мишенями (рис. 5). Хотя функциональная значимость этих взаимодействий требует дальнейшего изучения, наблюдаемые взаимодействия с большим или эквивалентным числом ключевых аминокислотных остатков в рецепторном участке у большинства взаимодействующих структур, в сравнении с контрольным сокристаллизованным лигандом подтверждают потенциал этих фитокомпонентов, как перспективных лекарственных кандидатов. Хотя общий вывод, сделанный на основе анализа ADMET фитокомпонентов ГМ (табл. 4 и Дополнительные материалы табл. S6), показывает, что ГМ в значительной степени безопасен, потенциальное ингибирование отдельных фитокомпонентов Р-гликопротеинов I или II и hERG, а также их ингибирование или принадлежность к субстратам некоторых ключевых цитохромов P450 может свидетельствовать о возможных побочных эффектах и/или лекарственных взаимодействиях. Однако это требует дальнейшего подтверждения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы провели сравнительный анализ генов, связанных с церебральной малярией, воспалением, инфламасомами и фитокомпонентами горького мёда, используя диаграмму Венна, и выявили 9 консенсусных генов. Сетевой анализ выявил значительные функциональные и физические взаимодействия между этими мишенями отдельно и с NLRP3. Эти мишени задействованы во многих биологических функциях, имеют чёткую связь с воспалением, инфламасомами, прямо или косвенно связаны с церебральной малярией и, в большей степени, с инфламасомными путями NLRP3, что указывает на потенциал функционального взаимодействия. Дальнейший анализ с помощью Cytoscape выявил шесть узловых генов. Скрининг *in silico* фитохимических соединений, полученных из горького мёда с этими мишенями, выявил три наиболее перспективных кандидата для дальнейшей экспериментальной проверки. Основываясь на этих результатах, можно ожидать, что идентифицированные мишени являются потенциальными мишенями для лекарств, а горький мёд может способствовать подавлению гибели клеток посредством взаимодействия с этими мишенями.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данное исследование не получило ни одного гранта от организаций государственного, коммерческого или некоммерческого сектора.

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.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. World Health Organization (2023) World malaria report 2023. from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240086173>
2. Dondorp A.M., Nosten F., Yi P., Das D., Phyo A.P., Tarning J., Lwin K.M., Arie F., Hanpithakpong W., Lee S.J., Ringwald P., Silamut K., Imwong M., Chotivanich K., Lim P., Herdman T., An S.S., Yeung S., Singhasivanon P., Day N.P., Lindegardh N., Socheat D., White N.J. (2009) Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.*, **361**(5), 455–467. DOI: 10.1056/NEJMOA0808859
3. Desruisseaux M.S., Machado F.S., Weiss L.M., Tanowitz H.B., Golightly L.M. (2010) Cerebral malaria: A vasculopathy. *Am. J. Pathol.*, **176**, 1075–1078. DOI: 10.2353/ajpath.2010.091090
4. Shikani H.J., Freeman B.D., Lisanti M.P., Weiss L.M., Tanowitz H.B., Desruisseaux M.S. (2012) Cerebral malaria: We have come a long way. *Am. J. Pathol.*, **181**, 1484–1492. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.08.010
5. Daniyan M.O., Fisusi F.A., Adeoye O.B. (2022) Neurotransmitters and molecular chaperones interactions in cerebral malaria: Is there a missing link? *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 965569. DOI: 10.3389/fmolb.2022.965569
6. Palma-Morales M., Huertas J.R., Rodríguez-Pérez C. (2023) A comprehensive review of the effect of honey on human health. *Nutrients*, **15**(13), 3056. DOI: 10.3390/nu15133056
7. Floris I., Pusceddu M., Satta A. (2021) The Sardinian bitter honey: From ancient healing use to recent findings. *Antioxidants*, **10**(4), 506. DOI: 10.3390/antiox10040506
8. Adeoye B.O., Iyanda A.A., Daniyan M.O., Adeoye A.D., Oyerinde A.M., Olatinwo G.O. (2022) Botanical and bio-active markers of Nigerian bitter honey. *Trop. J. Nat. Prod. Res.*, **6**(11), 1848–1853. DOI: 10.26538/tjnpr/v6i11.17
9. Adeoye O.B., Iyanda A.A., Daniyan M.O., Adeoye D.A., Olajide O.L., Akinlawo O.O., Olajide O.L., Akinlawo O.O., Adetunji A.O., Osundina B.O., Olatinwo O.M. (2023) Anti-dyslipidaemia and cardio-protective effects of Nigerian bitter honey in streptozotocin induced diabetic rats. *Univers. J. Pharm. Res.*, **8**(2), 10–18. DOI: 10.22270/ujpr.v8i2.920
10. Adeoye O.B., Ayobola I.A., Daniyan M.O., Ekundina V.O., Adeoye D.A., Abijo Z.A., Akin-Akanbi F.B. (2022) Ameliorative effects of Nigerian bitter honey on streptozotocin-induced hepatorenal damage in Wistar rats. *Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University*, **11**(1), 65–76.
11. Adeoye B.O., Iyanda A.A., Oyerinde A.M., Oyeleke I.O., Fadeyi B.O. (2022) Inhibitory effects of Nigerian sweet and bitter honey on pancreatic alpha amylase activity. *Nigerian J. Nutr. Sci.*, **43**(2), 19–24.
12. Li X., Wei S., Niu S., Ma X., Li H., Jing M., Zhao Y. (2022) Network pharmacology prediction and molecular docking-based strategy to explore the potential mechanism

- of Huanglian Jiedu Decoction against sepsis. *Comput. Biol. Med.*, **144**, 105389. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2022.105389
13. Dai W., Chen H.-Y., Chen C.Y.-C. (2018) A network pharmacology-based approach to investigate the novel TCM formula against Huntington's disease and validated by support vector machine model. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, **2018**, 6020197. DOI: 10.1155/2018/6020197
 14. Joshna K., Gopal V., Kavitha B. (2022) Analysis of bitter honey using gas chromatography and tandem mass spectrometry. *Bioinformatics*, **18**(3), 196–199. DOI: 10.6026/97320630018196
 15. Castell A., Arroyo-Manzanares N., Guerrero-Núñez Y., Campillo N., Viñas P. (2023) Headspace with gas chromatography-mass spectrometry for the use of volatile organic compound profile in botanical origin authentication of honey. *Molecules*, **28**(11), 4297. DOI: 10.3390/molecules28114297
 16. Kim S., Chen J., Cheng T., Gindulyte A., He J., He S., Li Q., Shoemaker B.A., Thiessen P.A., Yu B., Zaslavsky L., Zhang J., Bolton E.E. (2018) PubChem 2019 update: Improved access to chemical data. *Nucleic Acids Res.*, **47**(D1), D1102–D1109. DOI: 10.1093/nar/gky1033
 17. Dassault Systèmes BIOVIA (2015) Discovery studio modelling environment, Release 4.5, San Diego: Dassault Systèmes.
 18. Stelzer G., Rosen N., Plaschkes I., Zimmerman S., Twik M., Fishilevich S., Stein T.I., Nudel R., Lieder I., Mazor Y., Kaplan S., Dahary D., Warshawsky D., Guan-Golan Y., Kohn A., Rappaport N., Safran M., Lancet D. (2016) The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. *Curr. Protoc. Bioinformatics*, **54**, 1.30.1-1.30.33. DOI: 10.1002/cpbi.5
 19. Koscielny G., An P., Carvalho-Silva D., Cham J.A., Fumis L., Gasparyan R., Hasan S., Karamanis N., Maguire M., Papa E., Pierleoni A., Pignatelli M., Platt T., Rowland F., Wankar P., Bento A.P., Burdett T., Fabregat A., Forbes S., Gaulton A., Gonzalez C.Y., Hermjakob H., Hersey A., Jupe S., Kafkas S., Keays M., Leroy C., Lopez F.J., Magarinos M.P., Malone J., McEntyre J., Munoz-Pomer Fuentes A., O'Donovan C., Papatheodorou I., Parkinson H., Palka B., Peshall J., Petryszak R., Pratanwanich N., Sarntinijal S., Saunders G., Sidiropoulos K., Smith T., Sondka Z., Stegle O., Tang Y.A., Turner E., Vaughan B., Vrousseau O., Watkins X., Martin M.J., Sanseau P., Vamathevan J., Birney E., Barrett J., Dunham I. (2017) Open Targets: A platform for therapeutic target identification and validation. *Nucleic Acids Res.*, **45**(D1), D985–D994. DOI: 10.1093/nar/gkw1055
 20. Daina A., Michielin O., Zoete V. (2019) SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res.*, **47**(W1), W357–W364. DOI: 10.1093/nar/gkz382
 21. Draw Venn Diagram. <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>
 22. Gupta M.K., Gouda G., Selvaraj S., Donde R., Dash G.K., Ramakrishna V., Behera L. (2021) Gene Ontology and Pathway Enrichment Analysis. In: *Bioinformatics in Rice Research: Theories and Techniques* (Gupta, M.K., Behera, L., eds.), pp. 257–279. Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-16-3993-7_12
 23. Ge S.X., Jung D., Yao R. (2020) ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics*, **36**(8), 2628–2629. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz931
 24. Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P., Jensen L.J., Mering C.V. (2019) STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.*, **47**(D1), D607–D613. DOI: 10.1093/nar/gky1131
 25. Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. (2003) Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, **13**(11), 2498–2504. DOI: 10.1101/gr.1239303
 26. Burley S.K., Bhikadiya C., Bi C., Bittrich S., Chao H., Chen L., Craig P.A., Crichtlow G.V., Dalenberg K., Duarte J.M., Dutta S., Fayazi M., Feng Z., Flatt J.W., Ganesan S., Ghosh S., Goodsell D.S., Green R.K., Guranovic V., Henry J., Hudson B.P., Khokhriakov I., Lawson C.L., Liang Y., Lowe R., Peisach E., Persikova I., Piehl D.W., Rose Y., Sali A., Segura J., Sekharan M., Shao C., Vallat B., Voigt M., Webb B., Westbrook J.D., Whetstone S., Young J.Y., Zalevsky A., Zardecki C. (2023) RCSB protein data bank (RCSB.org): Delivery of experimentally-determined PDB structures alongside one million computed structure models of proteins from artificial intelligence/machine learning. *Nucleic Acids Res.*, **51**(D1), D488–D508. DOI: 10.1093/nar/gkac1077
 27. Daniyan M.O., Ojo O.T. (2019) *In silico* identification and evaluation of potential interaction of *Azadirachta indica* phytochemicals with *Plasmodium falciparum* heat shock protein 90. *J. Mol. Graph. Model.*, **87**, 144–164. DOI: 10.1016/j.jmgm.2018.11.017
 28. Johansson M.U., Zoete V., Michielin O., Guex N. (2012) Defining and searching for structural motifs using DeepView/Swiss-PdbViewer. *BMC Bioinformatics*, **13**, 173. DOI: 10.1186/1471-2105-13-173
 29. Pedretti A., Villa L., Vistoli G. (2002) VEGA: A versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs. *J. Mol. Graph. Model.*, **21**(1), 47–49. DOI: 10.1016/s1093-3263(02)00123-7
 30. Trott O., Olson A.J. (2010) AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.*, **31**(2), 455–461. DOI: 10.1002/jcc.21334
 31. Korb O., Stützle T., Exner T.E. (2006) PLANTS: Application of Ant Colony Optimization to Structure-Based Drug Design. In: *Ant Colony Optimization and Swarm Intelligence* (Dorigo M., Gambardella L.M., Birattari M., Martinoli A., Poli R., Stützle, T., eds.), pp. 247–258. Springer, Berlin, Heidelberg. DOI: 10.1007/11839088_22
 32. Durrant J.D., McCammon J.A. (2011) NNScore 2.0: A neural-network receptor-ligand scoring function. *J. Chem. Inf. Model.*, **51**, 2897–2903. DOI: 10.1021/ci2003889
 33. Pires D.E.V., Blundell T.L., Ascher D.B. (2015) pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem.*, **58**(9), 4066–4072. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00104
 34. Xiong G., Wu Z., Yi J., Fu L., Yang Z., Hsieh C., Yin M., Zeng X., Wu C., Lu A., Chen X., Hou T., Cao D. (2021) ADMETlab 2.0: An integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Res.*, **49**(W1), W5–W14. DOI: 10.1093/nar/gkab255
 35. The GIMP Development Team (2019) GIMP. The GNU Image Manipulation Program
 36. Ataíde M.A., Andrade W.A., Zamboni D.S., Wang D., Souza M.d.C., Franklin B.S., Elian S., Martins F.S., Pereira D., Reed G., Fitzgerald K.A., Golenbock D.T., Gazzinelli R.T. (2014) Malaria-induced NLRP12/NLRP3-dependent

- caspase-1 activation mediates inflammation and hypersensitivity to bacterial superinfection. *PLOS Pathog.*, **10**(1), e1003885. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003885
37. Blevins H.M., Xu Y., Biby S., Zhang S. (2022) The NLRP3 inflammasome pathway: A review of mechanisms and inhibitors for the treatment of inflammatory diseases. *Front. Aging Neurosci.*, **14**, 879021. DOI: 10.3389/fnagi.2022.879021
38. Chiarini A., Gui L., Viviani C., Armato U., Dal Prà I. (2023) NLRP3 inflammasome's activation in acute and chronic brain diseases — An update on pathogenetic mechanisms and therapeutic perspectives with respect to other inflammasomes. *Biomedicine*, **11**(4), 999. DOI: 10.3390/biomedicine11040999
39. de Zoete M.R., Palm N.W., Zhu S., Flavell R.A. (2014) Inflammasomes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **6**(12), a016287. DOI: 10.1101/cshperspect.a016287
40. Guo H., Callaway J.B., Ting J.P.-Y. (2015) Inflammasomes: Mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.*, **21**(7), 677–687. DOI: 10.1038/nm.3893
41. Lara-Reyna S., Caseley E.A., Topping J., Rodrigues F., Jimenez Macias J., Lawler S.E., McDermott M.F. (2022) Inflammasome activation: From molecular mechanisms to autoinflammation. *Clin. Transl. Immunology*, **11**, e1404. DOI: 10.1002/cti2.1404
42. Tsuchiya K. (2020) Inflammasome-associated cell death: Pyroptosis, apoptosis, and physiological implications. *Microbiol. Immunol.*, **64**(4), 252–269. DOI: 10.1111/1348-0421.12771
43. Sena-dos-Santos C., Braga-da-Silva C., Marques D., Azevedo dos Santos Pinheiro J., Ribeiro-dos-Santos Á., Cavalcante G.C. (2021) Unraveling cell death pathways during malaria infection: what do we know so far? *Cells*, **10**(2), 479. DOI: 10.3390/cells10020479

Поступила в редакцию: 01. 10. 2024.

После доработки: 25. 11. 2024.

Принята к печати: 28. 11. 2024.

THE EFFECT OF BITTER HONEY AGAINST CEREBRAL MALARIA-INDUCED INFLAMMASOME CELL DEATH: NETWORK PHARMACOLOGY-BASED *IN SILICO* EVALUATION

M.O. Daniyan^{1*}, O.B. Adeoye², E. Osirim^{1,3}, I.D. Asiyambola^{1,4}

¹Faculty of Pharmacy, Obafemi Awolowo University,

Ile-Ife, Osun State, Nigeria; *e-mail: mdaniyan@oauife.edu.ng

²Benjamin Carson (Snr.) School of Basic Medical Sciences, Babcock University, Ilishan-Remo, Ogun State, Nigeria

³Faculty of Basic Medical Science, Redeemer's University, Ede, Osun State, Nigeria

⁴College of Health Sciences, Osun State University, Osogbo, Osun State, Nigeria

Cerebral malaria (CM) is a fatal complication of *Plasmodium falciparum* infection. The biological and physiological links between CM, inflammation, and inflammasome, point to the complexity of its pathology. Resistance to available and affordable drugs, worsening economic crisis, and urgent need for integration of orthodox with traditional/alternative medicine, actualized the search for sustainable pharmacotherapy. Previous works from our team on the medicinal properties of bitter honey have established botanical and bioactive markers, inhibitory effects on pancreatic alpha-amylase activity, and anti-dyslipidemia, cardio-protective, and ameliorative effects on hepatorenal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. In this study, we have identified bitter honey (BH) derived phytochemicals using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), and 9 targets from genes associated with CM, inflammation, inflammasome, and BH phytochemicals. Network analysis revealed significant functional and physical interactions among these targets and NOD-, LRR-, and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3). Molecular docking of bitter honey-derived phytochemicals against these targets identified 3 most promising phytochemical candidates for further experimental validation. Based on these results, we predict that bitter honey may aid in the suppression of CM-mediated inflammasome cell death via its interactions with these targets.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: cerebral malaria; inflammation; inflammasome; bitter honey; phytochemicals; network pharmacology

Funding. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Received: 01.10.2024; revised: 25.11.2024; accepted: 28.11.2024.