

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОЦЕНОК *IN SILICO* ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РАЗРАБОТКИ СОСТАВА ФАРМКОМПОЗИЦИИ, ЦИТОТОКСИЧНОЙ В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

*Н.С. Ионов¹, М.А. Барышникова², Е.В. Бочаров², П.В. Погодин¹, А.А. Лагунин¹,
Д.А. Филимонов¹, Р.В. Карпова², О.А. Бочарова², В.В. Поройков¹*

¹ Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ)

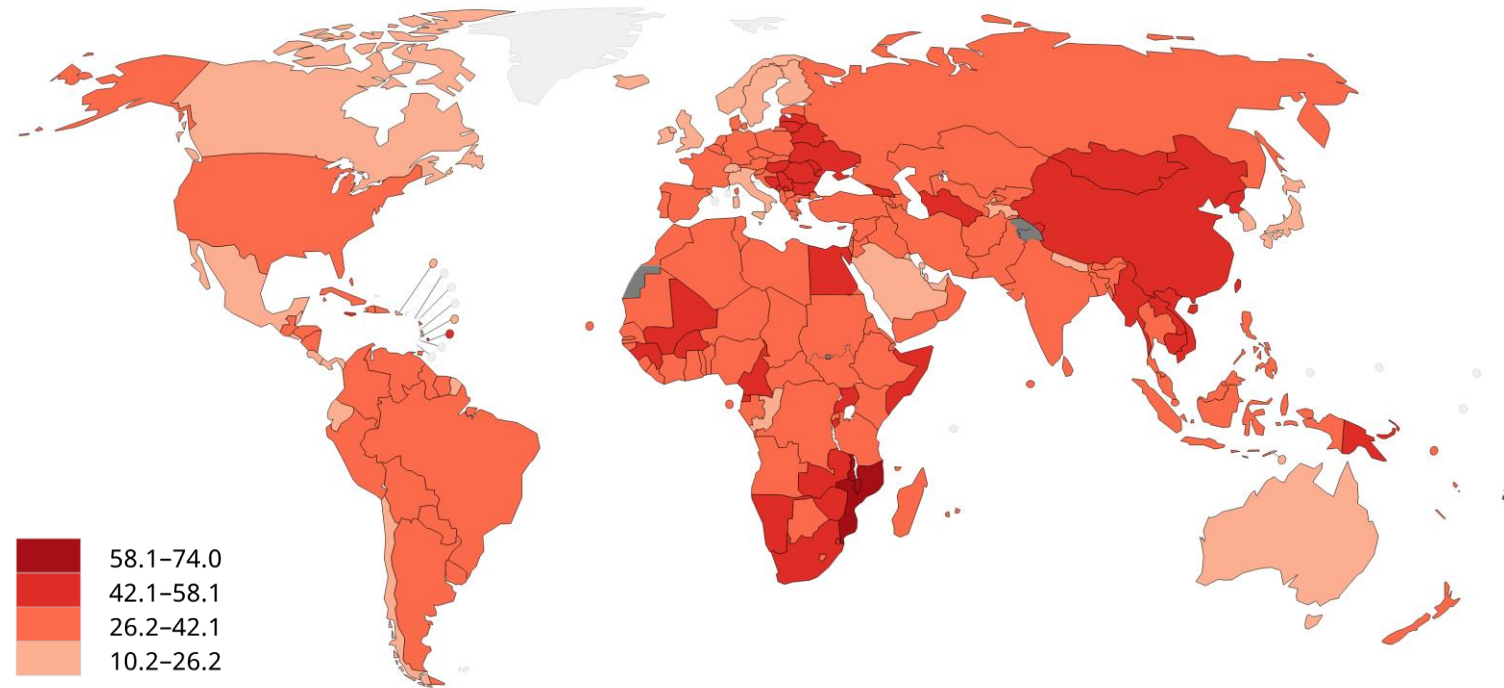
² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина

Москва, Россия

Актуальность работы

- В 2020 году было в мире было выявлено около 19.3 млн. новых случаев рака.
- По прогнозам, в 2040 году число новых больных может возрасти до 28.4 млн.**

Стандартизованные по возрасту коэффициенты смертности
(на 100 000 населения, от 0 до 59 лет, 2020)*

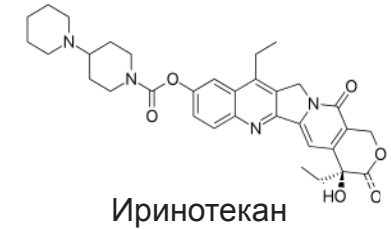
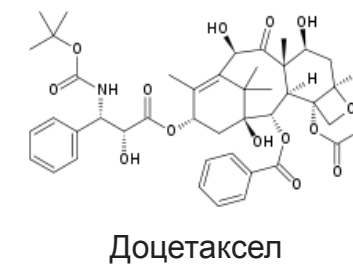
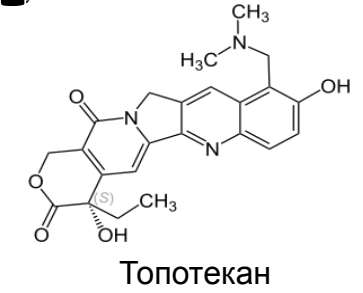
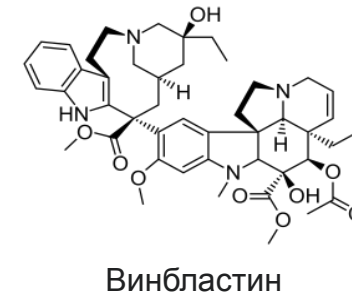


*<https://gco.iarc.fr/>

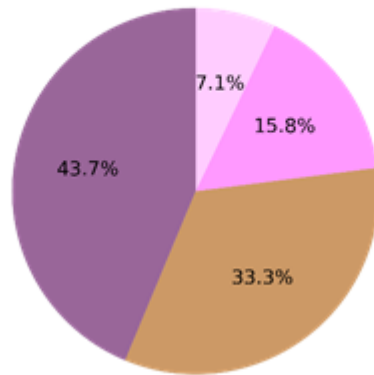
**Sung H. et al. *Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries* // CA: A Cancer Journal for Clinicians. – 2021.

Роль природных соединений в разработке лекарств

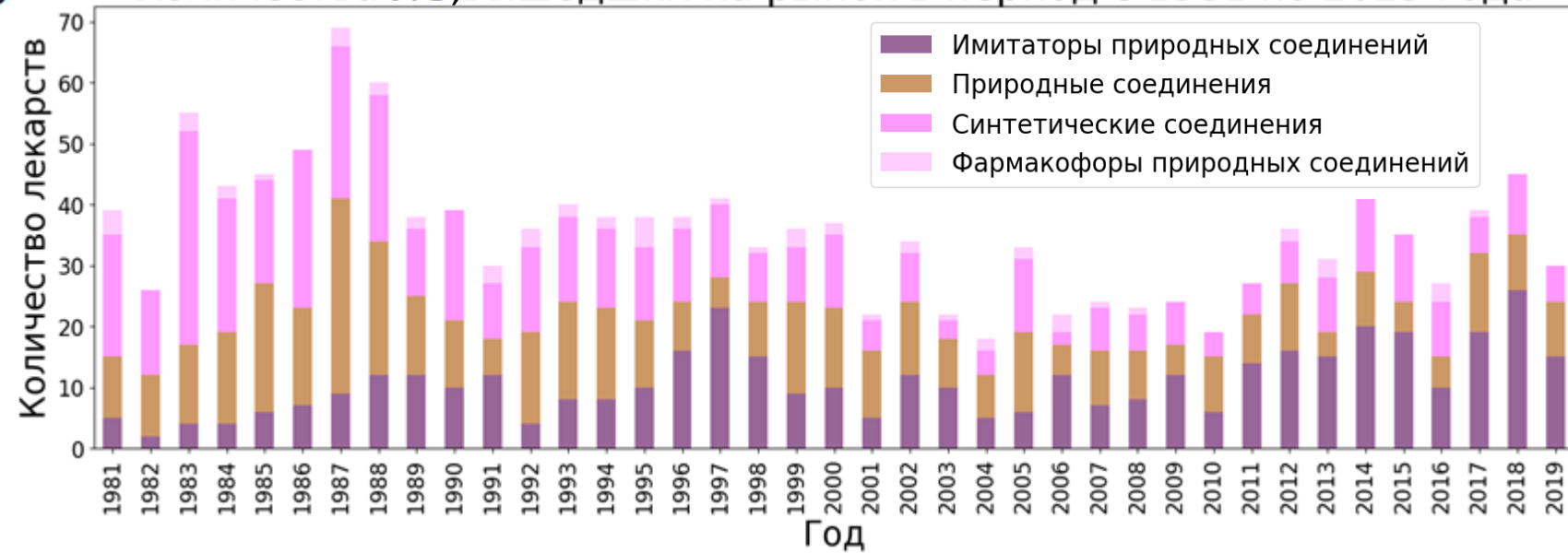
- По сравнению с синтетическими, природные соединения обладают более высоким структурным разнообразием и широким набором видов биологической активности.
- Полученные на основе природных соединений, ЛС составляют от 70% до 80% от всех новых препаратов, разработанных в 1981-2019 г.г.
- Свыше 50% всех противоопухолевых ЛС разработаны на основе веществ природного происхождения.



Соотношение групп противоопухолевых ЛС вышедших на рынок с 1981 по 2019*



Количества ЛС, вышедших на рынок в период с 1981 по 2019 года*

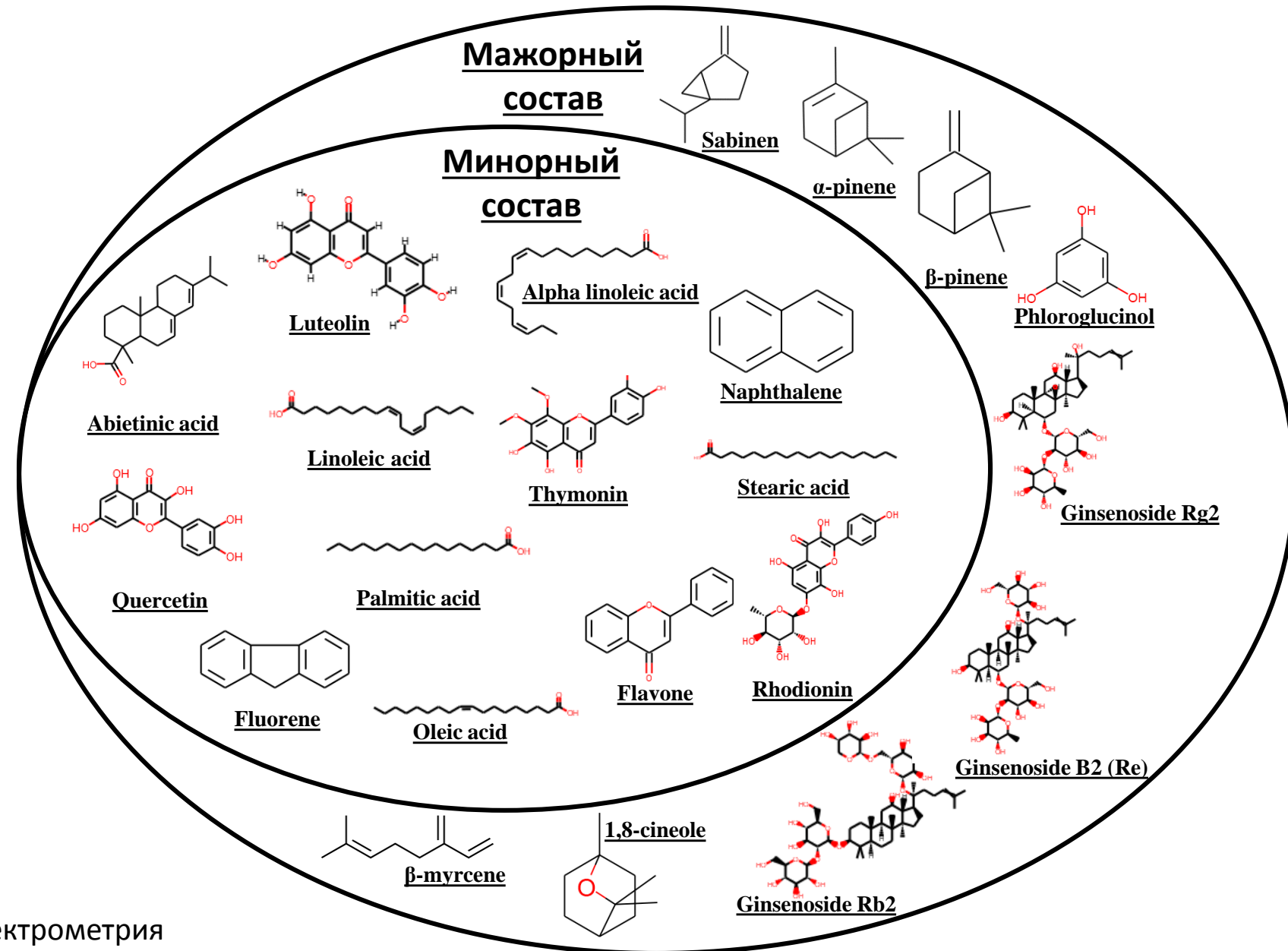


*Newman D. J., Cragg G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019 //Journal of natural products. – 2020. – Т. 83. – №. 3. – С. 770-803. (адаптировано)

Исследуемые фармацевтические композиции

В Национальном Центре онкологии им. Н. Н. Блохина был проведен скрининг растительных экстрактов, представляющих собой комплекс структурно разнообразных химических веществ, по их антипролиферативной активности *in vitro* на культуре опухолевых клеток человека.

Методами ГЖХ-МС* и ВЭЖХ-МС анализа были выявлены основные химические соединения, из которых составлены два варианта фармкомпозиции «Фитоладаптоген» – мажорной (22 соединения) и минорной (13 соединений).

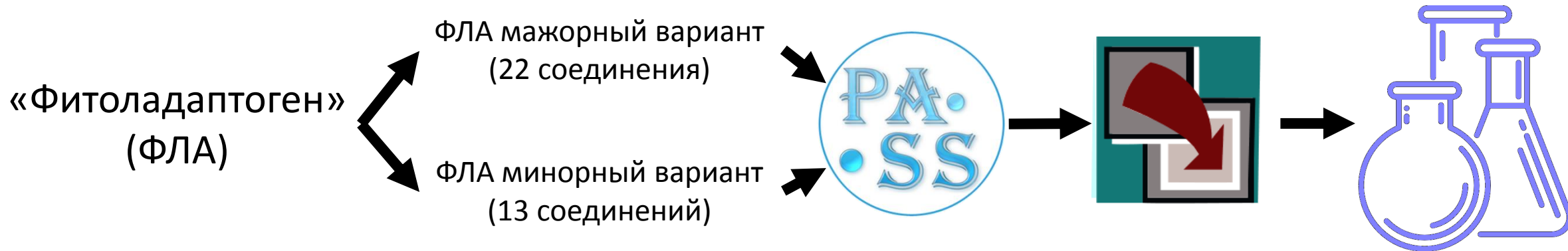


*Газо-жидкостная хроматография – масс спектрометрия

**Высокоэффективная жидкостная хроматография – масс спектрометрия

Цель исследования

Компьютерная оценка профилей противоопухолевого действия минорного и мажорного состава фармкомпозиции Фитоладаптоген (ФЛА) с использованием компьютерных программ PASS и PharmaExpert, а также валидация полученных *in silico* результатов в экспериментах *in vitro*.



Материалы и методы

In silico

- Спектры биологической активности отдельных фитокомпонентов были оценены с использованием компьютерной программы PASS 2020 Refined [1], прогнозирующей 1945 видов активности со средней точностью около 97%.
- Анализ интегрального действия смеси фитокомпонентов с учётом возможных межлекарственных взаимодействий был проведен с применением программы PharmaExpert [2, 3].

In vitro

- Цитотоксичность двух вариантов фармацевтических композиций определяли с использованием МТТ-теста на клетках рака мочевого пузыря человека линии RT-112.
- Механизм клеточной гибели оценивали с помощью метода двойного окрашивания аннексином V и пропидием йодидом, а также детектированием активной каспазы-3.

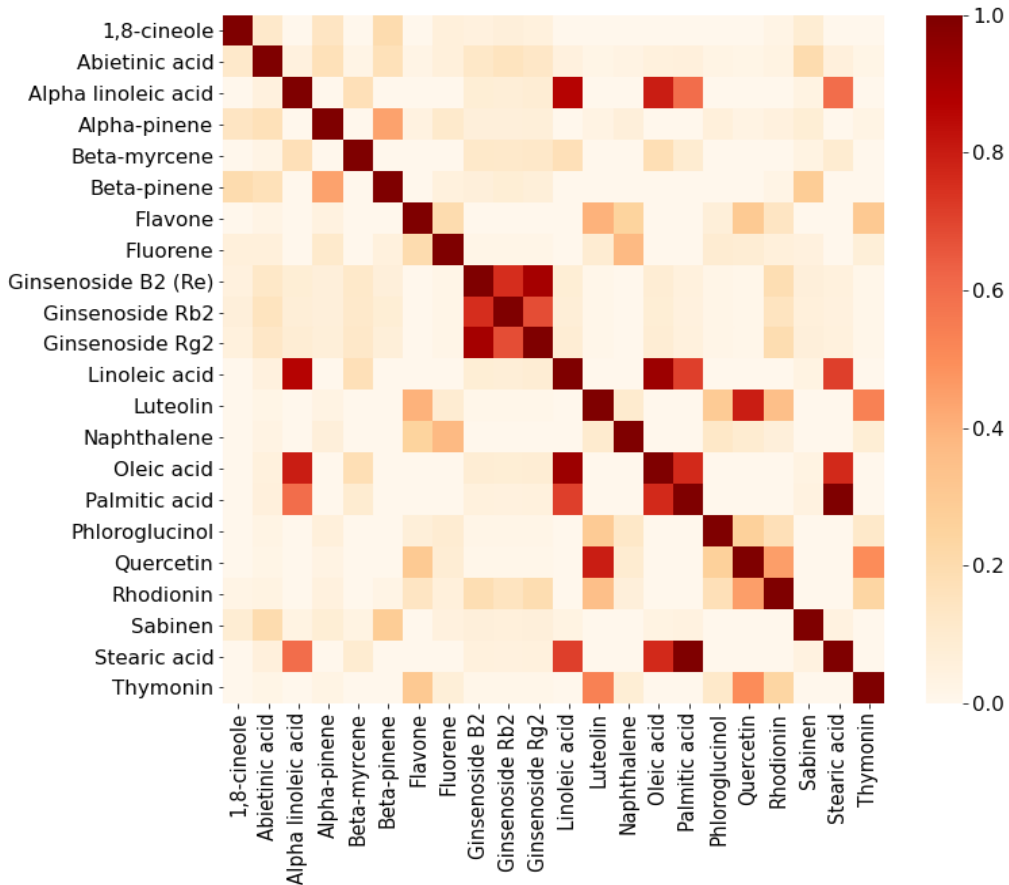
1. Поройков В. В. Компьютерное конструирование лекарств: от поиска новых фармакологических веществ до системной фармакологии //Биомедицинская химия. – 2020. – Т. 66. – №. 1. – С. 30-41.

2. Lagunin et al. Chemo- and bioinformatics resources for in silico drug discovery from medicinal plants beyond their traditional use: a critical review. // Natural Product Reports. – 2014. – V. 31. – No. 11. – P. 1585-1611.

3. Goel R. K. et al. Pharmacological repositioning of *Achyranthes aspera* as an antidepressant using pharmacoinformatic tools PASS and PharmaExpert: a case study with wet lab validation //SAR and QSAR in Environmental Research. – 2018. – V. 29. – No. 1. – P. 69-81.

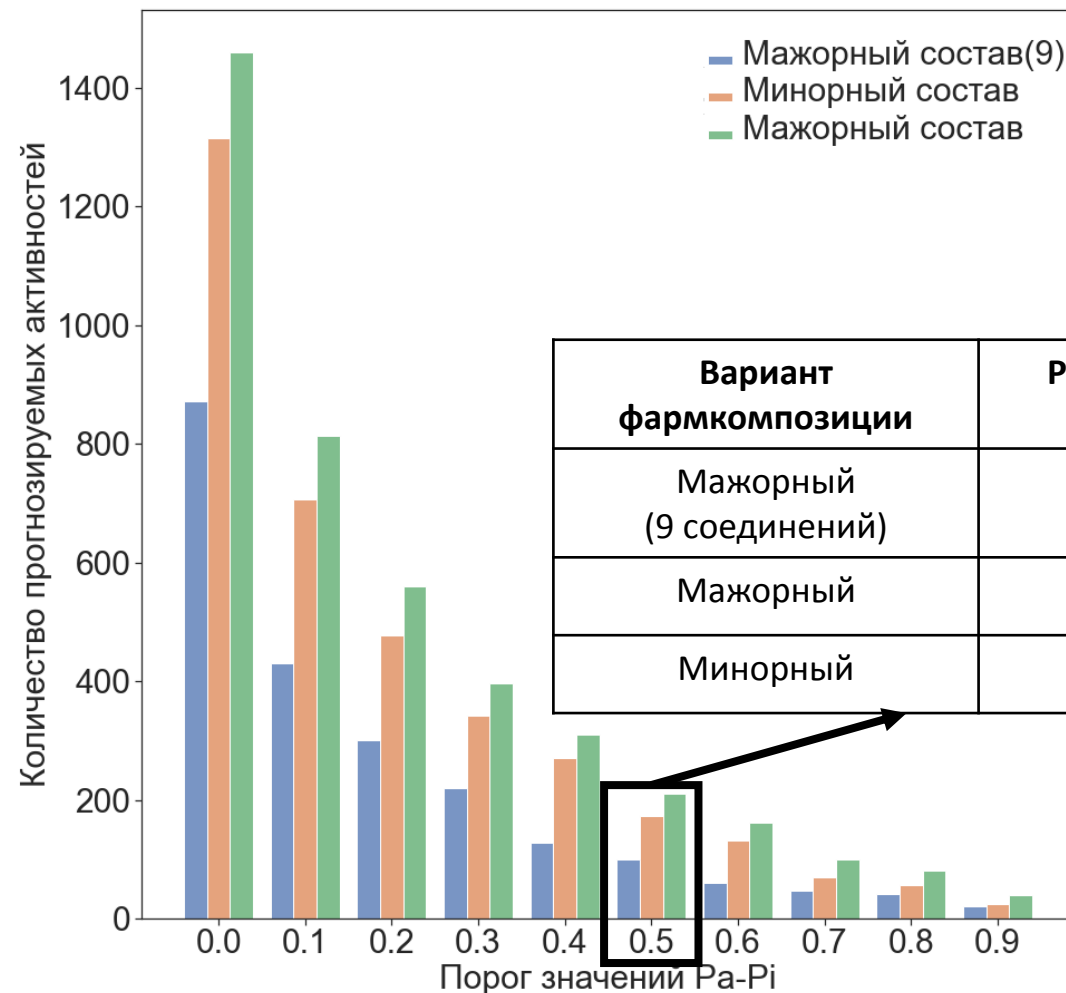
Анализ структурного разнообразия

Тепловая карта сходства между исследуемыми соединениями (Танимото, MNA-дескрипторы*)



Макс. значение сходства	Мин. Значение сходства	Среднее значение сходства
0.93	0	0.09±0.08

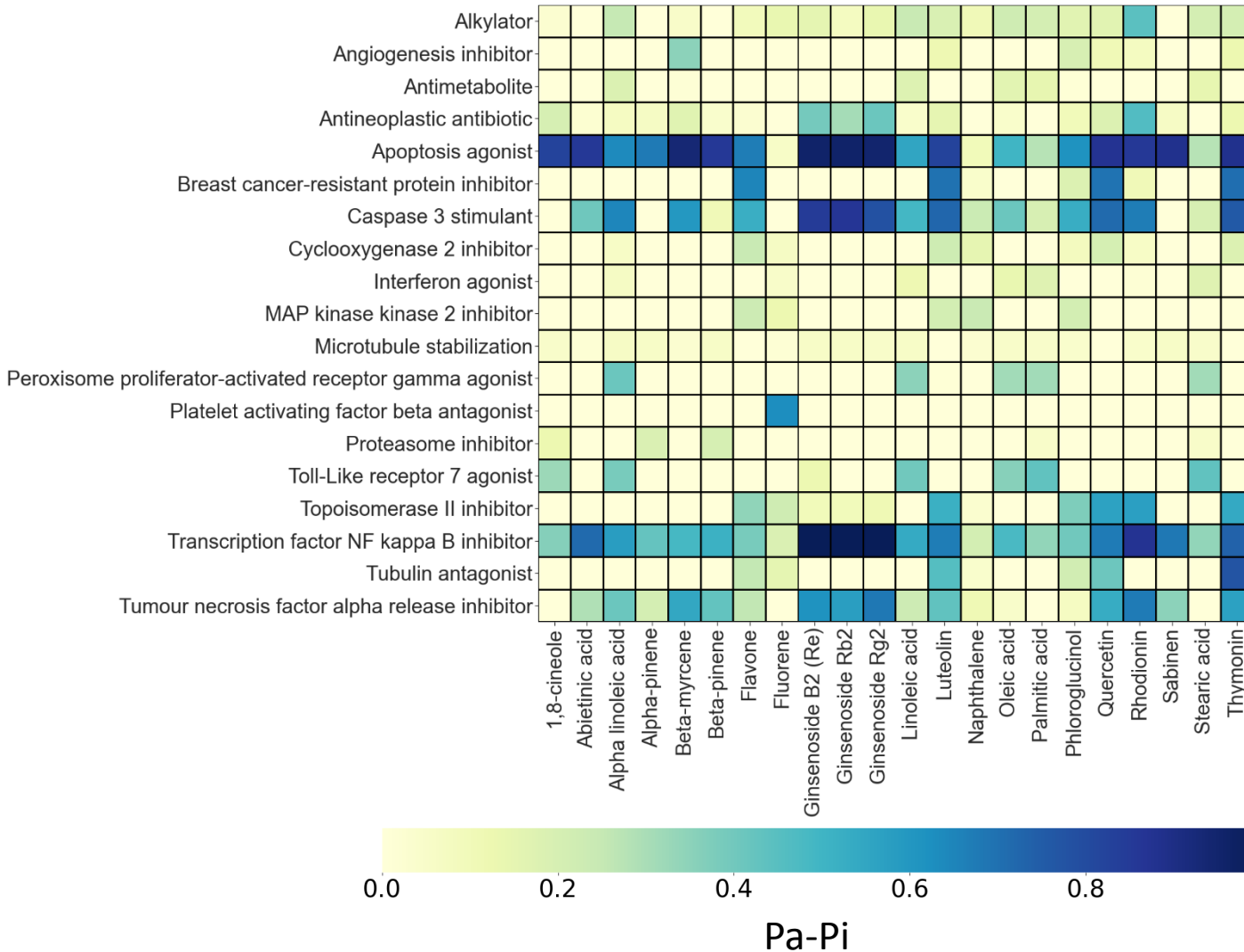
Количество прогнозируемых видов активности при различных порогах Pa-Pi



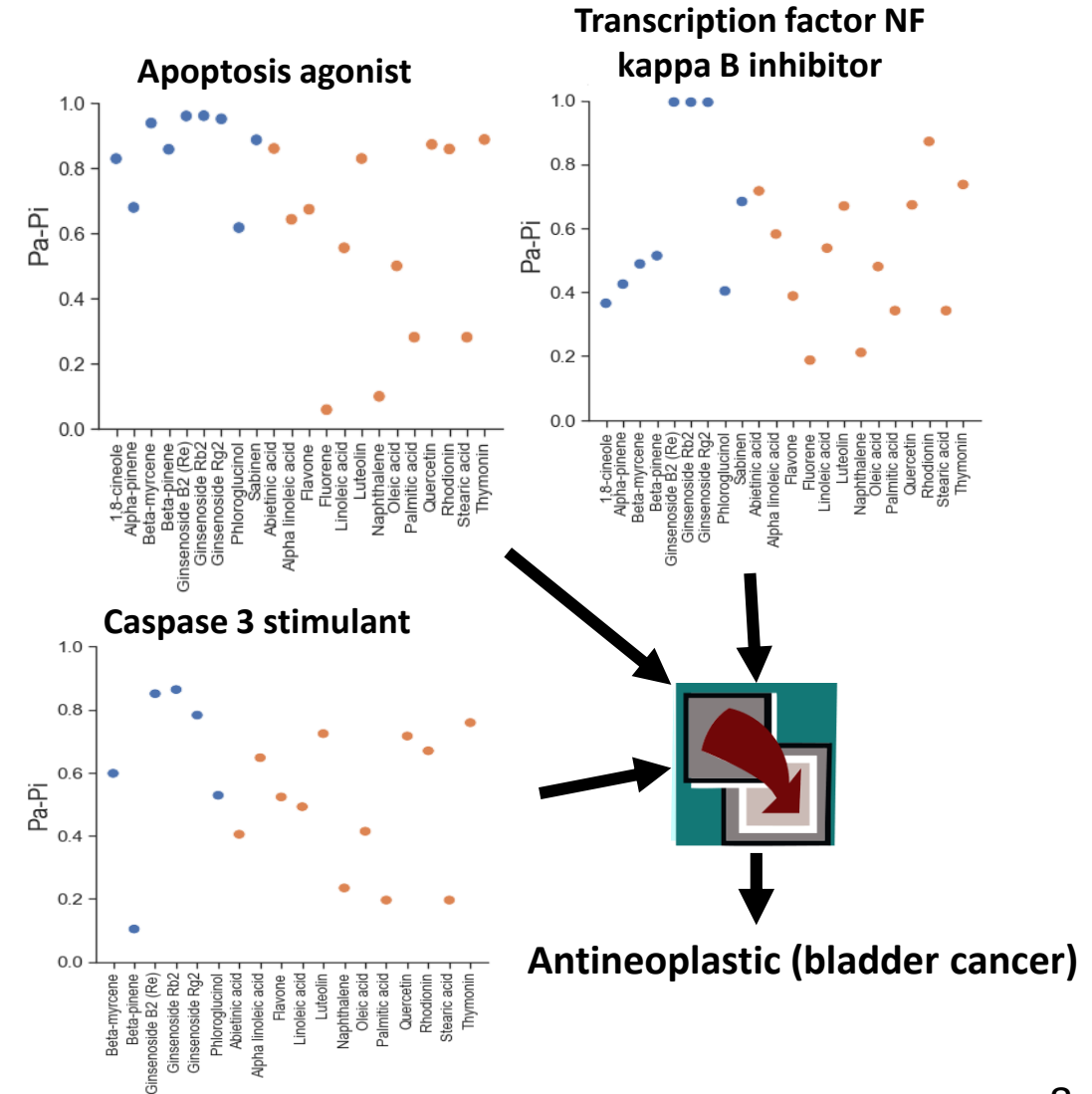
*Filimonov D. et al. Chemical similarity assessment through multilevel neighborhoods of atoms: definition and comparison with the other descriptors //Journal of Chemical Information and Computer Sciences. – 1999. – T. 39. – №. 4. – С. 666-670.

Анализ результатов прогноза противоопухолевого действия

Механизмы противоопухолевого действия: тепловая карта оценок Pa-Pi для отдельных соединений Фитоладаптогена

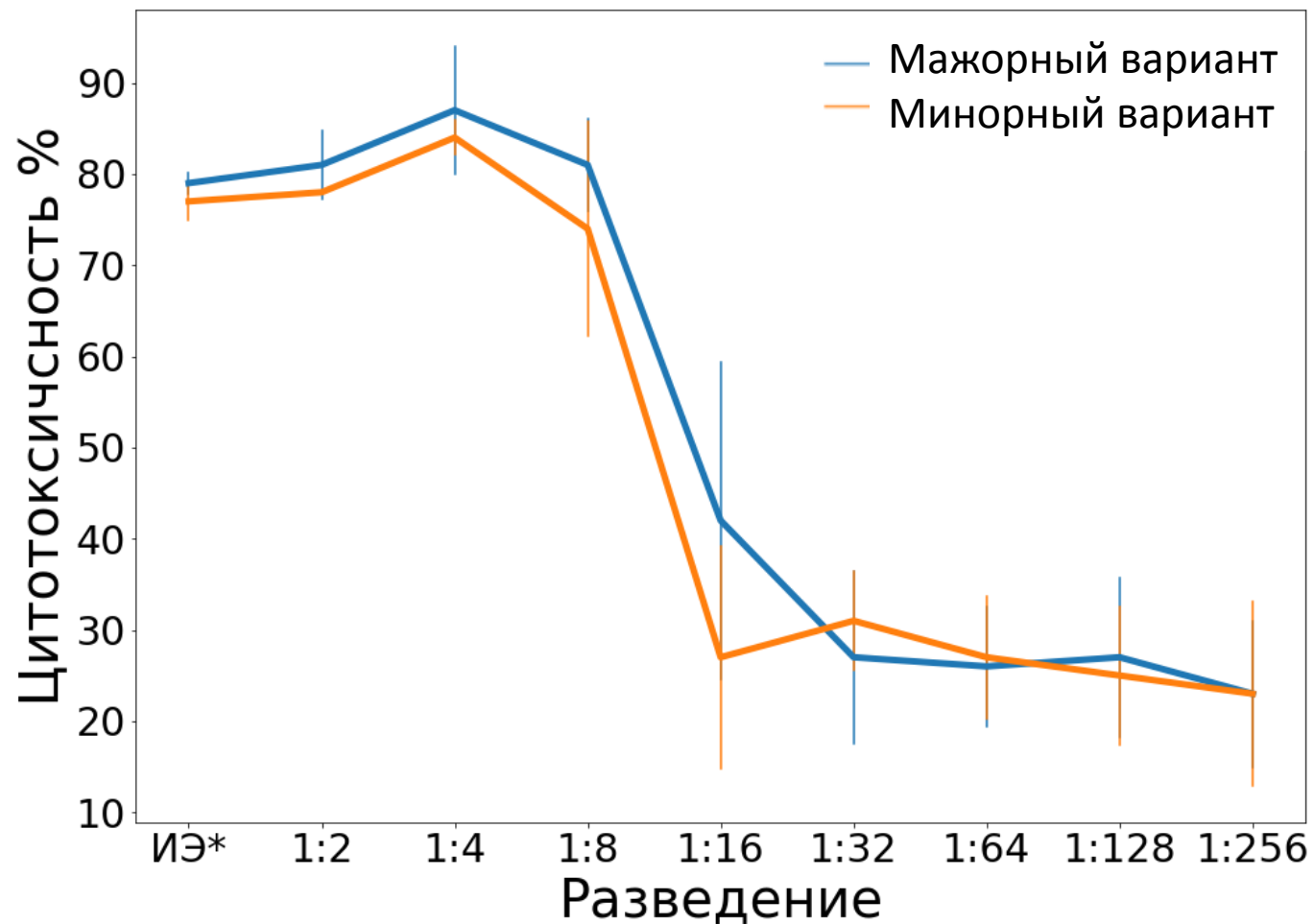


- - Мажорный вариант (9)
- - Минорный вариант



Валидация *in vitro*

Результаты МТТ-теста** по определению цитотоксического действия мажорного и минорного вариантов фармкомпозиции Фитоладаптоген на клетки рака мочевого пузыря линии RT112



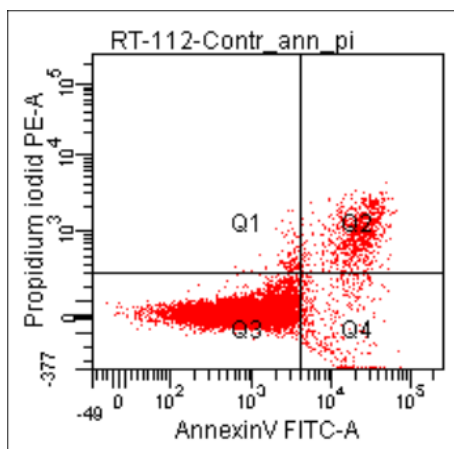
*исходный экстракт

**Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays //Journal of immunological methods. – 1983. – Т. 65. – №. 1-2. – С. 55-63.

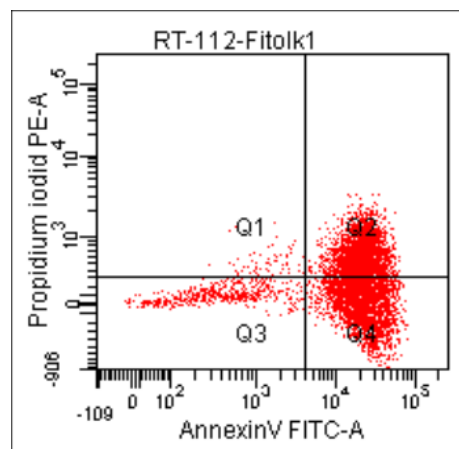
Оценка влияния мажорного и минорного варианта на гибель клеток рака мочевого пузыря RT-112

Вариант фармкомпозици	Живые клетки (AnV ⁻ /PI ⁻), %	Ранний апоптоз (AnV ⁺ /PI ⁻), %	Поздний апоптоз (AnV ⁺ /PI ⁺), %	Некроз (AnV ⁻ /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

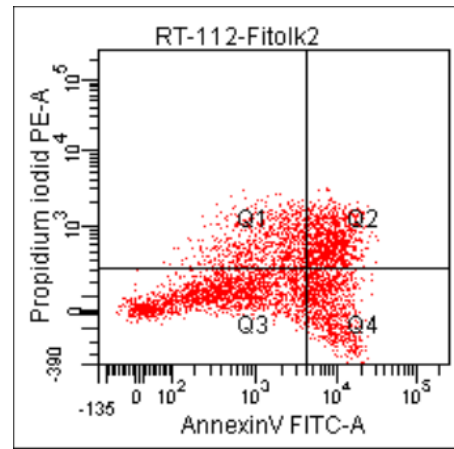
Контроль (интактные клетки)



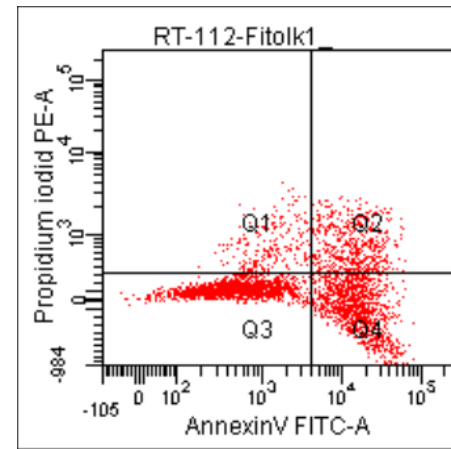
Мажорный вариант (1:8)



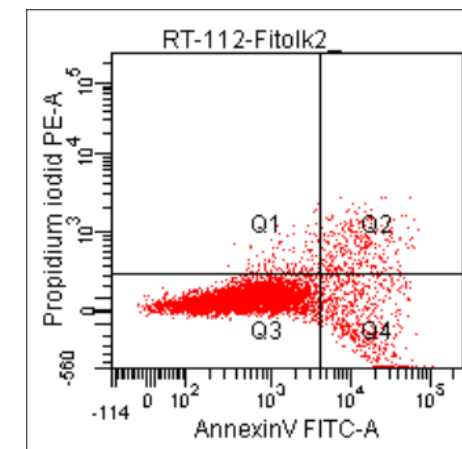
Минорный вариант (1:8)



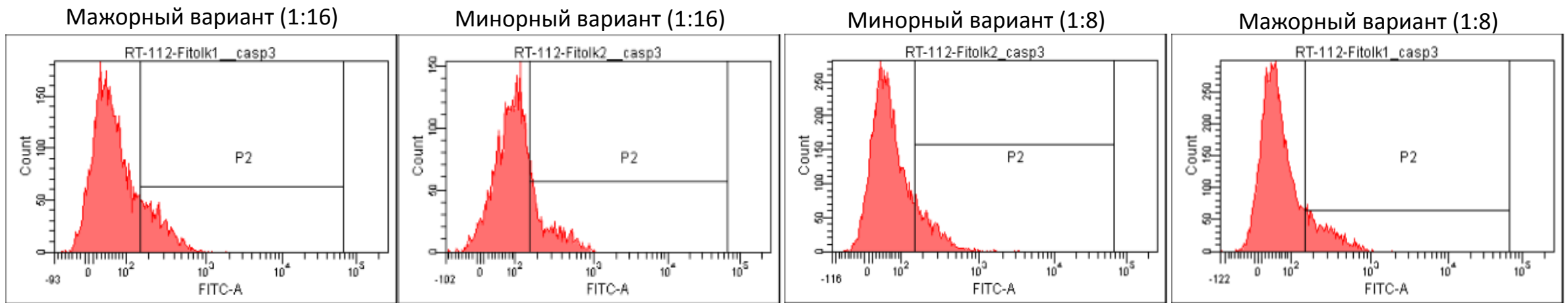
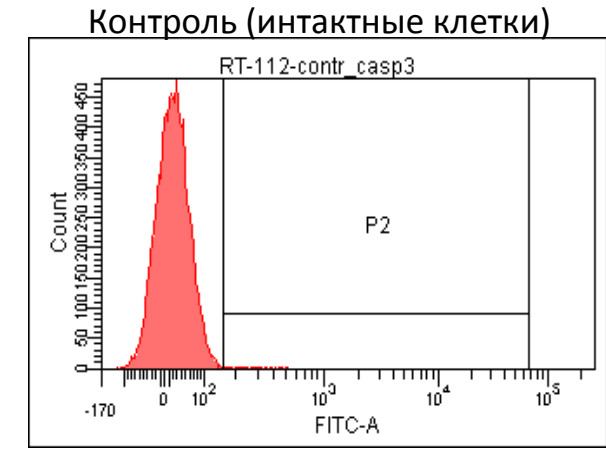
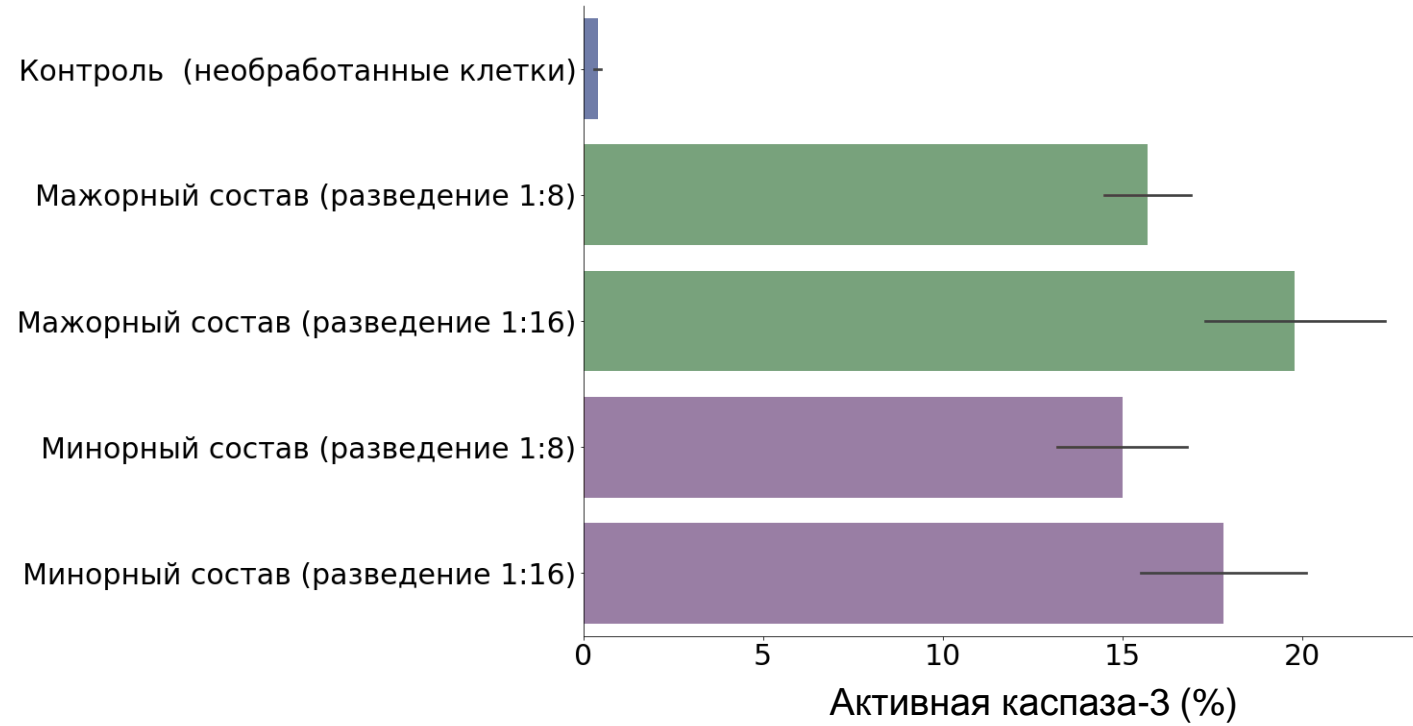
Мажорный вариант (1:16)



Минорный вариант (1:16)



Оценка влияния мажорного и минорного варианта на активацию каспазы-3





Выводы

1. Оценка сходства по MNA-дескрипторам показывает, что анализируемые соединения обладают высоким структурным разнообразием, следствием чего является широкий набор видов активности, прогнозируемых при пороге $P_a - P_i > 0$ для набора веществ, входящих в состав фармацевтических композиций «Фитоладаптоген».
2. Согласно прогнозу PASS, наиболее вероятными ($P_a - P_i > 0.5$) механизмами противоопухолевого действия анализируемых соединений являются Apoptosis agonist, Transcription factor NF kappa B inhibitor и Caspase 3 stimulant. При этом наиболее высокие оценки $P_a - P_i$ получены для соединений, преимущественно входящих в мажорный вариант фармкомпозиции. По данным PharmaExpert, эти механизмы действия связаны с противоопухолевым эффектом в отношении рака мочевого пузыря.
3. В результате валидации прогноза PASS in vitro продемонстрирована более высокая цитотоксичность мажорной фармкомпозиции «Фитоладаптоген» в отношении клеток рака мочевого пузыря человека линии RT-112. В экспериментах in vitro методом двойного окрашивания аннексином V и пропидием иодидом, а также детектированием в клетках активной каспазы 3 подтверждена гибель опухолевых клеток рака мочевого пузыря по механизму апоптоза.
4. Полученные экспериментальные данные подтверждают результаты прогноза и свидетельствуют о преимуществах мажорного состава ФЛА. Фитоладаптоген может служить основой для разработки препарата с противоопухолевой активностью в отношении рака мочевого пузыря человека.