

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 613.98:615.03

ИССЛЕДОВАНИЕ *IN SILICO* ЭНДО- И ЭКЗОТОКСИЧНОСТИ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ЭКСТРАКТА *MELISSA* *OFFICINALIS L.*

Бессарабов В.И., Пальчевская Т.А., Кузьмина Г.И., Строкань А.П.,
Ресницкий И.В.

Киевский национальный университет технологий и дизайна, кафедра промышленной
фармации, г. Киев, Украина, e-mail: e-mail: drvib500@gmail.com

В статье рассматриваются результаты изучения эндотоксичности и экзотоксичности некоторых биологически активных веществ из сухого экстракта *Melissa officinalis L.*, который потенциально может быть использован в качестве активного фармацевтического ингредиента (АФИ) модельного гериатрического препарата для подавления экспрессии провоспалительных цитокинов в организме человека. Исследование проводилось методом *in silico* с помощью виртуального скрининга в сервисе прогнозирования спектра активности веществ (Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS)). Показано, что гераниол, цитронеллол, линалоол и геранилацетат, являющиеся биологически активными веществами, входящими в состав сухого экстракта *Melissa officinalis L.*, характеризуются низкой эндотоксичностью по результатам QSAR анализа токсикологического воздействия химических веществ на модельные организмы (крысы) при четырёх типах введения (перорально, внутривенно, внутривнутрибрюшинно, подкожно) и низкой экологической токсичностью по результатам QSAR анализа токсикологического воздействия химических веществ на модельные водные организмы. Сделан вывод, что четыре биологически активные вещества из состава сухого экстракта *Melissa officinalis L.*, являющегося потенциальным АФИ проектируемого лекарственного препарата для снижения экспрессии провоспалительных цитокинов, отвечают специфическим требованиям к гериатрическим лекарственным средствам с позиции низкой эндо- и экзотоксичности.

Ключевые слова: *in silico*, виртуальный скрининг, люди пожилого возраста, активные фармацевтические ингредиенты, геронтология.

IN SILICO RESEARCH OF ENDO- AND EXOTOXICITY OF SOME BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM THE EXTRACT *MELISSA* *OFFICINALIS L.*

Bessarabov V.I., Palchevskaja T.A., Kuzmina G.I., Strokan A.P., Resnicki I.V.

Kyiv National University of Technologies and Design, Industrial Pharmacy Department,
Kyiv, Ukraine, e-mail: drvib500@gmail.com

The article discusses the results of the study endotoxicity and exotoxicity of some biologically active substances from the dried extract *Melissa officinalis L.*, which could potentially be used as an active pharmaceutical ingredient (API) of the model geriatric drug - suppressants by espresso proinflammatory cytokines in humans. The study was conducted by using *in silico* virtual screening when Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS). It is shown that geraniol, citronellol, linalool and geranilatsetat, are biologically active substances that are part of a dry extract of *Melissa officinalis L.*, characterized by low endotoxicity by QSAR analysis on the results of the toxicological effects of chemicals on model organisms (rat) for the four types of administration (oral, intravenous, intraperitoneal, subcutaneous) and low environmental toxicity by QSAR analysis results of the toxicological effects of chemicals on aquatic organisms model. It was concluded that the four biologically active substances from the dry extract of *Melissa officinalis L.*, is a potential APIs of drug for designed to reduce the expression of pro-inflammatory cytokines, to meet the specific requirements of the geriatric drugs from a position of low endo- and exotoxicity.

Key words: *in silico*, virtual screening, elderly people, active pharmaceutical ingredients, gerontology.

Иммунной системе принадлежит ведущая роль в обеспечении и поддержании гомеостаза организма, а также формировании согласованной реакции отдельных систем в ответ на внешние воздействия. Множество фактов, полученных при проведении исследований в области биogerонтологии, молекулярной биологии, иммунологии и физиологии, указывают на существование коммуникационной сети, обеспечивающей межклеточное взаимодействие на тканевом и системном уровнях в качестве основы для функционирования иммунной системы. Межклеточные связи реализуются с помощью медиаторов, секретируемых специализированными клетками лимфоидного и миелоидного ряда [1, 7, 8].

Установлено, что использование в лечении больных пожилого возраста терапевтического профиля, у которых этиологическим фактором является инфекционный возбудитель, только химиотерапевтических препаратов - ошибочно. Применение иммуно-корректирующих препаратов, стимулирующих репаративные процессы, позволяет ускорить процессы инволюции и сократить общую продолжительность лечения. Антибиотик подавляет размножение возбудителя заболевания, но конечная его элиминация из организма является результатом деятельности факторов иммунитета. У больных пожилого возраста с патологией внутренних органов при наличии хронической инфекции на фоне подавленной иммунореактивности, действие антибиотиков, а также применение противогрибковых, противовирусных и других химиотерапевтических средств малоэффективно. Очевидно, что оптимальный клинический эффект у больных пожилого возраста может быть достигнут только при наличии синергизма в действии защитных сил организма и антимикробных лекарственных средств [3, 6].

Поэтому одной из актуальных проблем современной биогеронтологии является создание эффективных лекарственных средств, которые обладают иммуномодулирующим и биорегулирующим эффектами, способствуют сохранению и восстановлению основных функций нейроиммуэндокринной системы [2, 3, 6]. Исследование плейотропных эффектов активных фармацевтических ингредиентов (АФИ), направленных на решение этой задачи, и создание на их основе моделей новых высокоэффективных гериатрических лекарственных препаратов непосредственно связано с проблемой снижения уровня побочных эффектов и токсичности конечной композиции [1, 2].

Целью нашего исследования является изучение эндо- и экзотоксичности некоторых биологически активных веществ из сухого экстракта *Melissa officinalis L.*, который потенциально может быть использован в качестве АФИ модельного гериатрического препарата для подавления экспрессии провоспалительных цитокинов в организме человека.

Материал и методы исследования.

В данном исследовании изучены токсикологические характеристики четырех биологически активных веществ, входящих в состав сухого экстракта *Melissa officinalis L.*: гераниола, цитронеллола, линалоола и геранилацетата.

Исследование проводилось методом *in silico* с помощью виртуального скрининга в сервисе прогнозирования спектра активности веществ (Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS)), который базируется на алгоритме общей неограниченной взаимосвязи между структурой и активностью (General Unrestricted Structure-Activity Relationships (GUSAR)) [4, 5, 10, 11].

Результаты исследования и их обсуждение.

Анализ экзотоксичности (экологической токсичности).

Количественный прогноз экзотоксичности для химических соединений проведен с помощью программного обеспечения GUSAR [10, 11]. Модели QSAR были разработаны для следующих показателей:

- 96-часовой гольян (лат. *Phoxinus*) в 50% летальной концентрации,
- 48-часовая дафния magna (лат. *Daphnia magna*) в 50% летальной концентрации,
- *Tetrahymena pyriformis* в 50% концентрации ингибирования роста и фактора биоаккумуляции.

Рассчитанные показатели экологической токсичности гераниола, цитронеллола, линалоола и геранилацетата, которые входят в состав сухого экстракта Melissa, представлены в таблицах 1-4.

Таблица 1

Экологическая токсичность гераниола

Активность	Прогноз значения	Применение доменов
<i>Bioaccumulation factor Log10(BCF)</i>	2,047	<i>In AD</i>
<i>Daphnia magna LC50 -Log10(mol/L)</i>	4,034	<i>In AD</i>
<i>Fathead Minnow LC50 Log10(mmol/L)</i>	-1,488	<i>In AD</i>
<i>Tetrahymena pyriformis IGC50 -Log10(mol/L)</i>	0,237	<i>In AD</i>

где in AD - соединение попадает в область применения моделей.

Таблица 2

Экологическая токсичность цитронеллола

Активность	Прогноз значения	Применение доменов
<i>Bioaccumulation factor Log10(BCF)</i>	2,047	<i>In AD</i>
<i>Daphnia magna LC50 -Log10(mol/L)</i>	4,130	<i>In AD</i>
<i>Fathead Minnow LC50 Log10(mmol/L)</i>	-1,451	<i>In AD</i>
<i>Tetrahymena pyriformis IGC50 -Log10(mol/L)</i>	0,207	<i>In AD</i>

где in AD - соединение попадает в область применения моделей.

Таблица 3

Экологическая токсичность линалоола

Активность	Прогноз значения	Применение доменов
<i>Bioaccumulation factor Log10(BCF)</i>	1,591	<i>In AD</i>
<i>Daphnia magna LC50 -Log10(mol/L)</i>	4,453	<i>In AD</i>
<i>Fathead Minnow LC50 Log10(mmol/L)</i>	-1,423	<i>In AD</i>
<i>Tetrahymena pyriformis IGC50 -Log10(mol/L)</i>	-0,087	<i>In AD</i>

где in AD - соединение попадает в область применения моделей.

Таблица 4

Экологическая токсичность геранилацетата

Активность	Прогноз значения	Применение доменов
<i>Bioaccumulation factor Log10(BCF)</i>	1,947	<i>In AD</i>
<i>Daphnia magna LC50 -Log10(mol/L)</i>	4,898	<i>In AD</i>
<i>Fathead Minnow LC50 Log10(mmol/L)</i>	-2,130	<i>In AD</i>
<i>Tetrahymena pyriformis IGC50 -Log10(mol/L)</i>	0,600	<i>In AD</i>

где in AD - соединение попадает в область применения моделей.

Рассчитанные *in silico* значения фактора биоаккумуляции для всех изученных соединений (*Bioaccumulation factor Log10 (BCF)*) не превышают 5 и лежат в диапазоне от 1,591 до 2,047. В соответствии с рекомендациями приложения D к Стокгольмской

конвенции, в котором определяются критерии оценки биоаккумуляции экотоксикантов, такие значения этого показателя, а также результаты их сопоставление с данными об острой токсичности для водных видов организмов свидетельствуют о низкой экологической токсичности гераниола, цитронеллола, линалоола и геранилацетата.

Анализ эндотоксичности.

Прогнозирование острой эндотоксичности LD₅₀ выбранных биологически активных веществ, входящих в состав сухого экстракта *Melissa officinalis* L., методом *in silico* проводилось по результатам QSAR анализа токсикологического воздействия химических веществ на модельные организмы (крысы) при четырёх типах введения (перорально, внутривенно, внутрибрюшинно, подкожно). Обучающие комплекты созданы на основе данных из SYMYX MDL базы данных токсичности. Они включают в себя информацию о более чем 10000 химических структур с данными об их острой токсичности для крыс, представленных в виде LD₅₀ (log 10 (ммоль/кг)) [9].

Результаты исследования показателей эндотоксичности гераниола, цитронеллола, линалоола и геранилацетата, которые входят в состав сухого экстракта мелиссы, представлены в таблицах 5-12.

Таблица 5

Острая эндотоксичность гераниола для крыс при четырёх типах введения

Rat IP LD₅₀	Rat IV LD₅₀	Rat Oral LD₅₀	Rat SC LD₅₀
log10 (mmol/kg)	log10 (mmol/kg)	log10 (mmol/kg)	log10 (mmol/kg)
0,634 in AD	-0,451 in AD	1,431 in AD	1,080 in AD
Rat IP LD₅₀ (mg/kg)	Rat IV LD₅₀ (mg/kg)	Rat Oral LD₅₀ (mg/kg)	Rat SC LD₅₀ (mg/kg)
664,200 in AD	436,200 in AD	4158,000 in AD	1855,000 in AD

Таблица 6

Класс токсичности, классификация гераниола в соответствии с требованиями
 Организации Экономического Сотрудничества и Развития (ОЭСР/OECD).

Rat IP LD₅₀ Classification	Rat IV LD₅₀ Classification	Rat Oral LD₅₀ Classification	Rat SC LD₅₀ Classification
Class 5 in AD	Class 5 in AD	Class 5 in AD	Class 5 in AD

Где,

IP-- внутрибрюшинный путь введения;

IV - внутривенный путь введения;

Oral - оральный путь введения;

SC - подкожный путь введения;

in AD - соединение попадает в область применения моделей.

Таблица 7

Острая эндотоксичность цитронеллола для крыс при четырёх типах введения

Rat IP LD₅₀ log₁₀ (mmol/kg)	Rat IV LD₅₀ log₁₀ (mmol/kg)	Rat Oral LD₅₀ log₁₀ (mmol/kg)	Rat SC LD₅₀ log₁₀ (mmol/kg)
0,915 in AD	0,133 in AD	1,563 in AD	0,870 in AD
Rat IP LD₅₀ (mg/kg)	Rat IV LD₅₀ (mg/kg)	Rat Oral LD₅₀ (mg/kg)	Rat SC LD₅₀ (mg/kg)
1284,000 in AD	212,100 in AD	5709,000 in AD	1157,000 in AD

Таблица 8

Класс токсичности, классификация цитронеллола в соответствии
 с требованиями ОЭСР/OECD.

Rat IP LD₅₀ Classification	Rat IV LD₅₀ Classification	Rat Oral LD₅₀ Classification	Rat SC LD₅₀ Classification
Non Toxic in AD	Class 4 in AD	Non Toxic in AD	Class 5 in AD

Таблица 9

Острая эндотоксичность линалоола для крыс при четырёх типах введения

Rat IP LD₅₀ log₁₀ (mmol/kg)	Rat IV LD₅₀ log₁₀ (mmol/kg)	Rat Oral LD₅₀ log₁₀ (mmol/kg)	Rat SC LD₅₀ log₁₀ (mmol/kg)
-0,148 in AD	-0,280 in AD	1,326 in AD	0,641 in AD
Rat IP LD₅₀ (mg/kg)	Rat IV LD₅₀ (mg/kg)	Rat Oral LD₅₀ (mg/kg)	Rat SC LD₅₀ (mg/kg)
109,600 in AD	81,030 in AD	3271,000 in AD	674,500 in AD

Таблица 10

Класс токсичности, классификация линалоола в соответствии
 с требованиями ОЭСР/OECD.

Rat IP LD₅₀ Classification	Rat IV LD₅₀ Classification	Rat Oral LD₅₀ Classification	Rat SC LD₅₀ Classification
Class 4 in AD	Class 4 in AD	Class 5 in AD	Class 4 in AD

Таблица 11

Острая эндотоксичность геранилацетата для крыс при четырёх типах введения

Rat IP LD₅₀ log₁₀ (mmol/kg)	Rat IV LD₅₀ log₁₀ (mmol/kg)	Rat Oral LD₅₀ log₁₀ (mmol/kg)	Rat SC LD₅₀ log₁₀ (mmol/kg)
0,178 in AD	0,265 in AD	1,323 in AD	1,098 in AD
Rat IP LD₅₀ (mg/kg)	Rat IV LD₅₀ (mg/kg)	Rat Oral LD₅₀ (mg/kg)	Rat SC LD₅₀ (mg/kg)
295,700 in AD	361,100 in AD	4125,000 in AD	2459,000 in AD

Таблица 12

Класс токсичности, классификация геранилацетата в соответствии
 с требованиями ОЭСР/OECD.

Rat IP LD₅₀ Classification	Rat IV LD₅₀ Classification	Rat Oral LD₅₀ Classification	Rat SC LD₅₀ Classification
Class 4 in AD	Class 5 in AD	Class 5 in AD	Class 5 in AD

Таким образом, полученные результаты расчета эндотоксичности позволяют полагать, что гераниол, цитронеллол, линалоол и геранилацетат, которые входят в состав сухого экстракта Melissa, являются низкотоксичными.

Вывод.

Гераниол, цитронеллол, линалоол и геранилацетат, являющиеся биологически активными веществами, входящими в состав сухого экстракта *Melissa officinalis L.*, характеризуются низкой эндотоксичностью по результатам QSAR анализа токсикологического воздействия химических веществ на модельные организмы (крысы) при четырёх типах введения (перорально, внутривенно, внутривентально, подкожно) и низкой экологической токсичностью по результатам QSAR анализа

токсикологического воздействия химических веществ на модельные водные организмы. Следовательно, четыре биологически активные вещества из состава сухого экстракта *Melissa officinalis* L., являющегося потенциальным АФИ проектируемого лекарственного препарата для снижения экспрессии провоспалительных цитокинов, отвечают специфическим требованиям к гериатрическим лекарственным средствам с позиции низкой эндо- и экзотоксичности. Предметом дальнейших токсикологических исследований должно стать изучение иных биологически активных веществ, входящих в состав сухого экстракта *Melissa officinalis* L.

Список литературы.

1. Бессарабов В.И. Возможная противогриппозная эффективность некоторых активных фармацевтических ингредиентов / В.И. Бессарабов, Н.П. Здерко // Геронтология. – 2013. – № 1. – С.51-59.
2. Бессарабов В.И. Фармацевтический анализ комплексных гериатрических лекарственных средств / В.И. Бессарабов, Т.А. Пальчевская, Г.Г. Курышко, Г.И. Кузьмина, А.В. Тарасенко // Геронтология. – 2014. – Т. 2, № 3. – С. 338-344.
3. Прощаев К.И. Основные гериатрические синдромы: (учебное пособие) / К. И. Прощаев, А.Н. Ильницкий, Н. И. Жернакова. - Белгород: Белгор. обл. тип., 2012. - 228 с. - ISBN 975-5-86295-257-5.
4. Поройков В. В. Компьютерное предсказание биологической активности химических веществ: виртуальная хемогеномика / В.В. Поройков, Д.А. Филимонов, Т.А. Глориозова, А.А. Лагунин, Д.С. Дружиловский, А.В. Степанчикова // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2009. - Т. 13, № 1. - С. 137-143.
5. Филимонов Д.А. Прогноз спектра биологической активности органических соединений / Д.А. Филимонов, В.В. Поройков // Рос. хим. журн. – 2006. – Т. 50, № 2. – С. 66-75.
6. Ярилин А.А. Основы иммунологии. — М.: Медицина, 2002. — 257 с.
7. Abdullah A.K., Khan S. Evidence-based selection of inhaled corticosteroid for treatment of chronic asthma // J. Asthma. 2007. V. 44. P. 1–12.
8. Adcock I.M., Caramori G. Cross-talk between proinflammatory transcription factors and glucocorticoids // Immunol. Cell. Biol. 2001. V. 79. P. 376–384.

9. Lagunin A., Zakharov A., Filimonov D., Poroikov V. QSAR Modelling of Rat Acute Toxicity on the Basis of PASS Prediction // *Mol. Informatics*. - 2011. – Vol. 30, №2-3, P. 241–250.
10. Poroikov V.V. Robustness of biological activity spectra predicting by computer program pass for noncongeneric sets of chemical compounds / V.V. Poroikov, D.A. Filimonov, Y.V. Borodina, A.A. Lagunin, A. Kos // *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. - 2000. - Vol. 40. № 6. - P. 1349-1355.
11. Poroikov V.V. Pass biological activity spectrum predictions in the enhanced open nci database browser / V.V. Poroikov, D.A. Filimonov, T.A. Glorizova, A.A. Lagunin, Y.V. Borodina, A.V. Stepanchikova, W.D. Ihlenfeldt, M.C. Nicklaus// *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. - 2003. - Vol. 43. № 1. - P. 228-236.

References.

1. Bessarabov V.I., Zderko N.P. *Gerontologija*, 2013, Vol. 1, no. 1, P. 51-59.
2. Bessarabov V.I., Palchevskaja T.A., Kuryshko G.G., Kuzmina G.I., Tarasenko A.V. *Gerontologija*, 2014, Vol. 2, no. 3, P. 338-344.
3. Prashchayeu K.I., Ilnitski A.N., Zernakova N.I. *Osnovnye geriatricheskie sindromy: (uchebnoe posobie) [The main geriatric syndromes (Tutorial)]*. Belgorod, 2012, 228 p. ISBN 975-5-86295-257-5.
4. Poroikov V.V., Filimonov D.A., Glorizova T.A., Lagunin A.A., Druzhilovskij D.S., *Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii*. 2009, Vol. 13, no. 1, pp. 137-143.
5. Filimonov D.A., Poroikov V.V. *Ros. xim. zhurn.* 2006, Vol.50, no. 2, pp. 66-75.
6. Jarilin A.A. *Osnovy immunologii [Fundamentals of Immunology]*. M., Medicina, 2002, 257 p.
7. Abdullah A.K., Khan S., *J. Asthma*, 2007, Vol. 44, P. 1–12.
8. Adcock I.M., Caramori G. *Immunol. Cell. Biol.*, 2001, Vol. 79, P. 376–384.
9. Lagunin A., Zakharov A., Filimonov D., Poroikov V. *Mol. Informatics*, 2011, 30(2-3), P. 241–250.
10. Poroikov V.V., Filimonov D.A., Borodina Y.V., Lagunin A.A., Kos A. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 2000, Vol. 40, no. 6, pp. 1349-1355.

11. Poroikov V.V., Filimonov D.A., Glorizova T.A., Lagunin A.A., Borodina Y.V., Stepanchikova A.V., Ihlenfeldt W.D., Nicklaus M.S. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 2003, Vol. 43, no. 1, pp. 228-236.