

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-112-121>

Потенциальная противоопухолевая активность нового алкалоида растительного происхождения, выделенного из *Petasites hybridus* (L.), *in silico* и *in vitro*

Е.Ю. Златник¹, С.Ю. Филиппова¹, Я.С. Енин¹, Т.В. Чембарова¹, Ф.Ф. Амирджанов², О.Н. Буров², А.Д. Загребаев², К.А. Онасенко², Ю.В. Дзигунова²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037 Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63;

²ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет»; Россия, 344006 Ростов-на-Дону, ул. Большая Садовая, 105/42

Контакты: Елена Юрьевна Златник elena-zlatnik@mail.ru

Введение. В основе некоторых цитостатиков лежат продукты растительного происхождения. Разработка новых противоопухолевых средств на основе метаболитов растений является перспективным и актуальным направлением в онкологии. Ранее путем экстракции из корневищ белокопытника гибридного (*Petasites hybridus* (L.)) мы получили соединение, которое расшифровано и идентифицировано как индольный алкалоид P1, близкий по строению к коринану.

Цель исследования – определение возможности связывания алкалоида, выделенного из *Petasites hybridus* (L.), с молекулярными мишенями, обуславливающими канцерогенез и опухолевый рост, оценка его действия на составе культуры опухолевых и нормальных клеток.

Материалы и методы. Исследование проведено *in silico* методом молекулярного докинга и *in vitro* культуральными методами. Молекулярный докинг алкалоида P1 с рецепторами эпидермального фактора роста (EGFR), тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), MET, MRP2 и NOX4 выполнен с использованием программного обеспечения AutoDock Vina 4.0. Сетка области докинга построена в программе AutoDockTools 1.5.7. Культуральные исследования проводили на культуре опухолевых высокоэкспрессирующих EGFR (H1299) и неопухолевых (нормальные фибробласты легкого) клеток человека. Клетки культивировали с различными концентрациями алкалоида, их жизнеспособность оценивали с помощью ХТТ-теста и метода прямого подсчета живых и погибших клеток.

Результаты. Максимальный показатель энергии связывания P1 с молекулярными мишенями получен для MET (–8,6 ккал/моль), минимальный – для NOX4 (–5,9 ккал/моль). Энергия связывания P1 с EGFR составила –6,4; с PDGFR –7,2; с MRP2 –6,3 ккал/моль. Связывание P1 происходило с аминокислотными остатками активных центров большинства исследованных рецепторов.

Алкалоид P1 способен подавлять рост культуры аденокарциномы легкого H1299 в широком диапазоне концентраций более активно, чем в культуре нормальных фибробластов легкого: концентрация полумаксимального ингибирования P1 составила 127,24 и 256,29 мкмоль/л соответственно. Максимальные различия количества погибших клеток линии H1299 по сравнению с фибробластами наблюдались при концентрациях алкалоида 21,7–87 мкмоль/л, однако, несмотря на признаки нарушения митоза в виде наличия крупноядерных и многоядерных клеток культуры H1299 при действии алкалоида, митотический индекс не менялся.

Заключение. Алкалоид, выделенный из белокопытника гибридного, способен связываться с мишенями, опосредующими опухолевый рост, повреждает клетки культуры аденокарциномы легкого H1299. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования его возможного противоопухолевого действия на моделях *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: алкалоид растительного происхождения, *Petasites hybridus* (L.), молекулярный докинг, рецептор, культура опухолевых клеток, опухолевый рост

Для цитирования: Златник Е.Ю., Филиппова С.Ю., Енин Я.С. и др. Потенциальная противоопухолевая активность нового алкалоида растительного происхождения, выделенного из *Petasites hybridus* (L.), *in silico* и *in vitro*. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(2):112–21.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-112-121>

Potential antitumor activity of a new plant-derived alkaloid isolated from *Petasites hybridus* (L.), *in silico* and *in vitro*

E. Yu. Zlatnik¹, S. Yu. Filippova¹, Ya. S. Enin¹, T. V. Chembarova¹, F. F. Amirdzhanov², O. N. Burov², A. D. Zagrebaev², K. A. Onasenko², Yu. V. Dzigunova²

¹National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14th Line St., Rostov-on-Don 344037, Russia;

²Southern Federal University; 105/42 Bolshaya Sadovaya St., Rostov-on-Don 344006, Russia

Contacts: Elena Yurievna Zlatnik elena-zlatnik@mail.ru

Introduction. Some cytostatic drugs are based on the compounds of plant origin. Development of the new plant metabolites-derived antitumor drugs is an actual and perspective trend in oncology. Recently we isolated a compound from the rhizome of *Petasites hybridus* (L.) and identified it as a corynan-like indole alkaloid P1.

Aim. To identify of the possibility of the *Petasites hybridus* (L.)-derived alkaloid to bind with molecular targets mediating carcinogenesis and tumor growth and the assessment of its effect on tumor and normal cell cultures.

Materials and methods. The research was performed *in silico* by molecular docking and *in vitro* by cultural methods. Molecular docking of alkaloid P1 with receptors of epidermal growth factor (EGFR), platelet growth factor (PDGFR), MET, MRP2 and NOX4 was carried out using software AutoDock Vina 4.0. The docking area grid was built in AutoDockTools 1.5.7. Cultural experiments were performed on tumor cell line highly expressing EGFR (H1299) and normal lung fibroblasts. Cells were cultured with various concentrations of the alkaloid, their viability was assessed in XTT-test and by direct count of alive and dead cells.

Results. Maximal binding energy of alkaloid P1 with molecular targets was noted for MET (–8,6 kcal/M), minimal – for NOX4 (–5,9 kcal/M). Binding energy of alkaloid P1 with EGFR was –6,4; with PDGFR –7,2; with MRP2 –6,3 kcal/M. Binding of alkaloid P1 occurred with the amino acid residues of the active centers of the majority of the studied receptors. Alkaloid showed the ability to inhibit the growth of H1299 cell line (lung adenocarcinoma) in the wide range of concentrations more actively than of normal fibroblasts: half-maximal inhibitory concentration for P1 was 127,24 and 256,29 μM/l respectively. Maximal difference of the dead cells amount between H1299 line and fibroblasts was observed in alkaloid concentrations 21,7–87 μM/l, but, in spite of some signs of mitotic failure (multinucleate and giantnucleate H1299 cells) mitotic index did not change.

Conclusion. Alkaloid isolated from the rhizome of *Petasites hybridus* (L.) is able to bind with the targets mediating tumor growth and impairs lung adenocarcinoma H1299 cells. Further research is necessary for detailed study of its` antitumor effect in *in vitro* and *in vivo* models.

Keywords: plant-derived alkaloid, *Petasites hybridus* (L.), molecular docking, receptors, tumor cell line, tumor growth

For citation: Zlatnik E. Yu., Filippova S. Yu., Enin Ya. S. et al. Potential antitumor activity of a new plant-derived alkaloid isolated from *Petasites hybridus* (L.), *in silico* and *in vitro*. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2025;12(2):112–21. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-112-121>

ВВЕДЕНИЕ

Растения являются источником различных биологически и фармакологически активных соединений, на основе которых уже созданы многочисленные лекарственные средства и продолжают разрабатываться новые, включая перспективные для лечения злокачественных опухолей. В онкологии применяется ряд химиопрепаратов, полученных из растений: актиномицин D, антрациклины (доксорубин, эпирубин, даунорубин), ингибиторы митоза (митомин С, блеомицин, колхицин, колхамин, винкристин, винбластин, таксол), ингибиторы топоизомеразы (камптотecin) [1, 2]. Показано, что противоопухолевая активность метаболитов растений (алкалоидов, полифенольных соединений) реализуется через взаимодействие с молекулярными мишенями, включая рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и его сигнальные пути, считающиеся ключевыми в регуляции роста клеток, канцерогенеза и опухолевой прогрессии.

Нередко развитие резистентности опухолей к ингибиторам EGFR [3] побуждает к поиску новых соединений, способных воздействовать на этот рецептор. Такая активность предсказана *in silico* и выявлена *in vitro* у некоторых компонентов растений, например у берберина и производных куркумы [4], хотя их широкое применение ограничено низкой биодоступностью [5].

Ранее путем экстракции из корневищ белокопытника гибридного (*Petasites hybridus* (L.)) мы получили соединение, которое расшифровано и идентифицировано с помощью библиотек NIST 2011, содержащих данные по алкалоидам и биологически активным соединениям. Его структурная формула, представленная на рис. 1, а, подтверждена методом ядерного магнитного резонанса на атомах водорода [6]. Полученное соединение оказалось индольным алкалоидом, близким (но не тождественным по строению) к коринану (PubChem CID 6857493), и получило рабочее название P1.

Поскольку для растительных алкалоидов описана способность модулировать активность рецепторов и кодирующих их генов, обеспечивающих пролиферацию, инвазию и химиорезистентность опухолевых клеток [7], и указывается на множественность таких мишеней [8], представляется важным изучить связывание выделенного соединения с соответствующими рецепторами, тем более что оно относится к индольным алкалоидам, некоторые из которых обладают противоопухолевой активностью [9].

Цель исследования – определение возможности связывания алкалоида, выделенного из *Petasites hybridus* (L.), с молекулярными мишенями, обуславливающими канцерогенез и опухолевый рост, оценка его действия на состояние культур опухолевых и нормальных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярные методы

Исследование проведено *in silico* методом молекулярного докинга исследуемого алкалоида с 5 рецепторами – EGFR (AlphaFoldDB), рецептором тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) (AlphaFoldDB P00533), MET (AlphaFoldDB P08581), MRP2 (PDB ID 8IZR) и NOX4 (AlphaFoldDB Q9NPH5), который выполнен с использованием программного обеспечения AutoDock Vina 4.0. Структуры PDB импортированы в Discovery Studio Visualizer 4.0, после чего из них были удалены молекулы воды, посторонние лиганды и гетероатомы. Структуры AlphaFoldDB уже были очищены. Они оптимизированы перед докингом с использованием Chimera 1.6.2. Полученные файлы формата .pdb проверены с помощью сервера PROCHECK (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>) и выровнены с исходной структурой, чтобы исключить визуальные аномалии в структуре. Эти оптимизированные файлы использованы для подготовки сетки в AutoDockTools 1.5.7. Связывающий сайт каждого рецептора был определен по данным литературы, сетки подготовлены соответствующим образом, в результате чего файлы сохранены в формате .pdbqt.

В качестве лиганда использован алкалоид P1, формула которого представлена на рис. 1, а. Файл с его структурой конвертирован в формат .pdb с использованием молекулярного редактора Chem3D 16.0. Лиганд дополнительно импортирован в AutoDockTools 1.5.7, и к нему добавлены атомы водорода. Затем лиганд сохранен в формате .pdbqt. Докинг выполнен через командную строку Linux Ubuntu с расстоянием между точками сетки 0.375 Å и значением экзастивности 8. Выходные данные проанализированы с помощью визуализатора Discovery Studio Visualizer 4.0.

Культуральные методы

В работе использовали постоянную культуру клеток аденокарциномы легкого человека H1299 и первичную культуру нормальных фибробластов легкого

человека (НФЛЧ). Культуру H1299 выращивали при 37 °C и 5 % CO₂ в полной питательной среде (ППС) RPMI1640 (Gibco, США) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), 1 % глутамина (Gibco, США), 1 % NEAA (Gibco, США) и 1 % гентамицина.

Нормальные фибробласты, взятые в качестве непухоловой (контрольной) культуры, получены из неизмененной ткани легкого, удаленной при лобэктомии, проведенной по поводу лечения рака легкого в отделении торакальной хирургии Национального медицинского исследовательского центра онкологии (г. Ростов-на-Дону). После получения операционного образца его подвергали ферментации в растворе коллагеназы 1-го типа (300 ед/мл) («ПанЭко», Россия) в среде DMEM (глюкоза 25 ммоль/л) (Servicebio, Китай) в течение 1 ч при 37 °C. Полученную клеточную суспензию дважды отмывали в среде DMEM (глюкоза 25 ммоль/л) (Servicebio, Китай) и высаживали на культуральный флакон в полной питательной среде DMEM (глюкоза 25 ммоль/л) (Servicebio, Китай) с добавлением 20 % FBS (Hyclone, США), 1 % гентамицина («Биолот», Россия), 1 % глутамина («Биолот», Россия) и инкубировали при 37 °C и 5 % CO₂. На момент исследования клетки находились на 5-м пассаже.

Определение жизнеспособности. Клетки культур аденокарциномы легкого H1299 и НФЛЧ высаживали на 96-луночный планшет в количестве 5×10^3 клеток на лунку в 100 мкл в соответствующую культуру ППС. После адгезии клеток ко дну планшета среду культивирования заменяли на ППС без содержания фенолового красного с добавлением исследуемого алкалоида в серии двукратных разведений в диапазоне концентраций от 2,72 до 348 мкмоль/л. В контрольные лунки вносили ППС без содержания тестируемого соединения. Планшеты культивировали при 37 °C и 5 % CO₂ в течение 72 ч. По окончании культивирования проводили ХТТ-тест по общепринятой методике [10]. Для учета показаний оптической плотности при 450 нм использовали планшетный ридер Infinite® M Nano Plus (Tecan, Швейцария). Жизнеспособность клеток определяли как отношение оптической плотности в опытных лунках к оптической плотности в контрольных лунках, выраженное в процентах. Опыт повторяли 3 раза. Построение кривых доза – ответ и определение показателя концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) проводили с помощью онлайн-инструмента IC₅₀ Calculator (Quest Graph™ IC50 Calculator, AAT Bioquest, Inc., 13 Feb. 2025, <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>).

Прямое определение содержания мертвых клеток в культуре. Культуры H1299 и НФЛЧ высаживали по 5×10^5 клеток на флаконы T25 (Nest, КНР) в соответствующей ППС. Далее в среду вносили тестируемое соединение в серии двукратных разведений (от 10,88 до 174 мкмоль/л). В контрольных пробах оставляли ППС без добавления исследуемого алкалоида. Клетки

культивировали при 37 °С и 5 % CO₂ в течение 72 ч, затем снимали со дна флакона по стандартной методике с использованием 0,25 % раствора трипсина-версена 1:1 («БиолоТ», Россия) и определяли количество живых и мертвых клеток на счетчике EVE (NanoEntek, Южная Корея) с окрашиванием клеток 0,4 % раствором трипанового синего («БиолоТ», Россия). Всего выполнено 5 повторов для каждого варианта опыта.

Определение митотического индекса. Клетки исследуемых культур высаживали по 50 тыс. клеток на лунку 24-луночного планшета в соответствующей культуре ППС. После адгезии клеток ко дну планшета среду культивирования заменяли на ППС с добавлением 348 и 21,7 мкмоль/л тестируемого алкалоида, после чего культивировали в течение 72 ч. По окончании эксперимента клетки фиксировали в 4 % растворе параформа и окрашивали Hoechst 33342 (Life Technologies, США). Визуализацию клеток осуществляли на имиджере Lionheart FX (BioTek, США) и определяли количество клеток на разных стадиях клеточного цикла с использованием встроенного программного обеспечения. Всего рассмотрено 30 полей зрения для каждого варианта опыта. Митотический индекс подсчитывали как долю делющихся клеток от общего числа клеток.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных и построение графиков проводили с помощью программного обеспечения MS Excel. Результаты

оценки жизнеспособности клеток представлены в виде процентов от показателей контрольных проб. Поскольку по критерию Шапиро–Уилка распределение показателей было нормальным, их выражали в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Достоверность разницы между средними значениями оценивали с применением *t*-критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при *p* < 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При изучении энергии связывания алкалоида P1 с молекулярными мишенями максимальный показатель получен для связывания с MET (–8,6 ккал/моль), минимальный – с NOX4 (–5,9 ккал/моль). Энергия связывания коринана с EGFR составила –6,4; с PDGFR –7,2; с MRP2 –6,3 ккал/моль.

В табл. 1 и на рис. 1, 2 представлены количество и характеристика связей лиганда (исследованного алкалоида) с рецепторами, вовлеченными в канцерогенез и опухолевый рост, а также остатков аминокислот, участвующих в формировании этих связей.

Согласно полученным данным исследуемый алкалоид P1 образует комплекс с EGFR, связываясь с аминокислотным остатком активного центра Фен723 (см. рис. 1, б). В образовании комплекса 1 обычная водородная связь обеспечивалась Глу762, 3 π-алкильных связи – Фен723, Лей747 и Ала755; силами Ван-дер-Ваальса связывались

Таблица 1. Типы связей исследованного алкалоида с рецепторами, вовлеченными в канцерогенез и опухолевый рост, и аминокислотные остатки, участвующие в его связывании с рецепторами

Table 1. Types of bonds between the studied alkaloid and receptors mediating carcinogenesis and tumor growth, and amino acid residues participating in its binding with the receptors

Мишень (рецептор) Target (receptor)	Аминокислотные остатки Amino acid residues	Взаимодействия Interactions
EGFR	Глу762 Glu762	Обычная водородная связь Normal hydrogen bond
	Фен723, Лей747, Ала755 Phe723, Leu747, Ala755	π-алкильные связи π-alkyl bonds
	Глу749, Глу758, Иле759, Гли857, Тир869 Glu749, Glu758, Ile759, Gly857, Tyr869	Силы Ван-дер-Ваальса Van der Waals forces
PDGFR	Фен845 Phe845	π-π-стэкинг π-π-stacking
	Лей606, Вал614, Ала848 Leu606, Val614, Ala848	π-алкильные связи π-alkyl bonds
	Асп850, Арг849, Гли607, Сер608, Тир771, Асп688, Гли687, Лей833 Asp850, Arg849, Gly607, Ser608, Tyr771, Asp688, Gly687, Leu833	Силы Ван-дер-Ваальса Van der Waals forces
MET	Мет1211, Иле1084, Вал1092, Лиз1110, Ала1108, Лей1157 Met1211, Ile1084, Val1092, Lys1110, Ala1108, Leu1157	Алкильные связи Alkyl bonds
	Арг1208 Arg1208	π-алкильная связь π-alkyl bond
	Мет1160, Арг1004, Гли1085, Тир1003, Асп1002, Асп1164, Асп1222 Met1160, Arg1004, Gly1085, Tyr1003, Asp1002, Asp1164, Asp1222	Силы Ван-дер-Ваальса Van der Waals forces

Окончание табл. 1

End of table 1

Мишень (рецептор) Target (receptor)	Аминокислотные остатки Amino acid residues	Взаимодействия Interactions
MRP2	Тир703, Три646 Tyr703, Trp646	π - π -СТЭКИНГ π - π -stacking
	Гли706 и Асп785 Gln706 and Asp785	Углерод-водородные связи Carbon-hydrogen bonds
	Сер678, Гли707, Сер682, Лей685, Гли687, Про1171 Ser678, Gln707, Ser682, Leu685, Glu687, Pro1171	Силы Ван-дер-Ваальса Van der Waals forces
NOX4	Вал267, Лей239, Иле227 Val267, Leu239, Ile227	Алкильные связи Alkyl bonds
	Лиз265 Lys265	π -алкильная связь π -alkyl bond
	Фен243 Phe243	π - σ -связь π - σ -bond
	Тре232, Про240 Thr232, Pro240	Силы Ван-дер-Ваальса Van der Waals forces

Примечание. EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; PDGFR – рецептор тромбоцитарного фактора роста.
Note. EGFR – epidermal growth factor receptor; PDGFR – platelet growth factor receptor.

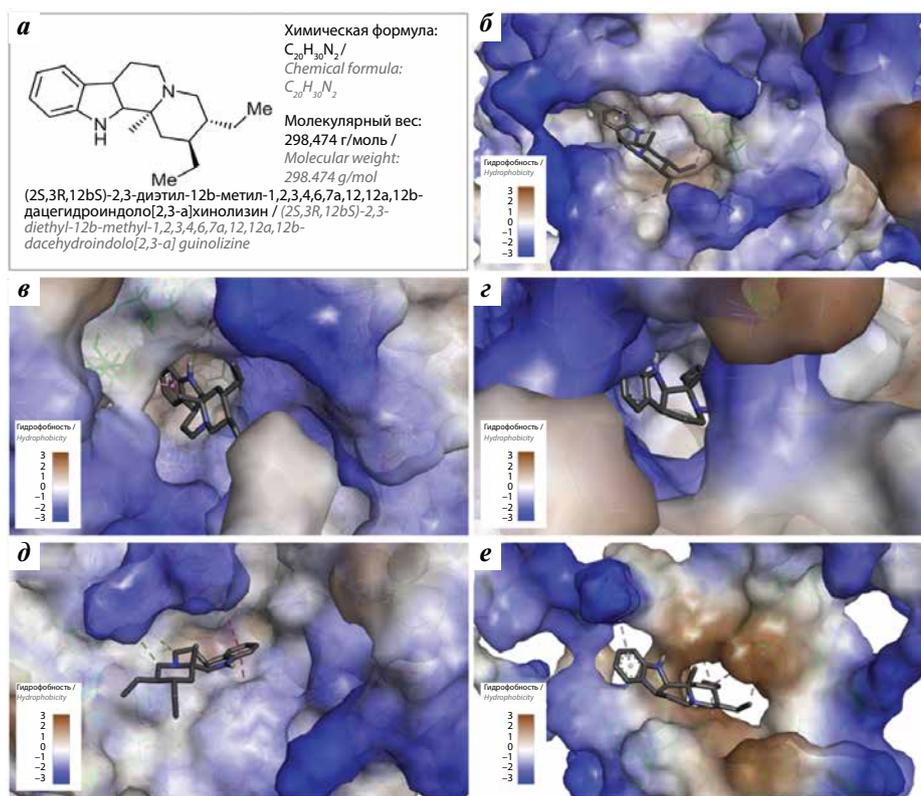


Рис. 1. Трехмерное изображение комплексов алкалоида P1 с молекулярными мишенями. Структурные формулы алкалоида P1 (а), P1–EGFR (б), P1–PDGFR (в), P1–MET (г), P1–MRP2 (д) и P1–NOX4 (е). Гидрофобная поверхность рецептора отмечена коричневым цветом, гидрофильная – синим. Пунктирными линиями обозначены связи между лигандом и рецептором
Fig. 1. Three-dimensional image illustrating complexes of alkaloid P1 with molecular targets. Structural formulas of alkaloid P1 (a), P1–EGFR (б), P1–PDGFR (в), P1–MET (г), P1–MRP2 (д) and P1–NOX4 (е). The hydrophobic surface of the receptor is shown in brown, and the hydrophilic surface is shown in blue. The dotted lines indicate the bonds between the ligand and the receptor

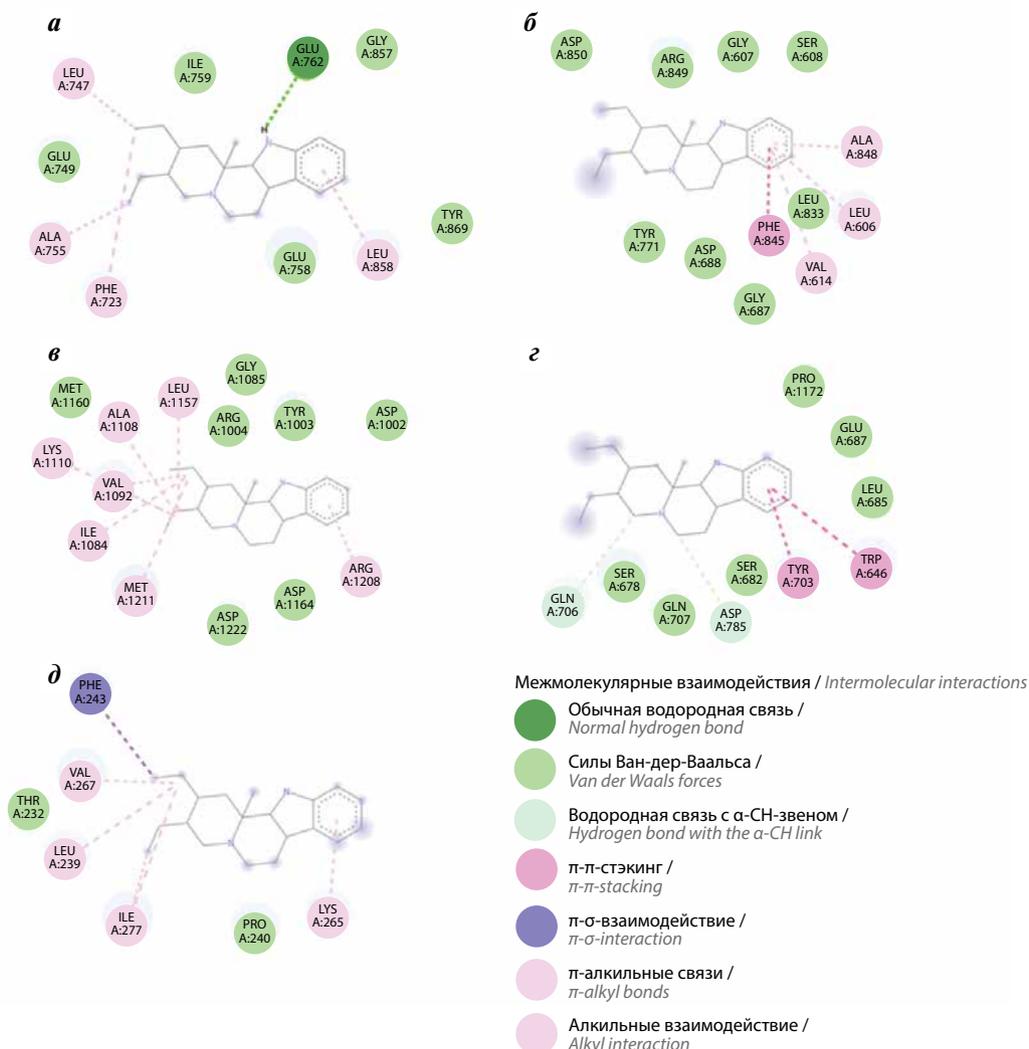


Рис. 2. Взаимодействия в комплексах P1–EGFR (а), P1–PDGFR (б), P1–MET (в), P1–MRP2 (г) и P1–NOX4 (д). D2-диаграммы. Пунктирными линиями обозначены связи между лигандом и рецептором
Fig. 2. Interactions in the complexes P1–EGFR (a), P1–PDGFR (б), P1–MET (в), P1–MRP2 (г) and P1–NOX4 (д). 2D diagrams. The dotted lines indicate the bonds between the ligand and the receptor

Глу749, Глу758, Иле759, Гли857 и Тир869 (см. рис. 2, а). Исследуемое соединение связывалось с остатками аминокислот активного центра PDGFR Лей606, Гли607, Сер608, Гли609 и Вал616 (см. рис. 2, в). Предсказаны типы связей в комплексе P1–PDGFR: π - π -стэкинг с Фен845; 3 π -алкильных связи с Лей606, Вал614 и Ала848; Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия с Асп850, Арг849, Гли607, Сер608, Тир771, Асп688, Гли687 и Лей833 (см. рис. 2, б). Наиболее прочно алкалоид P1 связывался с активным центром MET (см. рис. 1, з), образуя 6 алкильных связей с Мет1211, Иле1084, Вал1092, Лиз1110, Ала1108 и Лей1157, 1 π -алкильную связь с Арг1208, а также силами Ван-дер-Ваальса – с Мет1160, Арг1004, Гли1085, Тир1003, Асп1002, Асп1164 и Асп1222 (см. рис. 2, в). На поверхности помпы MRP2 исследуемый лиганд связался с остатками Вал637, Сер678 и Лиз677, формирующими активный центр белка-рецептора (см. рис. 1, д). Для комплекса P1–MRP2 предсказаны следующие связи: π - π -стэкинг с Тир703 и Три646; углерод-

водородные связи с Глн706 и Асп785, взаимодействия Ван-дер-Ваальса с Сер678, Глн707, Сер682, Лей685, Глу687 и Про1171 (см. рис. 2, г). Связывание алкалоида с NOX4 было рассчитано в области, необходимой для каталитической активности генерации H_2O_2 (см. рис. 1, е). Для данного комплекса характерны алкильные связи с Вал267, Лей239 и Иле227, π -алкильная связь с Лиз265, π - σ -связь с Фен243 и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия с Тре232 и Про240 (см. рис. 2, д).

Поскольку результат связывания лиганда с рецепторами клеток может быть различным, особенно при множественности таких взаимодействий (т. е. вероятно как стимуляция, так и угнетение их активности), для оценки влияния такого связывания на состояние опухолевых клеток проведено сравнение влияния инкубации с алкалоидом P1 на культуру H1299 и на неопухолевые клетки (НФЛЧ) (см. рис. 3).

Жизнеспособность клеток культуры H1299 оказалась статистически значимо ниже, чем клеток культуры

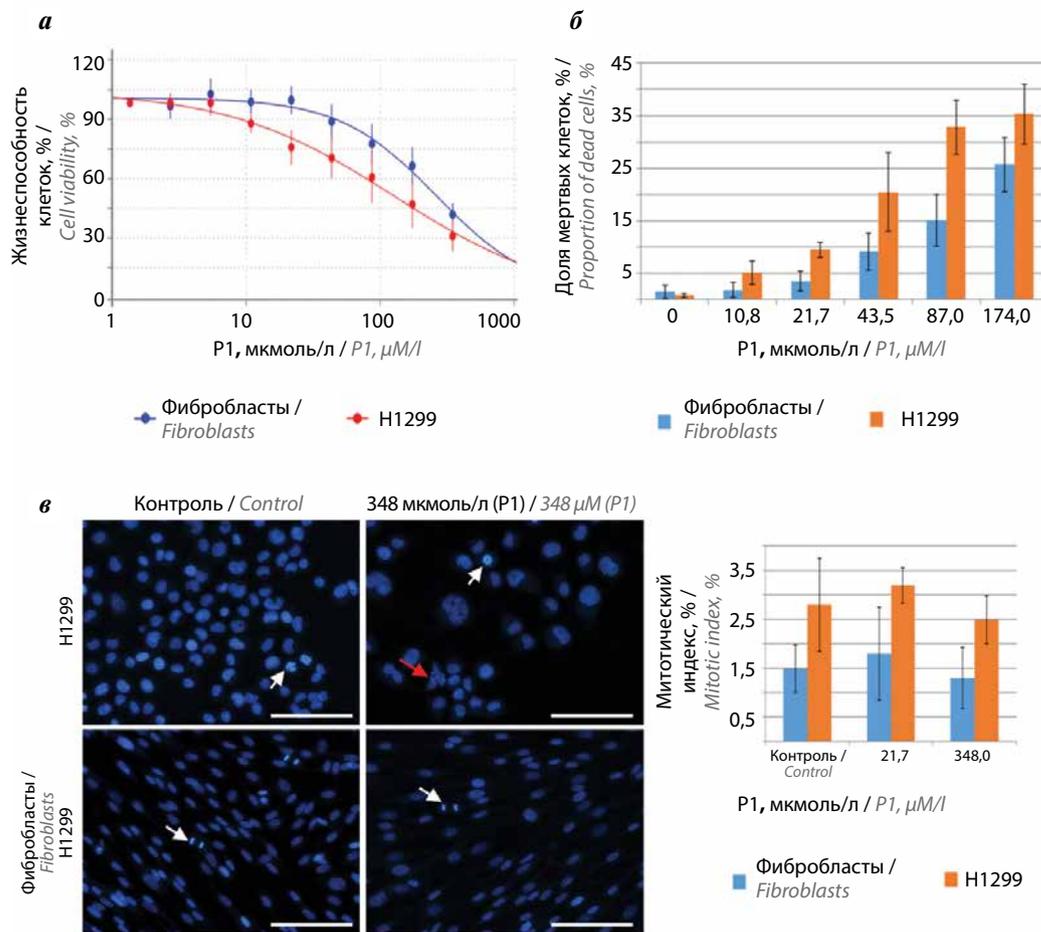


Рис. 3. Влияние алкалоида P1 на жизнеспособность культур H1299 и нормальных фибробластов легкого человека, среднее значение \pm стандартное отклонение: а – содержание живых клеток, % от контроля (ХТТ-тест), б – кривая доза – ответ; в – процент погибших клеток (прямой подсчет). Экспозиция 72 ч. Митотический индекс рассчитан по фото ядер, окрашенных Hoechst 33342. Размер масштабной линейки 100 мкм
Fig. 3. Effect of alkaloid P1 on the viability of H1299 cultures and normal human lung fibroblasts, average value \pm standard deviation: a – content of living cells, % of control (XTT test), б – dose-response curve; в – percentage of dead cells (direct cell count) (в). Exposure 72 h. Mitotic index calculated from a photo of nuclei stained with Hoechst 33342. The scale bar size is 100 μ m

НЛФЧ. Значение IC_{50} алкалоида P1 для культуры H1299 составило 127,24 мкмоль/л, для культуры фибробластов – 256,29 мкмоль/л (см. рис. 3, а). Процент погибших клеток в культуре был статистически значимо выше при концентрациях алкалоида выше 10,88 мкмоль/л, с наибольшей разницей (на 11–17 %) в диапазоне концентраций 21,7–87 мкмоль/л (см. рис. 3, б).

При высокой концентрации исследуемого алкалоида количество клеток в обеих культурах значительно уменьшалось, при этом морфология ядер в культуре НЛФЧ оставалась неизменной, а в культуре H1299 отмечались признаки нарушения митоза, о чем говорит наличие крупноядерных и многоядерных клеток (см. рис. 3, в, красная стрелка). Подсчет количества делящихся клеток в культуре (см. рис. 3, в, белые стрелки) тем не менее показал, что митотический индекс в обеих культурах

значимо не менялся, несмотря на общее сокращение количества клеток (см. рис. 3, в). В обеих культурах также не наблюдались признаки апоптоза, такие как конденсация хроматина и фрагментация ядер даже при высокой концентрации алкалоида P1.

По-видимому, исследуемый алкалоид проявляет цитостатический и цитотоксический, хотя и не связанный с апоптозом, эффекты в отношении как нормальных, так и опухолевых клеток, однако в последнем случае его действие статистически значимо более выражено и наблюдается в широком диапазоне концентраций. Это говорит о более высокой чувствительности к нему злокачественных клеток и представляет важным в плане перспективы его дальнейшего тестирования как соединения с противоопухолевой активностью.

ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе описано связывание наиболее подробно исследованного растительного алкалоида берберина с EGFR и АКТ в клетках линий рака молочной железы с энергией связывания от $-7,57$ до $-7,92$ ккал/моль, сопровождающееся угнетением их активности [11]. Данных по связыванию берберина с онкогеном PDGFR и MRP2, обеспечивающим полирезистентность к ксенобиотикам, не найдено. По остальным из исследованных нами рецепторам встречаются единичные сведения. Так, сообщается о возможности берберина связываться с MET клеток рака молочной железы с энергией $-9,4$ ккал/моль [12] и его способности понижать экспрессию NOX4, стимулированную пальмитатом, в клетках пуповинной крови [13]. Авторы указывают на существенные ограничения полученных данных об энергии связывания берберина с другими мишенями, значимыми для метаболизма опухолевых клеток (FOXO3, Nrf2, NQO1, Gpx4, PIK3CA, Gpx), так как неизвестно, насколько такое связывание соответствует биологическим эффектам соединения и насколько взаимодействие с мишенью зависит от дозы лиганда [14].

Полученные нами данные о величине энергии связывания алкалоида P1 с исследованными рецепторами в целом соответствуют данным по берберину. Результаты исследований, согласно которым значения этого показателя ниже -5 ккал/моль указывают на тесную связь лиганда и рецептора [15], позволяют предположить, что связывание алкалоида P1 с исследованными рецепторами является прочным. Данные молекулярных исследований *in silico* целесообразно подтвердить *in vitro* культуральными методами, что и было сделано нами при оценке действия исследуемого соединения на состояние культуры H1299. Линия H1299 характеризуется высоким уровнем экспрессии EGFR [16], принадлежащего к семейству тирозинкиназных рецепторов и связанного с различными сигнальными путями, включая те, в которых участвуют исследованные нами молекулярные факторы PDGFR, MET и NOX4 [17, 18].

Они рассматриваются как рецепторы, ингибируя которые в результате связывания с ними в области активных центров, алкалоид P1 предположительно может проявлять противоопухолевое действие и/или способность восстанавливать чувствительность опухолевых клеток к ингибиторам EGFR. Наиболее высокие показатели аффинности установлены при исследовании связи алкалоида P1 с MET, что может свидетельствовать об опосредованном через него действии на EGFR. Согласно данным литературы, MET способен связываться с берберинем более эффективно, чем с таргетным анти-EGFR-препаратом осимертинибом, что демонстрирует важность воздействия на этот рецептор, опосредующий проонкогенную активность EGFR [19]. Возможно, подобным действием обладает и исследованный нами алкалоид. Выявленное с помощью культуральных методов наличие у него цитостатических/цитотоксических свойств позволяет рассматривать его в качестве потенциально перспективного противоопухолевого средства, мишенями для которого могут быть рецепторы, обеспечивающие химиорезистентность и участвующие в тирозинкиназном пути, от которого зависит деление клеток [20].

Для более полного представления о потенциальном противоопухолевом эффекте алкалоида P1 следует изучить его действие на другие мишени, участвующие в пролиферации, и расширить спектр применяемых моделей. Ограничениями данного исследования являются использование недостаточного количества клеточных линий, а также первичных фибробластов, в качестве неопухолевых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Алкалоид, выделенный из *Petasites hybridus* (L.), способен связываться с мишенями, опосредующими опухолевый рост, повреждает клетки культуры аденокарциномы легкого H1299. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования его возможного противоопухолевого действия на моделях *in vitro* и *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mushtaq S., Abbasi B.H., Uzair B., Abbasi R. Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents. *EXCLI J* 2018;4(17):420. DOI: 10.17179/excli2018-1174
- Кит О.И., Жукова Г.В., Толкачев О.Н. и др. Противоопухолевые факторы природного происхождения и некоторые подходы к разработке эффективных схем фитотерапии в онкологии (обзор литературы с включением результатов собственных исследований). *Вопросы онкологии* 2022;68(5):27–38. Kit O.I., Zhukova G.V., Tolkahev O.N. et al. Antitumor factors of natural origin and some approaches to the development of effective regimens of phytotherapy in oncology (literature review including the findings of authors' own research). *Voprosy onkologii = Problems in Oncology* 2022;68(5):27–38. (In Russ.). DOI: 10.37469/0507-3758-2022-68-5-27-38
- Morgillo F., Della Corte C.M., Fasano M., Ciardiello F. Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: lung cancer. *ESMO Open* 2016;1(3):e000060. DOI: 10.1136/esmoopen-2016-000060
- Du H., Gu J., Peng Q. et al. Berberine suppresses EMT in liver and gastric carcinoma cells through combination with TGFβR regulating TGF-β/Smad pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2021;18(21):2337818. DOI: 10.1155/2021/2337818
- Cosme P., Rodríguez A.B., Espino J., Garrido M. Plant phenolics: bioavailability as a key determinant of their potential health-promoting applications. *Antioxidants (Basel)* 2020;9(12):1263. DOI: 10.3390/antiox9121263
- Златник Е.Ю., Енин Я.С., Буров О.Н. и др. Молекулярно-клеточные аспекты воздействия вторичных метаболитов Барбарии

- са обыкновенного и Белокопытника гибридного на клеточную линию HeLa. Исследования и практика в медицине 2023;10(4):31–47. DOI: 10.17709/2410-1893-2023-10-4-3
- Zlatnik E.Yu., Enin Ya.S., Burov O.N. et al. Molecular and cellular aspects of the impact of secondary metabolites from common barberry and hybrid goat's rue on the HeLa cell line. Issledovaniya i praktika v meditsine = Research'n Practical Medicine Journal 2023;10(4):31–47. (In Russ.). DOI: 10.17709/2410-1893-2023-10-4-3
7. Fu W., Liu L., Tong S. Berberine inhibits the progression of breast cancer by regulating METTL3-mediated m6A modification of FGF7 mRNA. Thorac Cancer 2024;15(17):1357. DOI: 10.1111/1759-7714.15321
 8. Achi I.T., Sarbadhikary P., Blassan P.G., Abrahamse H. Multi-target potential of berberine as an antineoplastic and antimetastatic agent: a special focus on lung cancer treatment. Cells 2022;11(21):3433. DOI: 10.3390/cells11213433
 9. Hassan S.M., Farid A., Panda S.S. et al. Indole compounds in oncology: therapeutic potential and mechanistic insights. Pharmaceuticals 2024;17(7):922. DOI: 10.3390/ph17070922
 10. Roehm N.W., Rodgers G.H., Hatfield S.M., Glasebrook A.L. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. J Immunol Methods 1991;142(2):257–65. DOI: 10.1016/0022-1759(91)90114-u
 11. Jabbarzadeh K.P., Leong M.P., Ismail P., Ling K.H. Antitumor effects of berberine against EGFR, ERK1/2, P38 and AKT in MDA-MB231 and MCF-7 breast cancer cells using molecular modelling and in vitro study. Pharmacol Rep 2019;71(1):13. DOI: 10.1016/j.pharep.2018.07.005
 12. Huang B., Wen G., Li R. et al. Integrated network pharmacology, bioinformatics, and molecular docking to explore the mechanisms of berberine regulating autophagy in breast cancer. Medicine (Baltimore) 2023;102(36):e35070. DOI: 10.1097/MD.0000000000035070
 13. Zhang M., Wang C.M., Li J. et al. Berberine protects against palmitate-induced endothelial dysfunction: involvements of upregulation of AMPK and eNOS and downregulation of NOX4. Mediators Inflamm 2013;(4):260464. DOI: 10.1155/2013/260464
 14. Sun A., Yang H., Li T. et al. Molecular mechanisms, targets and clinical potential of berberine in regulating metabolism: a review focussing on databases and molecular docking studies. Front Pharmacol 2024;15(6). DOI: 10.3389/fphar.2024.1368950
 15. Hu M., Yan H., Li H. et al. Use of network pharmacology and molecular docking to explore the mechanism of action of curcuma in the treatment of osteosarcoma. Sci Rep 2023;13:9569. DOI: 10.1038/s41598-023-36687-z
 16. Kang H.N., Kim S.H., Yun M.R. et al. ER2, a novel human anti-EGFR monoclonal antibody inhibit tumor activity in non-small cell lung cancer models. Lung Cancer 2016;5(95):57–64. DOI: 10.1016/j.lungcan.2016.02.013
 17. Liu W.J., Wang L., Zhou F.M. et al. Elevated NOX4 promotes tumorigenesis and acquired EGFR-TKIs resistance via enhancing IL-8/PD-L1 signaling in NSCLC. Drug Resist Updat 2023;9(70):100987. DOI: 10.1016/j.drug.2023.100987
 18. Pandey P., Khan F., Upadhyay T.K. et al. New insights about the PDGF/PDGFR signaling pathway as a promising target to develop cancer therapeutic strategies. Biomed Pharmacother 2023;161:114491. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114491
 19. Chen Z., Vallega K.A., Chen H. et al. The natural product berberine synergizes with osimertinib preferentially against MET-amplified osimertinib-resistant lung cancer via direct MET inhibition. Pharmacol Res 2022;1(175):105998. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105998
 20. Chin T.M., Boopathy G.T.K., Man E.P.S. et al. Targeting microtubules sensitizes drug resistant lung cancer cells to lysosomal pathway inhibitors. Theranostics 2020;10(6):2727–43. DOI: 10.7150/thno.38729

Благодарность. Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования ФГБУ «Национальный медицинский онкологический центр онкологии» Минздрава России (<https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742/>) за предоставление оборудования.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to the Center for Collective Use of the National Medical Oncological Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (<https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742/>) for providing the equipment.

Вклад авторов

Е.Ю. Златник: идея и организация исследования, анализ полученных данных, статистическая обработка данных, написание текста статьи;

С.Ю. Филиппова: анализ полученных данных, статистическая обработка данных, написание текста статьи;

Я.С. Енин: обработка результатов экспериментов, подготовка иллюстративного материала;

Т.В. Чембарова: культивирование культур клеток, редактирование;

Ф.Ф. Амирджанов: проведение молекулярного докинга;

О.Н. Буров: выделение исследуемого соединения, редактирование;

А.Д. Загребав: очистка исследуемого соединения, верификация соединения методом ядерно-магнитного резонанса;

К.А. Онасенко: проведение молекулярного докинга;

Ю.В. Дзигунова: сбор и определение видовой принадлежности растительного материала.

Authors' contributions

E.Yu. Zlatnik: the idea and organization of the study, the analysis of the data obtained, statistical data processing, article writing;

S.Yu. Filippova: analysis of the data obtained, statistical data processing, article writing;

Ya.S. Enin: processing of experimental results, preparation of illustrative material;

T.V. Chembarova: cell culture cultivation, editing;

F.F. Amirdzhanov: conducting molecular docking;

O.N. Burov: isolation of the investigated compound, editing;

A.D. Zagrebaev: purification of the investigated compound, verification of the compound by nuclear magnetic resonance;

K.A. Onasenko: conducting molecular docking;

Yu.V. Dzigunova: collecting and determination of the species of plant material.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.Ю. Златник / E.Yu. Zlatnik: <https://orcid.org/0000-0002-1410-122X>
С.Ю. Филиппова / S.Yu. Filippova: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>
Я.С. Енин / Ya.S. Enin: <https://orcid.org/0000-0002-4572-1579>
Т.В. Чембарова / T.V. Chembarova: <https://orcid.org/0000-0002-4555-8556>
Ф.Ф. Амирджанов / F.F. Amirdzhanov: <https://orcid.org/0009-0008-1682-1344>
О.Н. Буров / O.N. Burov: <https://orcid.org/0000-0002-7704-033X>
А.Д. Загребаев / A.D. Zagrebaev: <https://orcid.org/0000-0001-5864-8991>
К.А. Онасенко / K.A. Onasenko: <https://orcid.org/0009-0003-6944-9690>
Ю.В. Дзигунова / Yu.V. Dzigunova: <https://orcid.org/0009-0002-5692-2576>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания «Поиск натуральных и синтетических вторичных метаболитов растений, обладающих противоопухолевыми и иммунокорректирующими свойствами на моделях *in vitro* и *in vivo*» (№ 124022100044-2 от 2024 г.).

Funding. The study was conducted as part of the state task “Search for natural and synthetic secondary plant metabolites with antitumor and immunocorrecting properties in *in vitro* and *in vivo* models” (No. 124022100044-2 dated 2024).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России (протокол № 7 от 17.02.2020).

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the committee on biomedical ethics of the National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 7 dated 02.17.2020).