



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО

СЕКЦИЯ „QSAR И МОЛЕКУЛНО МОДЕЛИРАНЕ“

**ИЗСЛЕДВАНИЯ НА ADME/TOX СВОЙСТВА
И МОЛЕКУЛНИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НА ФЛАВОНОЛИГНАНИ
ОТ *SILYBUM MARIANUM* L. ЧРЕЗ *IN SILICO* И *IN VITRO* ПОДХОДИ**

АВТОРЕРФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД, ПРЕДСТАВЕН ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН**

„ДОКТОР“

АНТОНИЯ ГЕОРГИЕВА ДЮКЕНДЖИЕВА-ТОДОРОВА

НАУЧНА ОБЛАСТ: 4. „ПРИРОДНИ НАУКИ, МАТЕМАТИКА И ИНФОРМАТИКА“
ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ: 4.3. „БИОЛОГИЧЕСКИ НАУКИ“
НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: „ПРИЛОЖЕНИЕ НА ПРИНЦИПИТЕ И МЕТОДИТЕ НА
КИБЕРНЕТИКАТА В ОБЛАСТТА НА ЗАВИСИМОСТИ СТРУКТУРА – АКТИВНОСТ
НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА“

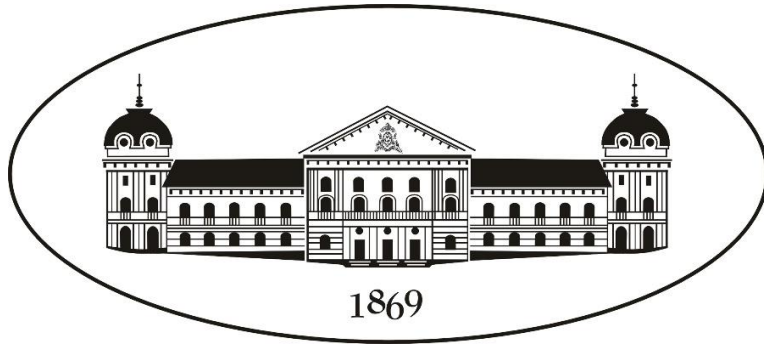
НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

ПРОФ. Д-Р ИВАНКА ЦАКОВСКА

и

ЧЛ. КОР. ПРОФ. ИЛЗА ПЪЖЕВА, ДБН

София, 2023



Защитата на дисертационния труд ще се състои на от в
.....

Дисертационният труд е обсъждан на разширен научен семинар на секция „QSAR и молекулно моделиране“ на ИБФБМИ на 28.07.2023 г.

Дисертационния труд съдържа увод, цели и задачи, три глави, приноси, списък с използвана литература (202 литературни източника), списък с публикации и участия в научни форуми, 2 приложения и е в обем от 144 страници.

Автор: Антония Дюкенджиева-Тодорова

Заглавие: Изследвания на ADME/TOX свойства и молекулни взаимодействия на флавонолигнани от *Silybum marianum* l. чрез *in silico* и *in vitro* подходи

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
УВОД.....	5
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....	7
1. Роля на природните продукти в лекарствения дизайн.....	7
2. Флавонолигнаните – малка подгрупа природни продукти с голям потенциал като водещи структури в лекарствения дизайн.....	8
3. Интегриране на <i>in silico/in vitro</i> подходи във фармакологичните изследвания на биоактивни съединения с природен произход.....	12
3.1. QSAR анализи.	13
3.2. <i>In silico</i> подходи и инструменти за изследване на молекулни взаимодействия и ADME/Tox свойства на ПП.	14
4. Заключение.....	18
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	21
1. МЕТОДИ.....	21
1.1. РАМРА.	21
1.2. QSAR моделиране за предсказване на РАМРА пермеабилитет.....	21
1.3. Експертни системи, базирани на знания, за предсказване на токсичност и метаболизъм.	21
1.4. Молекулно моделиране.....	21
1.4.1. Молекулно моделиране на взаимодействията на флавонолигнаните с човешкия естрогенов рецептор алфа (ER α).....	21
1.4.2. Молекулно моделиране на взаимодействията на флавонолигнани с нови таргетни протеини.	22
1.5. <i>In vitro</i> изследвания на взаимодействия на флавонолигнаните с избрани таргетни протеини на противоракови лекарства.	22
2. МАТЕРИАЛИ И ДАННИ	23
2.1. РАМРА.	23
2.2. QSAR моделиране за предсказване на РАМРА пермеабилитет.....	23
2.3. <i>In vitro</i> изследвания на взаимодействия на флавонолигнаните с избрани таргетни протеини на противоракови лекарства.	23
ГЛАВА 3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ.....	24
1. Изследвания на ADME/Tox свойства на флавонолигнани от <i>Silybum marianum</i>	24
1.1. РАМРА пермеабилитет.....	24
1.1.1. Измерване на РАМРА пермеабилитет.....	24
1.1.2. QSAR модел за предсказване на РАМРА пермеабилитет.....	26
1.1.3. <i>In silico</i> предсказване на РАМРА пермеабилитет.....	29
1.2. Биотрансформации и токсични ефекти.....	30
1.2.1. <i>In silico</i> предсказвания на токсичност и метаболизъм.	30

1.2.2.	Молекулно моделиране на взаимодействията с човешки естрогенов рецептор алфа (ER α).	31
1.3.	Заключения.	34
2.	Идентифициране на нови фармакологични таргетни протеини на флавонолигнани от <i>Silybum marianum</i> и изследвания на молекулните им взаимодействия.	35
2.1.	Подбор на потенциални нови таргетни протеини на флавонолигнани, базиран на химическо сходство с одобрени лекарства.	36
2.2.	Молекулно моделиране.	37
2.2.1.	Анализ на форма и свойства на молекулни повърхности.	37
2.2.2.	Докинг изследвания в SMO и BRAF киназата.	37
2.3.	<i>In vitro</i> изследвания на потенциала на флавонолигнани за взаимодействия с подбрани противотуморни таргетни протеини.	41
2.3.1.	Ефекти върху активността на BRAF V600E киназата.	41
2.3.2.	Цитотоксичност спрямо злокачествени кожни клетъчни линии.	42
2.3.3.	Инхибиторна активност спрямо Hedgehog (HH) сигналния път.	43
2.3.4.	Свързване с SMO рецептора.	44
2.4.	Заключения.	45
ПРИНОСИ		47
ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА		48
НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД		54
УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ		55

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ABL - воден граничен слой

ADME/Tox - абсорбция, разпределение, метаболизъм, екскреция и токсичност

DS - Double-Sink

F - variance ratio

HH - Hedgehog

ER α - човешки естрогенов рецептор алфа

logP - коефициент на разпределение октанол-вода

logD - проявяващ се коефициент на разпределение октанол-вода на йонизирани съединения

LOO - leave-one-out

MW – молекулно тегло

PAMPA - parallel artificial membrane permeation assay

pKa - константата на киселинна дисоциация

PSA - полярната повърхностна площ

Q2 - корелационен коефициент от кръстосана проверка

QSAR - количествени зависимости структура-активност

R² – корелационен коефициент

SEE - стандартна грешка на модела

SMO – Smoothened

TPSA – топологична полярна повърхностна площ

TSA – общата повърхностна площ

ПП – природен продукт

УВОД

В продължение на хилядолетия хората са използвали природни продукти (ПП) за различни медицински цели. Днес ПП продължават да бъдат основен източник на химически структури за целите на лекарствения дизайн с особено значение в терапията на ракови и инфекциозни заболявания. ПП притежават множество полезни характеристики, благодарение на които взаимодействат с фармакологичните таргетни молекули по-ефективно от синтетичните съединения. Предвижда се, че технологичният напредък в биосинтетичното инженерство, геномиката и изчислителните инструменти ще засили откриването на лекарства, базирани на ПП, както в утвърдени, така и в нововъзникващи области на медицината.

Пример за добре известен ПП, който се използва от древността, но за който едва наскоро е доказано, че притежава много нови фармакологични ефекти, е силимаринът, активният екстракт, получен от лечебното растение *Silybum marianum* (L.) Gaertn (бял трън). Основните компоненти на силимарина (флавонолигнаните) са идентифицирани като съединения, взаимодействащи с голям брой таргетни молекули, притежаващи потенциал за приложение при лечението на онкологични, неврологични, сърдечно-съдови, инфекциозни и метаболитни заболявания. Те са обект на особено интензивни изследвания в клиничната терапия на рак - в сферата на химиопрофилактиката и лечението и облекчаването на страничните ефекти, свързани с химиотерапията. Въпреки това, много от механизмите на действие, както и таргетните молекули на флавонолигнаните в контекста на описаните патологии, не са добре изучени. Освен това, фармакокинетичните свойства на отделните съединения в състава на силимарина са недостатъчно изследвани, което възпрепятства оценката на възможни вариации в характеристиките на различните форми на приложение на силимарин. В този контекст, интегрирането на *in silico* методи в изследванията на силимарина може да допринесе за по-добро разбиране на техните фармакологични свойства, спестявайки време и разходи.

Целта на настоящите изследвания е да се изяснят механизми на действие и да се оценят свойства, свързани с потенциални фармакологични ефекти на флавонолигнаните от *Silybum marianum*, чрез *in silico* и *in vitro* подходи. Приложен е интердисциплинарен подход, базиран на предсказания, получени чрез QSAR (quantitative structure–activity relationship, количествени зависимости структура-активност) модел и *in vitro* ПАМПА (parallel artificial membrane permeation assay) измервания за оценка на стомашно-чревната

абсорбция на основните съединения в силимарина. Предсказани са потенциални токсични ефекти и метаболитни трансформации чрез *in silico* подходи и са изследвани взаимодействия с естрогенния рецептор алфа като потенциален механизъм на токсичност. Чрез комбиниран *in silico* / *in vitro* анализ са изяснени механизми на противотуморна активност на флавонолигнани от *Silybum marianum* и BRAF киназата и Smoothened рецептора (SMO) са идентифицирани като техни нови фармакологични таргети.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Роля на природните продукти в лекарствения дизайн.

ПП се използват от древността за различни медицински цели и до днес продължават да са източник на вдъхновение за съвременния лекарствен дизайн, поради огромното си разнообразие от химични структури и биологични активности (Li et al. 2019).

Според съвременни доклади, оценяващи последните 30 години от развитието на лекарствения дизайн в световен мащаб, фокусът на изследванията се измества от ПП, но те продължават да бъдат основен източник на нови водещи структури или фармакофори за целите на медицинската химия. Анализ на употребата на ПП като източници на нови лекарства за периода 01/1981 - 09/2019 показва, че в края на третото тримесечие на 2019 г. 441 от всички 1394 малки лекарствени молекули (32%) попадат в категорията на ПП (Newman and Cragg 2020).

ПП притежават специфични характеристики, отличаващи ги от синтетичните молекули, свързани както с предимства, така с предизвикателства, съпътстващи употребата им за целите на лекарствения дизайн. Намалващите изследователски усилия за откриване на лекарства, базирани на ПП от страна на фармацевтичната индустрия през последните няколко години могат да бъдат до голяма степен отдадени на множеството трудности, свързани с изследванията на ПП: необходимост от събиране на достатъчно количество биологичен материал за производството на фармацевтични препарати, променлив състав на биологичния материал, затруднения при процедурите за изолиране и/или пречистване, токсичност на някои активни съединения. Въпреки тези предизвикателства, съвременните подходи в биосинтеза, биохимията и инженерството на природни съединения стават причина за безпрецедентно развитие в изучаването на ПП (Wright 2019). Процесите, които регулират производството на ПП от различни източници, са значително по-добре познати, което позволява информираната им модификация и манипулация. Същевременно, бързото и икономически ефективно секвениране на геномите на организми, произвеждащи ПП, разкрива гени, отговорни на биосинтеза на ПП, и показва, че често тези гени се обособени в клъстери, които улеснява идентифицирането им (Wright 2017).

По-ранни сравнителни проучвания на ПП и химически синтезирани молекули показват, че ПП притежават по-благоприятни характеристики, свързани с

взаимодействия с таргетни молекули, включително по-голям брой sp³-хибридизирани въглеродни атоми и хирални центрове, по-малко ароматни пръстени, по-големи макроциклични алифатни пръстени, по-ниско съдържание на азот и по-високо съдържание на кислород. Всички тези фактори допринасят за по-сложни триизмерни структури. Тези свойства са причина ПП да взаимодействат с биологичните таргетни молекули по-ефективно, отколкото по-равнинните и стереохимично по-прости структури на синтетични съединения (Rodrigues et al. 2016). Резултатите от анализи на някои големи скринингови колекции от съединения предполагат, че разнообразието в рамките на биологически значимото „химическо пространство“ е по-важно от размера на библиотеката (Harvey, Edrada-Ebel и Quinn 2015). Полезните химически характеристики на ПП могат да бъдат допълнително оптимизирани чрез стратегии за синтез на съединения с подобрени лекарство-подобни свойства. Те включват стабилност в повлияването на биохимични процеси, насочване към специфични тъкани и разширяване на обхвата на рецепторите, с които взаимодействат. Освен това подструктурите, базирани на ПП, са особено подходящи за модификации на определени фрагменти с цел получаването на ефективни и селективни нови химически структури (Grabowski, Baringhaus и Schneider 2008).

2. Флавонолигнаните – малка подгрупа природни продукти с голям потенциал като водещи структури в лекарствения дизайн.

Silybum marianum (L.) Gaertn, известен като бял трън, е едногодишно или двугодишно растение от семейство Сложноцветни, произхождащо от средиземноморските и северноафриканските региони (Khan, Blackshaw и Marwat 2009), което е добре познато от древни времена заради разнообразните си терапевтични ефекти. В миналото белият трън е използван основно за лечение на заболявания, засягащи бъбреците, далака, черния дроб и жлъчния мехур (Abenavoli et al. 2018). Здравните ползи на белия трън са многократно доказани във времето и през 70-те години на миналия век екстрактът от плодовете на растението, известен като силимарин, е официално класифициран от Световната Здравна Организация като лекарство с хепатопротективни свойства (Vijak 2017). В днешно време белият трън е запазил популярността си, а билковите добавки със силимарин са сред най-продаваните в САЩ през 2015 г. (Andrew and Izzo 2017). През последните десетилетия изследванията, насочени към антиоксидантния и противовъзпалителен капацитет на силимарина, и способността му да модулира

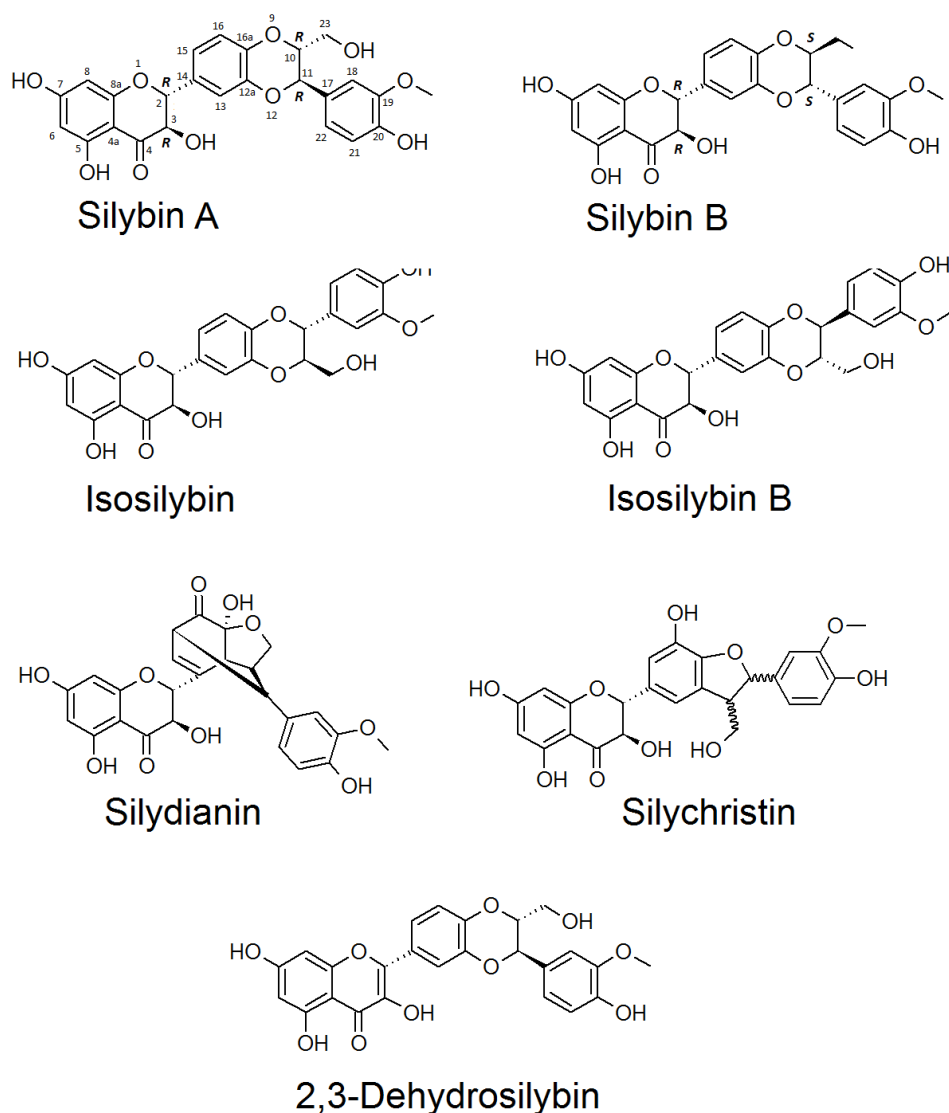
клетъчните сигнални пътища, също привличат интереса на фармаколозите. Резултатите от тях показват, че силимаринът е субстанция, взаимодействаща с множество таргетни молекули в организма и има потенциал за приложение при лечението на онкологични, неврологични, сърдечно-съдови, инфекциозни и метаболитни заболявания, както и като протектор в дерматологията и козметиката (X. Wang, Zhang и Wu, n.d.).

Доказаната способност на силимарина да въздейства върху ключовите етапи на канцерогенезата - инициация, промоция и прогресия на тумора - го прави обещаващ агент за разработването на препарати с химиопревантивна активност и помощни средства при прилагане на химиотерапия. Необходимо е потенциалът на тези приложения да бъде допълнително проучен в клинични изпитвания, чрез които да се определят подходящите дози и действителната ефикасност на екстракта при различни видове ракови заболявания. Освен това, за да се подобри ефикасността на силимарина и за да се избегнат възможни странични ефекти при приложението му, е необходимо да бъде изяснен механизмът му на действие в организма както и ролята на индивидуалните съединения в състава му върху патогенезата на заболяванията.

През последните десетилетия са проведени обширни проучвания върху метаболизма, транспорта и влиянието на силимарина върху фармакокинетиката на други лекарства. Въпреки това, основна част от фармакокинетичните изследвания са проведени единствено върху силибина, основният компонент на силимарина. В тази връзка е необходимо да бъдат взети под внимание възможни вариации в пероралното съдържание, разтварянето и пероралната бионаличност, на другите флавонолигнани в силимарина, тъй като е доказано, че те са отговорни за част от благоприятните му ефекти (Camini and Costa 2020).

Проучванията на остра, подостра и хронична токсичност показват благоприятни профили на безопасност на силимарина при хора, като в някои проучвания са наблюдавани само преходни странични ефекти (стомашно-чревни разстройства). Въпреки това повечето изследвания на токсичността на силимарина не обсъждат абсорбцията и формата, под която се приема силимарина (Soleimani et al. 2019). Тъй като силимаринът включва няколко флавонолигнани в състава си, изследването на тези вещества поотделно би могло да предостави по-задълбочен профил за безопасност на различни препарати със силимарин и да обясни по-добре възможните взаимодействия, когато той се прилага едновременно с други лекарства.

Силимаринът е екстракт от цветовете, корените и основно от плодовете на белия трън, съдържащ флавонолигнани (около 70%–80% w/w), както и полимерни и окислени полифенолни съединения, състоящи се от смес от флавоноиди. Флавонолигнаните са сравнително малък подклас от съединения, чието общо наименование показва, че структурата им може да бъде условно разделена на две части (флавоноидна и лигнанна), но някои автори считат като по-подходящи наименования „хибридни“, или „неконвенционални“ лигнани за групата съединения в силимарина (Csupor, Csorba и Hohmann 2016). Поради наличието на хирални центрове в общия скелет, флавонолигнаните се срещат като стереоизомери в природата, най-често означавани като А и В. Основните флавонолигнани в силимарина са силибини А и В, изосилибини А и В, силикристини А и В, изосиликристин и силидианин (Kvasnička et al. 2003) (Фигура 1). Основният компонент на силимарина - силибин присъства като квази-еквимоларна смес от диастереоизомери А и В. Силибинът е малка молекула, но притежава много функционални групи, характеризира се с редуващи се карбоцикли и хетероцикли и поради структурата си е устойчив на редукция, но се окислява лесно до 2,3-дехидросилибин (Abenavoli et al. 2018).



Фигура 1. Химически структури на основните флавонолигнани в силимарина. Структурата на силибин А е номерирана според система за номериране, използвана в повечето химически документи. Хиралните центрове са показани само за силибините. Адаптирано от Biedermann et al. 2014 и Lorenzo et al. 2020 г.

Силибинът, като основен флавонолигнан в силимарина, често се определя като единственият компонент, отговорен за биологичната активност на целия екстракт. Въпреки това, има доказателства, че останалите съединения, съдържащи се в силимарина, са селективно или синергично отговорни за някои биоактивности. Следователно, прецизното аналитично определяне на компонентите на силимарина е от съществено значение при всяко изследване за биологична активност, за да бъде осигурена възпроизводимост и валидност на резултатите (Petrásková et al. 2020). Освен това се посочва, че стереохимията играе важна роля за множество биологични активности на

флавонолигнаните и са необходими фокусирани изследвания върху чистите форми на съединенията, които се прилагат терапевтично като смеси (Křen 2021). Въпреки това, количественото определяне и изолирането на оптически чисти съединения често се счита за трудоемък процес, поради съдържанието на структурно близки съединения в силимарина. В този контекст, интегрирането на *in silico* подходи в изследванията на силимарина, преди или успоредно с експерименталното валидиране, може да бъде особено полезно, тъй като тези подходи позволяват работа с индивидуални съединения с цел по-добро разбиране на техните фармакологични свойства, спестявайки разходи и време.

3. Интегриране на *in silico/in vitro* подходи във фармакологичните изследвания на биоактивни съединения с природен произход.

През последните години интегрирането на *in silico* подходи в изследванията на ПП допринася значително за по-добро разбиране на техните биологични и химически характеристики, включително разширяване на химическото пространство, свързано с лекарствени свойства и разкриване на повече потенциални макромолекулни таргети. *In silico* моделирането се превръща във важен инструмент на лекарствения дизайн и се счита за основен двигател на възвръщащия се интерес към разработването на лекарства, базирани на ПП. Интегрираните компютърно-подпомогнати подходи са незаменими при обработката на голямо количество структурна и биологична информация за кратко време и могат да окажат силно влияние върху успеха на лекарствените разработки. ПП се характеризират с голямо структурно разнообразие и сложност, благодарение на което често взаимодействат с голям брой таргетни молекули. Като се има предвид, че *in vitro* експериментите с висока производителност за изучаване на фармакологията на ПП изискват големи финансови разходи и време, високоефективните *in silico* предсказания могат да се използват при разработването на бързи и икономични стратегии за изследване на взаимодействията на ПП с таргетни молекули, преди експерименталното им валидиране (Moumbock et al. 2019). Освен това *in silico* предсказанията на ADME/Tox (абсорбция, разпределение, метаболизъм, екскреция и токсичност) свойства играят важна роля при избора на ПП като лекарствени кандидати, тъй като неблагоприятните фармакокинетични свойства и токсичността се считат за основните причини за прекратяване процеса на разработването им. На *in silico* моделирането се отдава важно значение, тъй като ADME/Tox свойствата се оценяват на все по-ранен етап от процеса на

разработване на лекарства (Alqahtani 2017), особено при изследването на немодифицирани ПП, които често показват незадоволителни ADME/tox профили (International Natural Product Sciences Taskforce et al. 2021).

В следващите раздели са представени основните *in silico* подходи и инструменти за изследване на молекулните взаимодействия и ADME/Tox свойствата на ПП, които са използвани в дисертацията.

3.1. QSAR анализи.

Основите на QSAR (quantitative structure–activity relationship, количествени зависимости структура-активност) моделирането, чиято цел е да предскаже биологичната активност на химическите структури чрез анализ на структурните им характеристики, датира от деветнадесети век. През 1868 г. Crum-Brown и Fraser публикуват следното уравнение, което се счита за основополагаща формула за развитието на концепцията на QSAR: $\Phi = f(C)$, физиологичната активност, Φ , се изразява като функция на химическата структура C (Brown and Fraser 1868).

QSAR изследванията, се прилагат, за да бъдат изучени биологични ефекти на различни нива, напр. взаимодействия с макромолекули, клетъчни реакции, антимикробни, противогъбични, антиоксидантни, противоракови, противовъзпалителни активности и др. (Peter et al. 2019). Що се отнася до ADME/Tox свойствата, QSAR подходите успешно са си проправили път под формата на софтуерни продукти и все по-нови методи за предсказване на тези характеристики се въвеждат в сферата на лекарствения дизайн. Основна цел на тези непрекъснато развиващи се методи е да се намалят неуспехите на късен етап в разработването на лекарства чрез фокусиране върху най-обещаващия лекарствен кандидат с благоприятни ADME/Tox свойства (Silva and Trossini 2014).

Класическият QSAR анализ (анализ на Hansch) може да се дефинира като прилагане на подходи за многомерен статистически анализ, а именно регресионни и класификационни методи, за търсене на количествени връзки между биологичната активност на хомоложна серия от съединения и техните физикохимични свойства. Прилагайки този анализ се предполага, че поведението на дадено вещество в биологична среда зависи от неговите структурни характеристики, които влияят върху цялостните му свойства (Rudrapal и Egbuna 2022).

3.2. *In silico* подходи и инструменти за изследване на молекулни взаимодействия и ADME/Tox свойства на ПП.

В дисертацията са приложени следните подходи за изследване на:

- (1) молекуни взаимодействия на ПП: молекулен докинг и търсене на молекулно сходство;
- (2) ADME/Tox свойства на ПП: експертни системи за оценка на ADME/Tox свойства.

Молекулен докинг

Молекулният докинг е най-разпространеният структура-базиран подход за лекарствен дизайн, който се използва широко от началото на 80-те години на миналия век за симулиране на молекулни взаимодействия между две молекули (най-често протеин и малка молекула), предсказване за начина на свързване и афинитета между тях (Stanzione, Giangreco и Cole 2021). Той е полезен инструмент в лекарствения дизайн, когато е налична 3D структурата на таргетната молекула и позволява провеждането на виртуален скрининг на голям брой малки молекули и идентифицирането на тези, които биха взаимодействали с определен таргет (hit identification). Използването на молекулният докинг за целите на лекарствения дизайн с ПП може да помогне да се обяснят някои традиционни употреби и потенциално да се идентифицират нови приложения на ПП от лечебните растения (Asiamah et al. 2023).

Търсене на молекулно сходство

Молекулното сходство е ключова концепция, която се използва рутинно при откриването и дизайна на нови молекули. Основана се на идеята, че две молекули споделят сходни физически свойства и биологични функции, ако са структурно подобни (Kumar and Zhang 2018). Методите за сходство могат да се прилагат за търсене в бази данни за химически структури в началните етапи на лекарствения дизайн, когато се знае малко за биологичните им таргетни молекули, които представляват интерес.

Анализът на молекулно сходство включва два основни компонента – представяне на структурата и количествена оценка на сходството между две молекулни структури. Съществуват много видове структурни репрезентации, които се използват при оценката на сходството между две молекули. Те включват физикохимични свойства, топологични индекси, графи, фармакофорни характеристики, молекулни форми, полета и т.н. Освен това са въведени различни методи за количествено определяне на сходството между две

структури, например коефициент на Танимото, индекс на Тверски, индекс на Дайс, евклидово разстояние и др. Сред тях коефициентът на Танимото (Rogers and Tanimoto 1960) е най-популярният и широко използван измерител за подобие. Въз основа на структурната репрезентация, подходите за молекулно сходство могат да бъдат класифицирани в 2D или 3D методи за оценка на сходство.

Методите за оценка на 3D сходство се използват успешно като инструмент за виртуален скрининг с цел идентифициране на молекули, подобни на химическа структура от дадена библиотека. В литературата са публикувани както ретроспективни, така и проспективни проучвания, използващи този подход. Той често се комбинира със структура-базирани методи и се използва с цел подобряване на ефективността на молекулния докинг (Kumar and Zhang 2018). Едно приложение на методите за оценка на 3D сходството е идентифицирането на изофункционални молекули с различни химически основни структури (scaffold hopping), за да се подобри ефективността, селективността и физикохимичните свойства на водещите структури в лекарствения дизайн. Този подход може да бъде ефективно прилаган в изследванията на водещи структури, които се характеризират с неблагоприятни фармакологични свойства, свързани с селективност, например. Друго приложение е *in silico* „target fishing“ или идентифициране на нови протеинови таргети на химически съединения.

Експертни системи за ADME/Tox оценка на биоактивни съединения

In silico методите за предсказване на различни характеристики в лекарствения дизайн, включително ADME/Tox свойства, принадлежат към два класа – 1) експертни системи и 2) статистически (управлявани от данни) системи. Експертните системи използват знанията на експерти, докато статистическите системи се основават на експериментални данни (Silva and Trossini 2014). Експертните системи използват логически алгоритъм, който решава задачи (или прави предсказания) чрез прилагане на правила от база знания в отговор на единични или множество заявки (или хипотези). Предимствата на експертните системи включват прозрачност на направените предсказания и възможност експертите да разработват правила за обработка на различни типове информация по начин, който не може лесно да бъде възпроизведен чрез автоматизиран анализ (Marchant, Briggs и Long 2008). През последните десетилетия се наблюдава все по-широко използване на експертни системи, които подпомагат лекарствения дизайн, особено при оценката на токсичност. Предлагат се както продукти с отворен код, така и комерсиални

такива, като Derek Nexus, наред с други като ToxTree, CASE Ultra Expert Rules и Leadscope Expert Alert system (Brigo, Naga и Muster 2022). Достъпността на съвременните техники за моделиране, мощните изчислителни ресурси и данните с добро качество правят възможно генерирането на надеждни предсказания за нови химични структури, примеси, химикали, ПП др (Machhar et al. 2019).

QSAR модели за PAMPA пермеабилитет

Стомашно-чревната абсорбция е ключово ADME свойство, което трябва да се вземе предвид при оценка на биологичните ефекти на веществата. PAMPA придобива популярност като скринингов метод за определяне на пасивен клетъчен пермеабилитет, който е основният механизъм на стомашно-чревната абсорбция за много лекарства. PAMPA привлича нарастващ интерес от различни сектори, включително козметиката, където неживотинските модели могат да осигурят важен източник на данни за *in vitro* - *in vivo* екстраполация.

PAMPA е експериментален модел, въведен от Kansy et al. (Kansy, Senner и Gubernator 1998), за предсказване на пероралната абсорбция на нови терапевтични средства по прост, възпроизводим и високопроизводителен начин. Анализът измерва ефективния/ проявяващ се пермеабилитет и/или фракцията на проникналото изследвано съединение. Ограничение на PAMPA е, че активните и изходящи транспортни механизми не се моделират от PAMPA мембраните. Въпреки това е доказано, че PAMPA пермеабилитетът корелира добре с клетъчния Caco-2 пермеабилитет и стомашно-чревната абсорбция при човек *in vivo*, което е резултат от факта, че повечето от известните лекарства се абсорбират чрез пасивна дифузия. Корелациите са потвърдени като статистически надеждни в проучвания, прилагачи линейна регресия, докладвани от Ano et al. (Ano et al. 2004), Fujikawa et al. (Fujikawa et al. 2005; 2007), Verma et al. (Verma, Hansch и Selassie 2007).

Общата експериментална постановка на PAMPA се състои от: 1) донорни и акцепторни компартменти, съдържащи, съответно, воден разтвор на изследваната молекула и буфер на водна основа, първоначално свободен от изследваната молекула; (2) изкуствена мембрана, съставена от фосфолипидни смеси, разделяща донорния и акцепторния компартмент; и (3) филтър за фиксиране и стабилизиране на мембраната. Разработени са редица варианти на PAMPA, които се различават по състава на мембраната, наличието на специфични съставки в акцепторния компартмент и моделите

за изчисляване на коефициентите на пермеабилитет.

В литературата са публикувани база данни със стойности за PAMPA пермеабилитет, където са представени параметрите за пермеабилитет, литературните източници и основните експериментални условия. Най-големият публично достъпен набор от данни е докладван и обобщен от Avdeef, 2012. Той включва присъщи и ефективни коефициенти на пермеабилитет, получени чрез Double-Sink (DS) PAMPA, за близо 300 съединения (предимно комерсиални лекарства).

Приложимостта на QSAR моделите за PAMPA пермеабилитет се основава на факта, че пермеабилитетът (особено в комбинация с водната разтворимост и константата на киселинна дисоциация, pK_a) може да се използва като предиктор за стомашно-чревна абсорбция на перорално прилагани лекарства (Avdeef 2012; Avdeef et al. 2007). Моделите, докладвани в литературата, следват класическия QSAR подход, използващ експериментално получени и/или теоретични структурни дескриптори за дефиниране на зависимости с пермеабилитета. Повечето модели се основават на множествена линейна регресия. Докладвано са и малък брой модели, прилагащи изкуствени невронни мрежи за включване на нелинейни зависимости. Като цяло опростените модели, базирани на малък брой дескриптори, са по-лесни за тълкуване, отколкото моделите, базирани на множество дескриптори, чиято връзка с пермеабилитета е сложна (Stenberg et al. 2002). От съществено значение е да се спазват основните изисквания за добри QSAR практики, включително валидиране на модела и анализ на областта на приложимост (Worth et al. 2005).

QSAR моделите за PAMPA пермеабилитет извеждат зависимости между съответния параметър за пермеабилитет, напр. проявяващ се пермеабилитет (P_a) или поток (F), с физико-химични свойства като коефициент на разпределение в октанол-вода ($\log P$), константа на киселинна дисоциация (pK_a) и проявяващ се коефициент на разпределение в октанол-вода на йонизирани съединения ($\log D$) или структурни дескриптори, включително полярната повърхностна площ (PSA), повърхностна площ на донори или акцептори на водородни връзки; Abraham дескриптори; индикаторни променливи за конкретни функционални групи; VolSurf параметри и др.

QSAR моделите за PAMPA пермеабилитет могат да бъдат ценен инструмент, особено в началните стъпки на лекарствения дизайн. Те са полезни при оценката на пасивната стомашно-чревна абсорбция на лекарства и други биоактивни съединения, като по този

начин спестяват време и намаляват разходите чрез потенциално елиминиране на *in vivo* и/или *in vitro* експерименти. Въпреки това големите набори с данни за РАРМА пермеабилитет, достъпни в публичното пространство, са малък брой, както и докладваните QSAR модели за РАРМА пермеабилитет в сравнение с такива, предсказващи други крайни точки. Идентифицирана е необходимост от изграждане на големи набори от данни за разнообразни съединения, които биха били полезни за разработването на надеждни модели с висока предсказваща способност и по-широка област на приложимост. Друг потенциален фактор за по-широкото използване на QSAR моделите за РАРМА пермеабилитет и оценка на стомашно-чревна абсорбция е разработването на надеждни модели, използващи изчислени параметри, които могат лесно да бъдат получени, особено чрез софтуерни ресурси със свободен достъп.

4. Заключение.

ПП се използват от древността за различни медицински цели и до днес продължават да са източник на вдъхновение за съвременния лекарствен дизайн, поради огромното си разнообразие от химични структури и биологични активности. През последните години се регистрира възвращащ се интерес към ПП като водещи структури, главно поради техните благоприятни характеристики, свързани с повишен капацитет за взаимодействие с фармакологични таргети. Предвижда, че изследванията на ПП ще стават все по-интензивни благодарение на технологичния напредък в биосинтетичното инженерство, геномиката и изчислителните инструменти.

Силимаринът е екстракт от добре познатото лечебно растение *Silybum marianum*, който предлага множество здравни ползи и е запазил до днес интереса на фармаколозите поради своите антиоксидантни, противовъзпалителни активности и способността си да модулира различни сигнални пътища в клетката. Проучванията върху силимарина показват, че той е субстанция, взаимодействаща с множество таргетни молекули в организма, която притежава потенциал за приложение при лечението на онкологични, неврологични, сърдечно-съдови, инфекциозни и метаболитни заболявания, както и като протектор на кожата в дерматологията и козметиката. Основните компоненти на силимарина, флавонолигнаните, са обект на особено интензивни изследвания в клиничната терапия на ракови заболявания в сферата на химиопрофилактиката, лечението и облекчаване на страничните ефекти, свързани с химиотерапията. Широкият спектър от биологични активности на компонентите на силимарина обуславя техния

потенциал като водещи структури за лекарствения дизайн в контекста на комплексни патологии и предлага атрактивна възможност за допълнително оптимизиране на терапевтичния им потенциал чрез подходящи химични модификации в структурата. В съответствие с тази перспектива е идентифицирана необходимост от фокусирани усилия за изясняване на механизмите на действие и съответните таргетни макромолекули на флавонолигнаните, имащи роля в патологиите, които повлияват. Освен това е необходима прецизна оценка на ADME/Tox свойствата на силимарина, чрез която да се вземат предвид възможните вариации в бионаличността, метаболитните трансформации и профила на безопасност на отделните флавонолигнани в състава на силимарина, тъй като е доказано, че те са отговорни за различни ефекти, независими от основния компонент, силибин. Стереохимията също играе важна роля за биологичните активности на флавонолигнаните и е отчетена нужда от изследвания на чистите форми на съединенията, които се прилагат терапевтично като смеси (Křen 2021). В тази връзка интегрирането на *in silico* подходи в изследванията на силимарина може да бъде особено полезно, тъй като те позволяват работа с индивидуални химични съединения, осигурявайки надеждни стратегии за по-добро разбиране на фармакологичните свойства на флавонолигнаните, спестявайки разходи и време. *In silico* предсказванията са доказали своя потенциал в изучаването на взаимодействия на ПП с таргетни молекули и при оценката на ADME/Tox свойствата им в множество проучвания. Разнообразните *in silico* подходи могат да се прилагат на различни етапи от изследването на ПП преди или успоредно с *in vitro* и *in vivo* методите. Те са особено ценни при формулирането на механистични обяснения на очакваните и наблюдавани ефекти на молекулно и атомно ниво. Разнообразието от налични *in silico* методи може да се прилага в комбинации с експериментални техники за по-ефективно извличане на нови знания за свойствата и механизмите на действие на ПП и за подпомагане на рационалния дизайн на нови лекарства, базирани на ПП.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ЦЕЛ

Целта на дисертационния труд е да се оценят ADME/Tox свойства и да са изяснят механизми на действие, свързани с потенциални фармакологични ефекти на флавонолигнани от *Silybum marianum*.

ЗАДАЧИ

1. Изследвания на ADME/Tox свойства на флавонолигнани от *Silybum marianum*.

1.1. *In vitro* и *in silico* оценка на гастроинтестинална абсорбция.

1.2. *In silico* предсказване на токсичност и метаболизъм.

1.3. Молекулно моделиране на взаимодействия човешки естрогенов рецептор алфа (ER α).

2. Изследвания на взаимодействия на флавонолигнани от *Silybum marianum* с нови таргетни протеини.

2.1. Оценка на сходство между избрани флавонолигнани и лекарствени молекули с известен механизъм на действие.

2.2. Подбор на потенциални общи таргетни протеини за лекарствата и изследваните флавонолигнани.

2.3. Молекулно моделиране на взаимодействия с подбраните протеини.

2.4. *In vitro* изследвания на ефектите на флавонолигнаните върху механизми, включващи подбраните протеини.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. МЕТОДИ

1.1. PAMPA.

Проведени са DS-PAMPA (Avdeef 2012) измервания чрез системата PAMPA Explorer Test, Pion Inc. Измерванията са проведени при pH 5.0, 6.2, и 7.4 в донорния компартмент за да се имитират *in vivo* условията на повърхността на стомашно-чревния тракт.

1.2. QSAR моделиране за предсказване на PAMPA пермеабилитет.

Структурната информация за съединенията, използвани за разработването на QSAR модела, е получена от NCI/CADD Chemical Identifier Resolver и от NCBI PubChem Project. Молекулните дескриптори (logD при pH 7,4), са изчислени със софтуера ACD/Percepta и изчислителните инструменти на ChemAxon Marvin v. 14.8.25 (<http://chemaxon.com>). Дескрипторите, свързани с молекулния размер са изчислени с KNIME-integrated Chemistry Development Kit (CDK, v. 1.5.1) and Indigo (v. 1.1.4) nodes. Множествените линейни регресионни модели са изведени и обработени в платформата за анализ KNIME v. 2.12.2 (<http://www.knime.com>).

1.3. Експертни системи, базирани на знания, за предсказване на токсичност и метаболизъм.

Предсказванията на токсичност и метаболизъм на изследваните флавонолигнани са проведени с помощта на базирани на знания експертни системи Derek Nexus v.5.0.1 и Meteor Nexus v.3.0.0 (Lhasa Ltd.).

1.4. Молекулно моделиране.

1.4.1. Молекулно моделиране на взаимодействията на флавонолигнаните с човешкия естрогенов рецептор алфа (ER α).

Софтуерните програми MOE 2015.10 (Montreal, Canada) и GOLD v. 5.1 (Cambridge Crystallographic Data Centre Ltd.) са използвани за докинг изследвания, анализ и сравнение на протеин-лигандни взаимодействия и идентифициране на важни аминокиселинни остатъци.

1.4.2. Молекулно моделиране на взаимодействията на флавонолигнани с нови таргетни протеини.

Инструментите Flexible Alignment и Surfaces and Maps в софтуера MOE 2016.08 са използвани за първоначална оценка на сходството между биоактивните конформации на избрани лекарства и силибините, използвайки атом-базирани свойства и анализ на молекулни повърхности.

Химическото сходство между стереомерите на силибин и дехидросилибин и одобрени лекарства от базата данни на DrugBank (Wishart 2006) е оценено със софтуера ROCS (Rapid Overlay of Chemical Structures) (OpenEye 2019.05, Santa Fe, NM, USA).

Софтуерът Molecular Operating Environment (MOE 2019.0102) (Montreal, Canada) е използван за докинг изследвания в джоба на свързване на SMO (PDB ID: 5L7I, Структура на Smoothened в комплекс с висмодегиб, верига A) и BRAF киназа (PDB ID: 4RZV, структура на мономер на BRAF (R509H) киназен домен, свързан с вемурафениб, верига A).

1.5. *In vitro* изследвания на взаимодействия на флавонолигнаните с подобрени таргетни протеини на противоракови лекарства.

Следните *in vitro* методи са използвани за изследване на потенциала на флавонолигнаните да взаимодействат с избрани таргетни протеини на противотуморни лекарства:

- Анализ на влиянието върху активността на BRAF киназата
- Анализ за цитотоксичност
- HH-зависим луцифреразен репортерен анализ
- BODIPY-Циклопамин анализ

In vitro изследванията са проведени в колаборация с Департамент Инфекциозна Микробиология, Институт по Микробиология “Стефан Ангелов” и Катедра по биотехнологии, химия и фармация, Университет на Сиена.

2. МАТЕРИАЛИ И ДАННИ

2.1. PAMPA.

Седем съединения, предоставени от Лаборатория по биотрансформации, Институт по микробиология, Чешката академия на науките, са изследвани *in vitro*: силибин АВ (Biedermann et al. 2014), изосилибин А (Gažák, Fuksová, et al. 2013), силикристин А, силидианин (Křenek et al. 2014), 2-3-дехидросилибин АВ (Gažák et al. 2011), таксифолин и кверцетин. Този набор от съединения е целенасочено избран, за да бъде направен анализ на структурните характеристики и физико-химичните свойства, които могат да повлияят пермеабилитета. Чистотата на флавонолигнаните е над 96% (HPLC/PDA), а на таксифолина и кверцетина над 99% (Sigma-Aldrich).

2.2. QSAR моделиране за предсказване на PAMPA пермеабилитет.

QSAR моделът използва данни от DS-PAMPA за 269 съединения, събрани от "Database of Double-Sink PAMPA log P₀, log P_m^{6.5}, and log P_m^{7.4}" (Avdeef 2012) и изразени като стойности на ефективен мембранен пермеабилитет (logPe).

Структурите и SMILES кодовете на 31 производни на силибин, чиито PAMPA пермеабилитет е предсказан *in silico* (Džubák et al. 2006; Gažák et al. 2009; 2011; Kosina et al. 2002), са представени в Приложение 2 на дисертацията.

2.3. *In vitro* изследвания на взаимодействия на флавонолигнаните с подобрени таргетни протеини на противоракови лекарства.

Четири съединения, предоставени от Лаборатория по биотрансформации, Институт по микробиология, Чешка академия на науките, са изследвани *in vitro*: силибин А, силибин В (Biedermann et al. 2014), 2,3-дехидросилибин А и 2,3 -дехидросилибин В (Gažák, Trouillas, et al. 2013). Изследвани са оптично чисти диастереоизомери, тъй като е доказано, че стереохимията има ключова роля за биологичните активности на флавонолигнаните (Gazak, Walterova и Kren 2007; Diukendjieva et al. 2017). Чистотата на флавонолигнаните е над 96% (HPLC/PDA).

1. Изследвания на ADME/Тох свойства на флавонолигнани от *Silybum marianum*.

Въпреки широката терапевтична употреба на силибина и неговите производни, много от техните ADME/Тох свойства не са добре изучени. Целта на проучванията в този раздел адресира този недостиг на информация чрез комбиниране на *in vitro* и *in silico* методи за оценка на стомашно-чревна абсорбция, токсични ефекти и метаболизъм на ПП от *Silybum marianum* и техни производни. Стомашно-чревната абсорбция на основните компоненти на силимарина, както и на някои структурно подобни флавоноиди, е оценена чрез РАМРА измервания. Направена е *in silico* оценка на стомашно-чревна абсорбция за по-широк набор от производни на силибина, използвайки QSAR модел за предсказване на РАМРА пермеабилитет. Проведени са предсказания за токсичност и метаболизъм с помощта на експертни системи, базирани на знания, и са използвани методите на молекулно моделиране, за да се разкрият разлики във взаимодействията на стереоизомерните форми на силибина с лиганд-свързващия домен на човешкия естрогенен рецептор алфа (ER α).

1.1. РАМРА пермеабилитет.

1.1.1. Измерване на РАМРА пермеабилитет.

Съединенията, за които са проведени измервания на РАМРА пермеабилитет, са избрани целенасочено въз основа на тяхното съдържание в растителния екстракт от *Silybum marianum* и структурните им характеристики: силибин АВ (Biedermann et al. 2014), изосилибин А (Gažák, Fuksová, et al. 2013), силикрестин А и силидианин (Křenek et al. 2014) са основните компоненти на *Silybum marianum*; 2-3-дехидросилибин АВ (Gažák, Trouillas, et al. 2013) е производно на силибина, но се среща и в силимарина със съдържание до 1–2% (Chambers et al. 2017); таксифолинът и кверцетинът са структурно идентични с флавоноидната част на силибин и дехидросилибин, съответно, и се съдържат в много други плодове, зеленчуци, листа и зърна.

Стойностите на ефективен мембранен пермеабилитет (logP_e) на изследваните съединения са представени в Таблица 1. Проведени са измервания при рН 5,0, 6,2 и 7,4 в донорния компартмент, за да се имитират *in vivo* условията на повърхността на стомашно-чревния тракт (Waterbeemd, Lennernäs и Artursson 2003). Наблюдава се добро

съответствие между стойностите на $\log P_e$ за силибин и кверцетин, докладвани от Avdeef (2012) и тези, измерени в настоящите изследвания: $-5,08$ спрямо $-5,25 \pm 0,05$ за силибин и $-4,77$ спрямо $-5,02 \pm 0,07$ за кверцетин ($pH=7,4$).

Таблица 1. Ефективен мембранен пермеабилитет, $\log P_e \pm$ стандартно отклонение за изследваните съединения. Стойностите на стандартното отклонение са изчислени въз основа на 3 паралелни експеримента.

	pH	5.0	6.2	7.4
Съединение				
Силибин АВ		-4.11 ± 0.03	-4.14 ± 0.03	-5.25 ± 0.05
2,3-дехидросилибин АВ		-4.11 ± 0.06	-4.17 ± 0.03	-4.06 ± 0.03
Изосилибин А		-4.32 ± 0.09	-4.31 ± 0.06	-5.19 ± 0.02
Силикристин А		-6.14 ± 0.08	-6.09 ± 0.05	-6.75 ± 0.11
Силидианин		-5.76 ± 0.05	-5.79 ± 0.04	-6.64 ± 0.09
Таксифолин		-5.95 ± 0.10	-5.93 ± 0.02	-5.23 ± 0.01
Кверцетин		-5.14 ± 0.42	-5.10 ± 0.17	-5.02 ± 0.07

Според класификационния праг за висок/нисък-до-умерен пермеабилитет спрямо стойности по-високи или по-ниски от $\log P_e = -6$ и на база получените стойности от измерванията, основният активен компонент на *Silybum marianum*, силибин, неговото 2,3-дехидро-производно и изосилибин А могат да се считат за добре преминаващи в стомашно-чревния тракт. Флавоноидите таксифолин и кверцетин демонстрират подобен профил на пермеабилитет. Силидианин и силикристин А, следващите най-разпространени флавонолигнани след силибина, се характеризират с по-ниски стойности на $\log P_e$, което предполага по-ниска абсорбция в стомашно-чревния тракт.

Резултатите показват изменение в профилите на пермеабилитет на съединенията в зависимост от тяхната структура, която се влияе допълнително от pH. Наблюдава се разлика от повече от една логаритмична единица в $\log P_e$ при pH 7,4 между силибин и дехидросилибин, но не се наблюдава значителна вариация при pH 5,0 и/или 6,2. Разликата в стойностите на пермеабилитет между таксифолин и кверцетин, обаче, е по-голяма при по-ниски pH стойности (6,2 и 5,0). Може да се приеме, че дехидрогенирането във флавоноидната част от структурата на флавонолигнаните повишава пермеабилитета на флавонолигнаните при pH 7,4, но не влияе на пермеабилитета на флавоноидите

(кверцетин и таксифолин), което вероятно се дължи на лигнанната част, която отсъства в таксифолина и кверцетина. По отношение на влиянието на изомерията, сравнението на стойностите на пермеабилитет за силибин и изосилибин не показва значителна разлика с промяна в рН.

Анализът на зависимостта на пермеабилитет на отделните съединения от рН показва други тип вариации. За силибин, изосилибин А, силикрестин А и таксифолин има разлика от приблизително една логаритмична единица между стойностите на $\log P_e$, измерени при рН 6,2 и 7,4 (Таблица 1). Въпреки това, такава разлика не се наблюдава за дехидросилибин и кверцетин. Възможно е тези вариации може да са свързани със йонизацията на съединенията, оказваща влияние върху съотношението между техните неутрални и йонизирани форми и по този начин – върху техния пермеабилитет. Като индикатор за относителна йонизация, която би повлияла пасивната дифузия, са изчислени стойностите на рКа на съединенията чрез софтуера ACD/Percepta. Най-ниските изчислени рКа стойности варират между 6,3 и 7,4, което означава, че при рН 7,4 делът на техните йонизирани форми е по-висок в сравнение с този при рН 6,2 и това може да доведе до по-нисък пермеабилитет на съединенията. Такава тенденция обаче не се наблюдава. Следователно изчислените рКа стойности не биха могли самостоятелно да обяснят рН-зависимия профил на $\log P_e$ стойностите на изследваните съединения.

1.1.2. QSAR модел за предсказване на PAMPA пермеабилитет.

За предсказване на PAMPA пермеабилитета на експериментално изследваните съединения, в допълнение на 31 експериментално неизследвани флавонолигнани, е използван QSAR модел за предсказване на PAMPA пермеабилитет. Моделът, разработен в рамките на инициативата SEURAT-1 (<https://www.seurat-1.eu/>) и проекта COSMOS (COSMetics to Optimize Safety, <https://www.seurat-1.eu/pages/cluster-projects/cosmos.php> – последен достъп на 17 юли 2023 г.), включва и *in silico* проучвания на стомашно-чревна абсорбция на биоактивни вещества. Моделът е целенасочено разработен с дескриптори, изчислени чрез инструменти с отворен код, софтуерни инструменти, или онлайн ресурси със свободен достъп (Cronin et al., 2012) и е включен в базата данни за алтернативни методи на референтната лаборатория на Европейския съюз за алтернативи на опитите с животни (https://jeodpp.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURLECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM_docs/176_M_PAMPA.pdf - последен достъп на 17 юли 2023 г.).

Моделът използва данни от DS-PAMPA измервания (Avdeef, 2012), получени при еквивалентни условия на тези, при които са проведени изследванията в дисертацията. Наборът от данни за 269 съединения се характеризира с широко разпределение на стойностите на P_e . Sink условията на DS-PAMPA (понижаване на активната концентрация на изследваното вещество в акцепторния компартмент) в комбинация с контролиране на дебелината на водния граничен слой (ABL) (40-60 μm дебелина на ABL, постигнат чрез разбъркване в янките) позволяват елиминиране на нелинейността на данните за P_e в широк диапазон на липофилност.

Молекулни дескриптори, подобни на тези, предложени от Kansy et al. 2001 – проявяващият се коефициент на разпределение в октанол/вода ($\log D$) и съотношението на полярната към общата молекулна повърхностна площ (PSA/TSA) – са използвани в QSAR модела. Предсказания за стойностите на $\log D$ са достъпни чрез онлайн ресурсите <http://www.chemspider.com> (изчислени от ACD/Percepta за съединения, включени в базата данни ChemSpider) или чрез <http://chemicalize.com> (изчислени от инструменти на ChemAxon за всяко съединение). Замяната на съотношението PSA/TSA би позволила изчисляването на всички дескриптори със свободно достъпни софтуерни инструменти. Затова PSA е заменен от TPSA (топологична полярна повърхностна площ) (Ertl, Rohde и Selzer 2000). Като се има предвид, че молекулното тегло (MW) е фундаментален дескриптор, описващ молекуления размер и че статистическите параметри на моделите, които го използват, са сред най-добрите, MW е избран като дескриптор, който да замени TSA . Двете реализации на модела, базирани на $\log D$ при pH 7,4, изчислен от инструментите ACD/Percepta или ChemAxon, са представени, съответно, в следните уравнения:

$$\log P_e = -2.20(\pm 0.21) + 0.49(\pm 0.04)\log D - 10.14(\pm 0.74)\text{TPSA}/\text{MW}$$

$$n = 251, R^2 = 0.75, \text{SEE} = 1.10, F = 371.3,$$

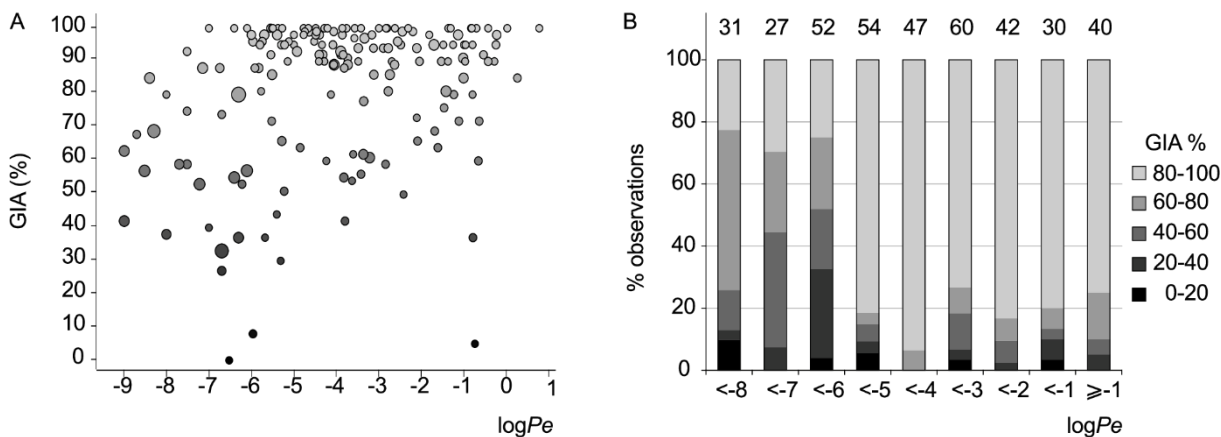
$$\text{LOO } Q^2 = 0.74, \text{външно валидиране } Q^2 = 0.79 \text{ (200 обучение/51 тест)}$$

$$\log P_e = -2.11(\pm 0.22) + 0.47(\pm 0.05)\log D - 10.71(\pm 0.78)\text{TPSA}/\text{MW}$$

$n = 248, R^2 = 0.74, SEE = 1.11, F = 345.1,$

LOO $Q^2 = 0.73,$ външно валидиране $Q^2 = 0.77$ (198 обучение/50 тест)

Способността на моделите да предсказват стомашно-чревна абсорбция е оценена чрез класификация на външен набор от данни (достъпен на http://biomed.bas.bg/qsar/mm/Human_intestinal_absorption_and_bioavailability/) за 783 съединения (1227 различни стойности) с докладвани стойности за стомашно-чревна абсорбция, събрани от литературата, като 167 от тях (383 отделни стойности за стомашно-чревна абсорбция) със стойности за DS-PAMPA P_e в рамките на набора данни, използван за изграждане на QSAR модела. Събраните данни не разграничават ниска и умерена стомашно-чревна абсорбция, поради ниския процент на съединения с такъв тип стойности (Фигура 2A). Въпреки това, дела на съединенията с най-високи стойности за стомашно-чревна абсорбция (>80%) рязко спада в групите съединения със стойности за PAMPA $\log P_e$ по-ниски от -6 (Фигура 2B), което потвърждава препоръката, докладвана в Avdeef (2012), за използване на прага $\log P_e < -6$ за разграничаване на съединения с ниски стойности за стомашно-чревна абсорбция. Моделът класифицира останалите 616 съединения в класове с високи или умерени-до-ниски стойности за стомашно-чревна абсорбция с добра точност, чувствителност и специфичност на изчислената класификация (Таблица 2).



Фигура 2. Съответствие между стойностите на $\log P_e$ и стомашно-чревна абсорбция, GI A (%), за 167 съединения, присъстващи както в наборите от данни със стойности за PAMPA P_e , така и със стойности за стомашно-чревна абсорбция: A – средни стойности на стомашно-чревна абсорбция спрямо стойности на PAMPA $\log P_e$; размерът на кръговете съответства на броя на осреднените стойности на стомашно-чревна абсорбция за съединение. B – разпределение на класовете стойности на GI A сред класовете

стойности на PAMPA Pe (числата в горната част на колоните съответстват на броя на отделните стойности на GIA във всеки клас с PAMPA Pe стойности).

Таблица 2. Статистически параметри за класификационната способност на PAMPA Pe стойностите, предсказани от модели, базирани на TPSA/MW, по отношение на стомашно-чревна абсорбция.

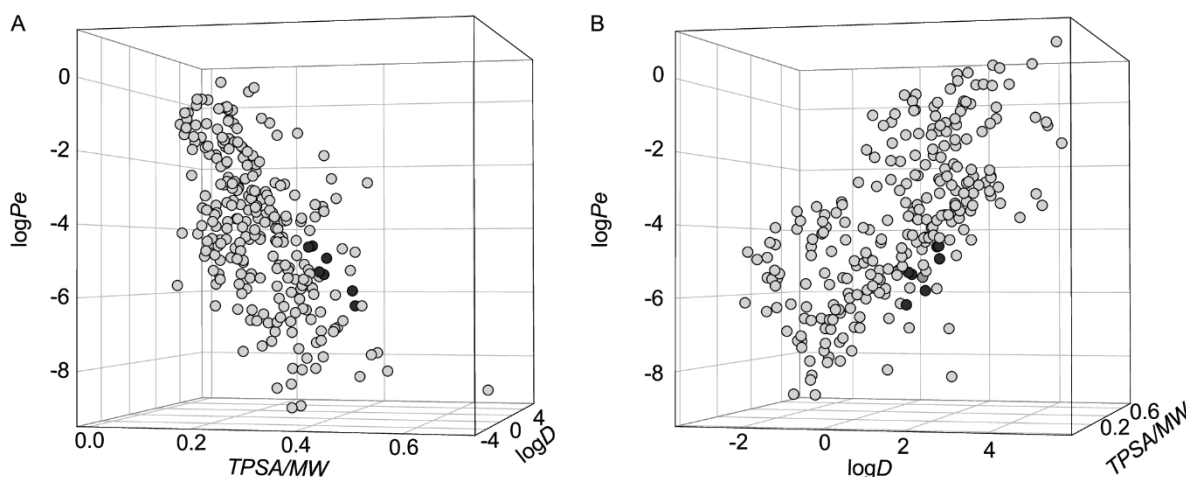
Имплементация на модела	Точност	Чувствителност	Специфичност	% аутлаери
ACD/Percepta-изчислен logD	76.1	83.9	58.3	11.6
ChemAxon -изчислен logD	77.1	84.4	60.0	14.6

1.1.3. *In silico* предсказване на PAMPA пермеабилитет.

QSAR моделът е използван за предсказване на PAMPA пермеабилитет на експериментално тестваните съединения в допълнение към 31 експериментално неизследвани флавонолигнани. Резултатите от *in silico* предсказванията, получени с помощта на модела QSAR за PAMPA пермеабилитет, за съединенията, изследвани *in vitro*, са представени в Таблица 3. Фигура 3 представя техните позиции в пространството, определено от физико-химичните параметри, включени в модела, за съединения от набора данни, използван за изграждане на QSAR модела. Фигурата показва, че съединенията попадат в областта на приложимост на модела, като по този начин се потвърждава надеждността на предсказванията.

Таблица 3. Изчислени молекулни дескриптори и logPe стойности, предсказани от QSAR модела за изследваните флавоноиди.

Съединение	log D при pH 7.4	TPSA/MW	Предсказан log Pe
Силибин АВ	1.77	0.322	-4.60
2,3-дехидросилибин АВ	1.03	0.331	-5.06
Изосилибин А	1.82	0.322	-4.57
Силикрестин А	1.70	0.345	-4.86
Силидианин	1.03	0.338	-5.12
Таксифолин	1.15	0.419	-5.89



Фигура 3. 3-D графики на експериментално получените стойности на $\log Pe$ спрямо стойностите на изчислените структурни дескриптори TPSA/MW (A) и $\log D$ при pH 7,4 (B), използвани в ACD/Percepta реализацията на модела, за набора от съединения, използвани за изграждане на QSAR модела (°) и предсказаните стойности за флавоноидите (•). Интервалите на параметрите са: $-9 \div 0,78$ за $\log Pe$; $0,011 \div 0,695$ за TPSA/MW и $-3,16 \div 5,51$ за $\log D$ (pH 7,4).

Въз основа на доброто съответствие между наблюдаваните и изчислени стойности за пермеабилитет на производните на силибина (силибин АВ, дехидросилибин АВ и изосилибин А), е предсказан пермеабилитетът на още 31 производни на силибина, със структури, подобни на тези на изследваните силибини. По-голямата част от съединенията се характеризират със стойности на $\log Pe$ между -4 и -5, което ги класифицира като добре преминаващи стомашно-чревния тракт.

1.2. Биотрансформации и токсични ефекти.

1.2.1. *In silico* предсказвания на токсичност и метаболизъм.

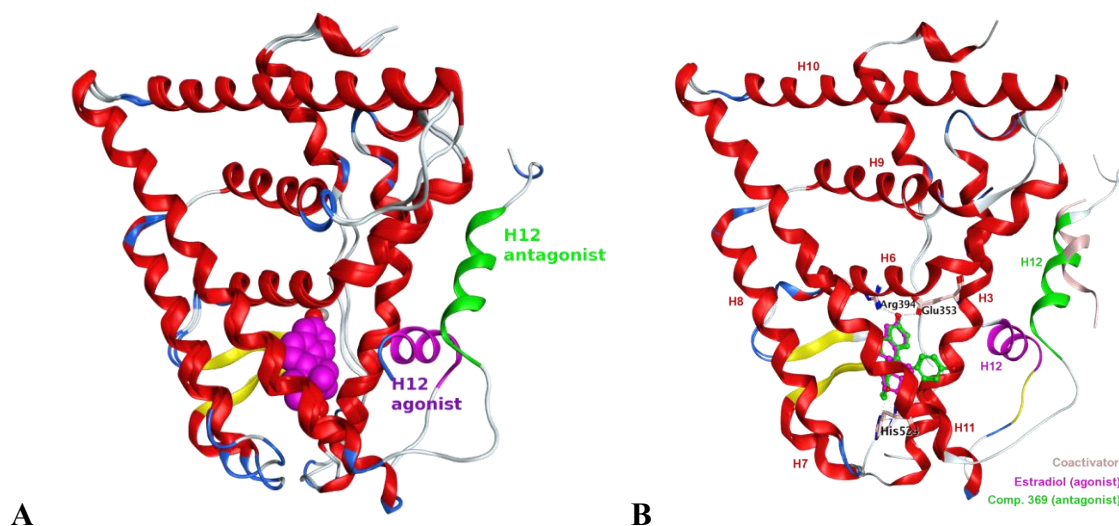
Предсказванията на токсичност и метаболизъм за избрани флавонолигнани (силибин АВ, изосилибин А, силикристин А и силидианин, които са основните компоненти на *Silybum marianum* и 2-3-дехидросилибин АВ, който се среща в силимарина като второстепенен компонент – до 1–2% , но е отговорен за специфични биологични активности) са проведени с помощта на експертните системи, базирани на знания, Derek Nexus и Meteor Nexus (Marchant, Briggs и Long 2008).

Въз основа на токсикофорите, идентифицирани в структурите на флавонолигнаните, са очертани три потенциални токсични ефекта при бозайници (хромозомно увреждане *in vitro*, ER α модулация и кожна сенсibiliзация) и един потенциален токсичен ефект при бактерии (мутагенност *in vitro*). Докладваните токсични ефекти са оценени с ниво на вероятност „правдоподобни. Извършени са допълнителни изследвания на модулацията на естрогенния рецептор алфа от флавонолигнаните и резултатите са докладвани в раздел 1.2.2. Този ефект е избран за по-подробни проучвания, тъй като се характеризира с добре дефинирана крайна точка, включваща единичен таргетен протеин, което го прави особено подходящ за докинг изследвания. Този тип изследвания позволяват да се анализират възможни стереоспецифични ефекти, което не е възможно чрез софтуера Derek Nexus.

Meteor Nexus е използван като инструмент, който предсказва метаболизма на дадено химично съединение на база на неговата структура (Langowski and Long 2002). Двете най-вероятни метаболитни трансформации за флавонолигнаните, предсказани от Meteor, използващ експериментални данни за съединения, които се характеризират със същите биотрансформации, имат сходни молекулни тегла и са химически подобни на изследваните съединения, са глюкурониране и окислително *O*-деметиране.

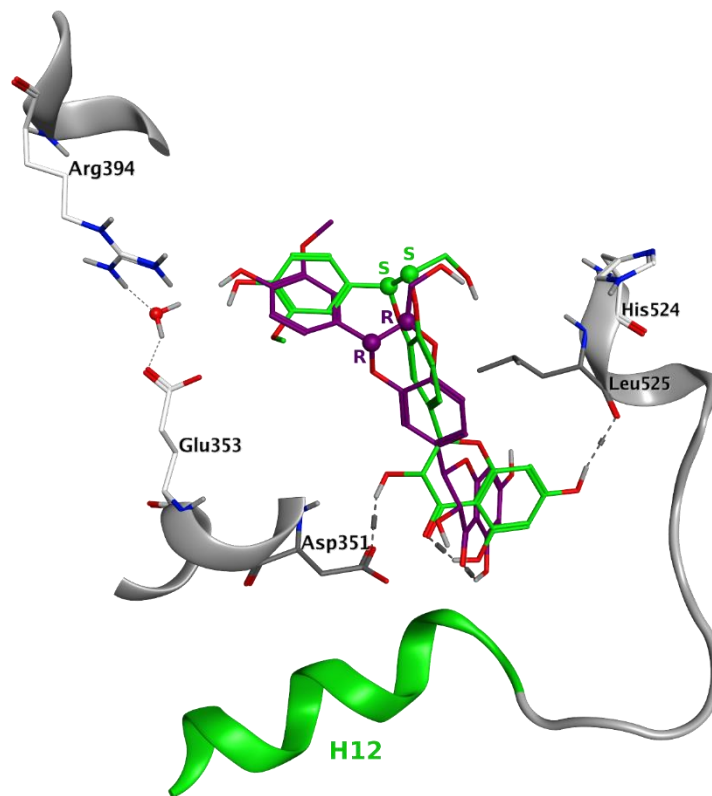
1.2.2. Молекулно моделиране на взаимодействията с човешки естрогенов рецептор алфа (ER α).

Взаимодействията на стереоизомерните форми на основния компонент на *Silybum marianum*, силибин, с лиганд-свързващия домен (LBD) на ER α , са изследвани чрез докинг на изомерните форми, силибин А и силибин В. Известно е, че агонистите и антагонистите стабилизират различни позиции на спиралата H12 в С-края на LBD, което има решаваща роля за взаимодействията на ER α с коактиватори и корепресори (Ascenzi, Vocedi и Marino 2006). Конформация на LBD с антагонист в активното място (с позиция на H12 в зелено, Фигура 4) е избрана за докинг на силибините, тъй като конформацията на агониста (позиция H12 в магента, Фигура 4) не е достатъчно голяма, за да побере молекулите на силибините (генерираните пози са с нереалистични конформации на съединенията, данните не са показани).



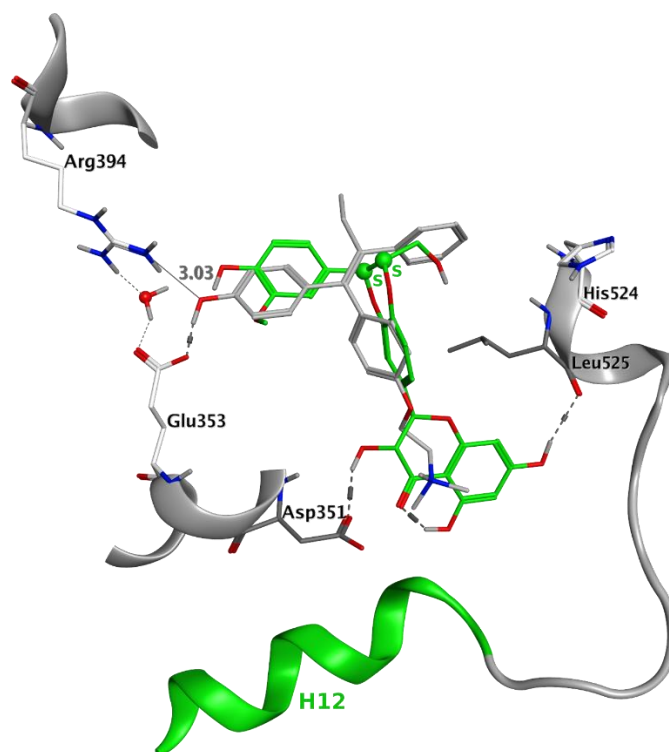
Фигура 4. LBD на ER α с (A) пълният агонист естрадиол в активното място, показан в „space-filled rendering“ и оцветен в розово; (B) пълният агонист естрадиол (розово) и антагонист (зелено). Позиции на спиралата H12: агонистична конформация (магента); антагонистична конформация (зелено).

Този избор е допълнително аргументиран чрез анализ на кристалографски комплекси на ER α с частични агонисти в Protein Data Bank (PDB) (Berman 2000), който показва свързване на частични агонисти с антагонистичните конформации на ER α . Резултатите от докинга демонстрират, че както силибин А, така и силибин В могат да окупират активното място на ER α , но стереоизомерите заемат различни пози и осъществяват специфични взаимодействия в активното място на рецептора. Резултатите, получени от докинг със софтуера MOE, не разкриват специфични взаимодействия на силибин А с аминокиселини в активното място на ER α (Фигура 5). За разлика от него, силибин В образува водородни връзки с Leu525 и Asp 351 (Фигура 5). Leu525 е разположен в съседство с His524, която е една от аминокиселините, участващи във взаимодействията на агониста на ER α , естрадиол.



Фигура 5. Пози на силибин А (лилаво) и силибин В (зелено) и взаимодействия чрез водородни връзки на силибин В в активното място на ER α . R- и S-стереоатомите на съединенията са показани като топки; кислородният атом на водната молекула в активния център е показан като червена топка.

За разлика от агониста естрадиол и антагониста 4-хидрокситамоксифен (Фигура 6), силибин В не взаимодейства директно с Glu353 и Arg394, но остава близо до тях и до активната водна молекула (разстоянията не са показани). Подобно на антагониста 4-хидрокситамоксифен, силибин В взаимодейства с Asp351 (Фигура 6).



Фигура 6. Позии на 4-хидрокситамоксифен и силибин В (зелено) и техните взаимодействия в активното място на ER α .

Резултатите от докинг изследванията показват стереоспецифични взаимодействия на силибин А и силибин В в активното място на ER α , независимо от ориентацията на стереоатомите 10R/11R и 10S/11S в активното място (в посока на H12 или обратно). Специфичните взаимодействия на силибин В в най-добрите докинг пози възпроизвеждат някои от взаимодействията, наблюдавани за агонистите и някои от взаимодействията на антагонистите.

Резултатите от докинга обясняват разликите във взаимодействията на стереоизомерните форми на силибина с ER α и експериментално наблюдаваните ефекти спрямо ER α , според които силибин В е отговорен за парциалната ER α -медирана активност на силимарина (Plíšková et al. 2005).

1.3. Заключение.

В настоящите проучвания е използван РАМРА методът за оценка на мембрания пермеабилитет на основните компоненти на *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Разработен е QSAR модел за РАМРА, който е използван в комбинация с *in vitro* резултати за предсказване на стомашно-чревна абсорбция на основните компоненти на активния екстракт от *Silybum marianum* и техни производни. QSAR моделът използва дескриптори,

изчислени чрез инструменти с отворен код, софтуерни инструменти или онлайн ресурси със свободен достъп, което го прави подходящ за по-широко приложение. Моделът е свободно достъпен чрез базата данни за алтернативни методи на референтната лаборатория на Европейския съюз за алтернативи на опитите с животни.

Според резултатите, получени чрез *in vitro* и *in silico* изследванията, по-голямата част от изследваните флавонолигнани са добре преминаващи през стомашно-чревния тракт, което е предпоставка за добра бионаличност. На база на оценката за пермеабилитет на изследваните флавоноиди, те са идентифицирани като подходящи водещи структури за целите на лекарствения дизайн. Резултатите потвърждават, че комбинираният интердисциплинарен подход, базиран на *in silico* предсказания чрез докладвания QSAR модел и *in vitro* ПАМРА измервания, може да се използва за предварителна оценка на стомашно-чревна абсорбция на биоактивни съединения, включително ПП.

Очертани са четири потенциални токсични ефекта и две най-вероятни метаболитни трансформации на основните компоненти на *Silybum marianum*, както и възможни ориентации и взаимодействия на стереоизомерните форми на силибина в активното място на ER α , които са в съответствие и обясняват стереоспецифични ефекти, изследвани експериментално.

Докладваните данни за ADME/tox свойства за флавонолигнаните могат да се използват за целите на рационалния дизайн на производни на ПП с потенциални нови или подобрени здравни ползи.

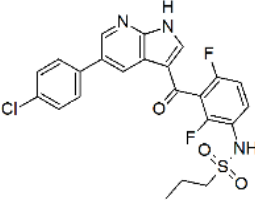
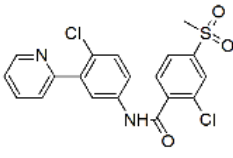
2. Идентифициране на нови фармакологични таргетни протеини на флавонолигнани от *Silybum marianum* и изследвания на молекулните им взаимодействия.

Широкият спектър от биологични активности на компонентите на силимарина предполага техния потенциал като водещи структури за целите на лекарствения дизайн в контекста на комплексни патологии. За силибините и техните 2,3-дехидро производни е доказано, че притежават противотуморна активност, но механизмите им на действие не са достатъчно изяснения. Проучванията в настоящия раздел комбинират *in silico* и *in vitro* методи, с цел да бъдат изследвани възможни взаимодействия на флавонолигнани от *Silybum marianum* с таргетни протеини, имащи роля в разработването на противотуморни терапии.

2.1. Подбор на потенциални нови таргетни протеини на флавонолигнани, базиран на химическо сходство с одобрени лекарства.

Химическото сходство между стереоизомерите на силибин и дехидросилибин и одобрени лекарства от базата данни DrugBank е оценено с помощта на софтуера ROCS (OpenEye) (Hawkins, Skillman и Nicholls 2007). Индексът TanimotoCombo (TCI) е използван като показател за сходство във формата и химическите характеристики след суперпозиране на молекулите на силибина и дехидросилибина върху тези на лекарствата. Като се има предвид доказаният противотуморен ефект на флавонолигнаните, структурното и химическо сходство молекулите им с тези на клинично прилагани лекарства с антитуморна активност, е от особен интерес за предсказване на механизма на действие на природните съединения. За тази цел са подбрани и анализирани противотуморни лекарства, за които сходството с изомерите на силибин и дехидросилибин е оценено с $TCI \geq 0,9$ (Таблица 4). Вемурафениб е одобрен за лечение на метастатичен меланом като конкурентен инхибитор на ензима BRAF киназа с V600E мутация, (заместване на глутаминова киселина с валин) (Luke and Hodi 2012). Висмодегиб селективно се свързва и инхибира трансмембрания рецептор SMO, upstream регулатор на Hedgehog (HH) сигналния път, одобрен от FDA за лечение на метастатичен или локално авансирал базалноклетъчен карцином (Sandhiya et al. 2013). Резултатите получени със софтуера ROCS показват по-високи стойности на TCI за дехидросилибините в сравнение със силибините по отношение както на вемурафениб, така и на висмодегиб.

Таблица 4. TanimotoCombo индекси за противотуморни лекарства, чието сходство със стереоизомерите на силибин и дехидросилибин е по-високо от 0,9

	Вемурафениб	Висмодегиб
		
	Tanimoto-Combo индекс	
Силибин А	0.963	0.962
Силибин В	0.943	0.962

Дехидросилибин А	0.976	0.979
Дехидросилибин В	0.963	0.979

Въз основа на наблюдаваното сходство, може да се направи предположението, че изследваните флавонолигнани могат да взаимодействат със същите таргетни протеини, с които взаимодействат противотуморните лекарства. За да се изследва тази хипотеза, потенциалните взаимодействия с таргетните протеини на вемурафениб и висмодегиб, SMO и BRAF киназа, са допълнително изследвани с *in silico* методи.

2.2. Молекулно моделиране.

2.2.1. Анализ на форма и свойства на молекулни повърхности.

Анализът на сходство във формата и свойствата на молекулни повърхности, генерирани чрез гъвкаво суперпозиране на силибин А, В и вемурафениб, и силибин А, В и висмодегиб, разкри, че и двата стереоизомера показват сходни резултати при гъвкавото суперпозиране върху биоактивните конформации на вемурафениб и висмодегиб. Резултатите от суперпозирането с най-добри стойности показват стереоспецифична ориентация на силибините върху вемурафениб, но не и върху висмодегиб. Съответствието между повърхностните свойства на силибините е по-добре изразено за вемурафениб, а съответствието на формата е по-добре изразено за висмодегиб.

Гъвкавото суперпозиране и сходство между молекулните свойства на изомерите на силибина и лекарствените лиганди на BRAF киназата (вемурафениб) и SMO (висмодегиб) предполагат възможността силибините да взаимодействат с тези таргетни протеини.

2.2.2. Докинг изследвания в SMO и BRAF киназата.

Докинг симулациите са проведени с кристалографски структури с висока разделителна способност на протеиновите таргетни протеини на висмодегиб (SMO) и вемурафениб (BRAF киназа), налични в Protein Data Bank (PDB ID 5L7I и 4RZV, съответно). Резултатите от докинга демонстрират, че силибините и дехидросилибините могат да бъдат окупират местата на свързване на изследваните таргети. Докинг позите са допълнително анализирани спрямо най-доброто съответствие между флавонолигнаните и лигандите в джобовете на протеините и техните енергии на взаимодействие с рецептора. Резултатите са обобщени в Таблица 5. Най-добрите пози на дехидросилибините се характеризират с по-добри резултати от докинга в сравнение със силибините и в двата

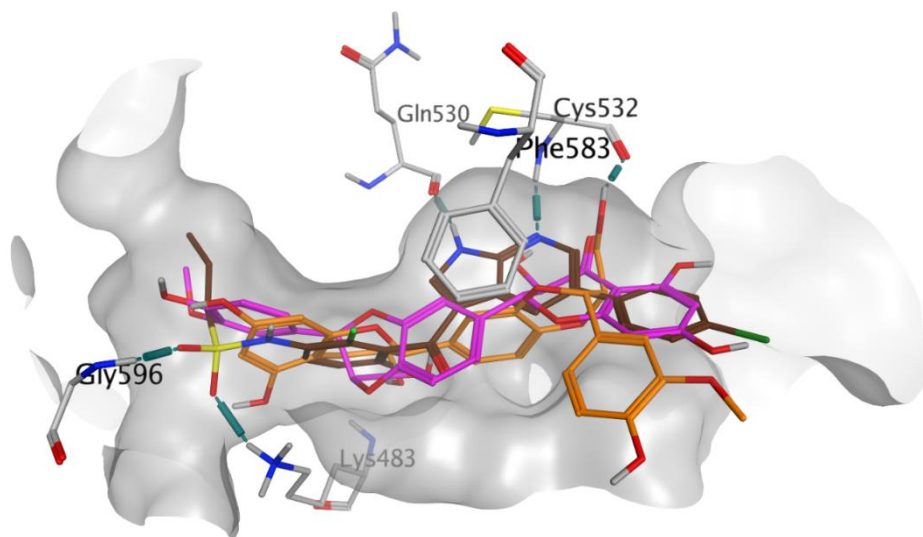
рецептора. За BRAF киназата резултатът от докинга на дехидросилибин В е най-нисък (-8,354), в сравнение с другите флавонолигнани, въпреки че е по-висок от резултата, получен при редокинг на вемурафениб. По отношение на SMO, дехидросилибин А и дехидросилибин В имат най-ниски резултати от докинга, сравними с тези на висмодегиб.

Таблица 5. Докинг резултати (docking scores, kcal/mol) за силинимите, дехидросилибините, вемурафениб и висмодегиб (докинг в BRAF киназа и SMO; по-ниските резултати означават по-високи афинитети на свързване).

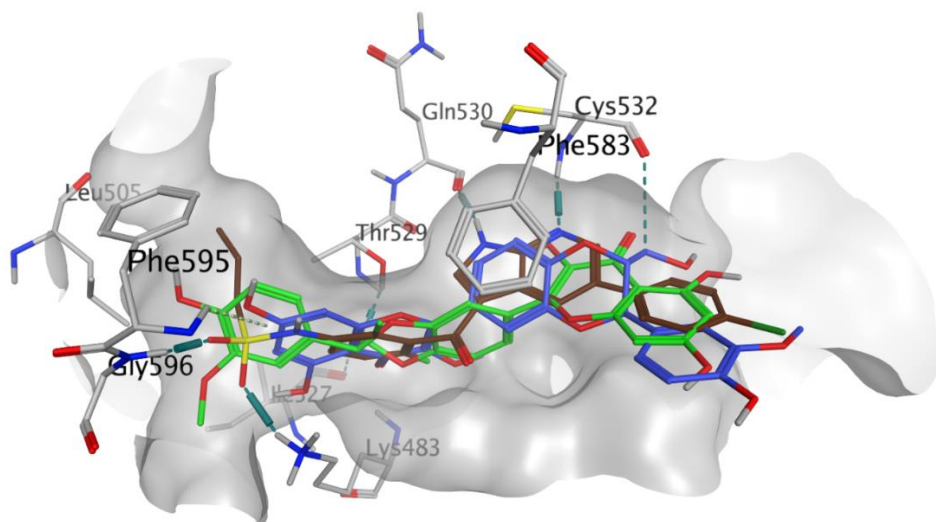
Съединене	BRAF киназа	SMO
Силибин А	-5.787	-7.928
Силибин В	-6.158	-5.545
Дехидросилибин А	-7.696	-8.090
Дехидросилибин В	-8.354	-8.490
Вемурафениб	-10.196	N.A.
Висмодегиб	N.A.	-8.429

При всички докинг симулации са идентифицирани аминокиселинни остатъци от местата на свързване на протеините, които участват в специфични взаимодействия с флавонолигнаните, включително такива, с които взаимодействат и лекарствата вемурафениб (Lys483, Cys532) и висмодегиб (Ser387) (Фигури 9 и 10). Наблюдавани са и множество взаимодействия, които се различават от тези на лекарствата, като те са особено застъпени при дехидросилибините и в двата рецептора. Дехидросилибин А осъществява аромат-ароматно взаимодействие с Phe583, докато дехидросилибин В взаимодейства чрез водородна връзка с Thr529 и Ile527, както и чрез аромат-ароматно взаимодействие с Phe595 в BRAF киназата. Въпреки сравнимите докинг резултати, само дехидросилибин А образува две водородни връзки с остатъците Asn219 и Met301 в активното място на SMO (Фигура 10А). Наблюдавани са обърнати (огледални) пози за всички диастереоизомерни двойки в двата протеина, с изключение на силибин А и силибин В в SMO. Такава стереоспецифична ориентация на съединенията в местата на свързване на изследваните протеини не е изненадваща, като се има предвид вече демонстрираната способност на тези съединения да осъществяват стереоспецифични взаимодействия с ER α . Резултатите ясно демонстрират важността на експерименталните

изследвания с чистите стереомери на флавонолигнаните.

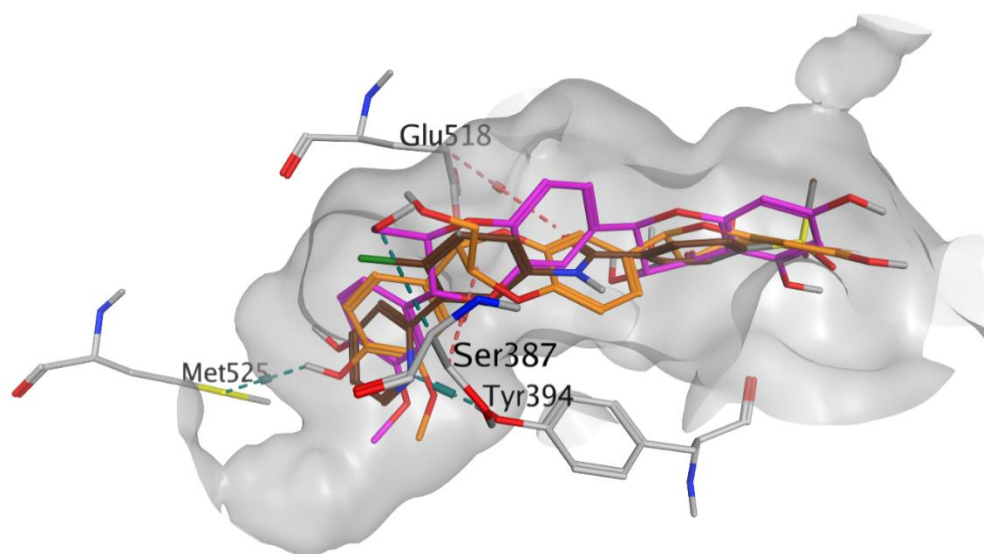


A

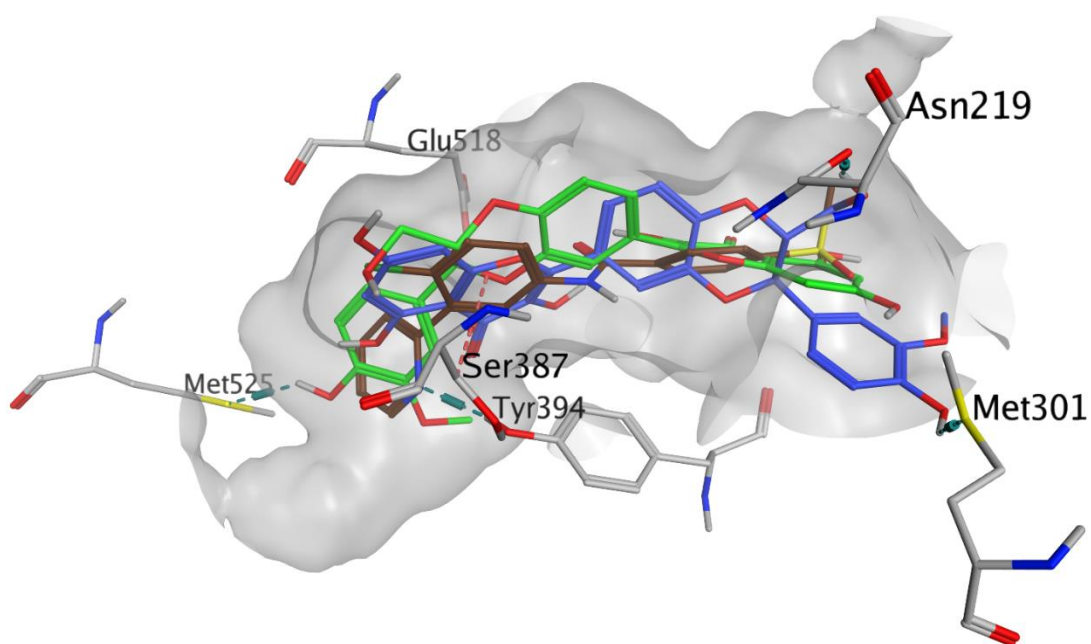


B

Фигура 9. Позии и взаимодействия на изследваните съединения в джоба на свързване на BRAF киназата: (A) силибин А (розово) и силибин В (оранжево); (B) Дехидросилибин А (синьо) и дехидросилибин В (зелено). И в двата панела вемурафениб е показан в кафяво, джобът е показан в сиво, а взаимодействащите аминокиселинни остатъци са оцветени според типовете атоми.



A



B

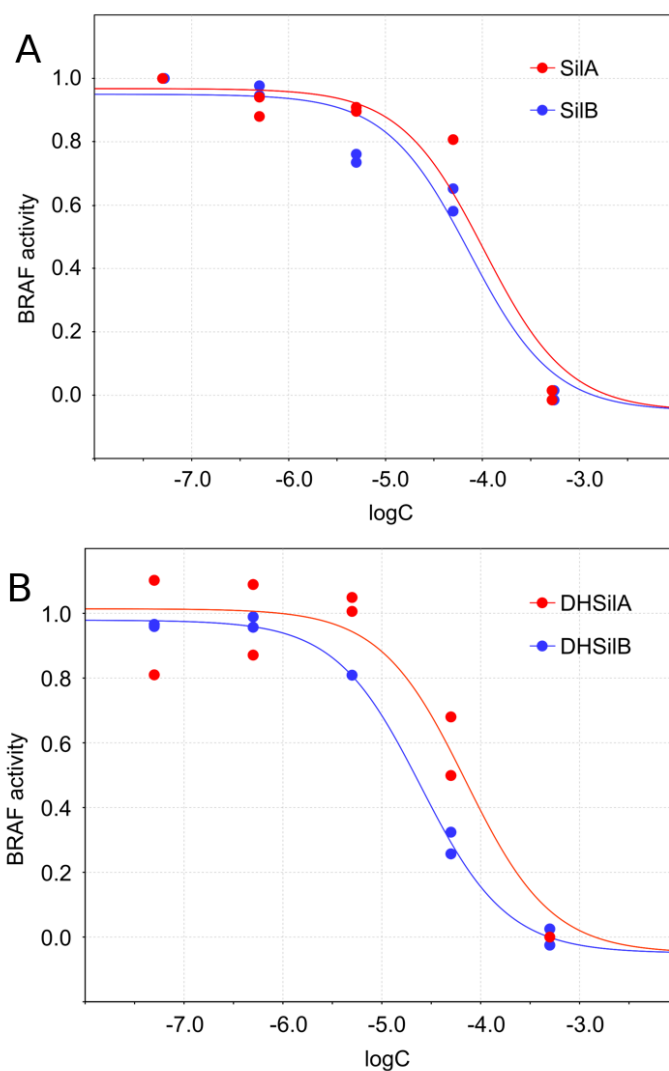
Фигура 10. Пози и взаимодействия на изследваните съединения в джоба на свързване на SMO: (A) силибин А (розово) и силибин В (оранжево); (B) Дехидросилибин А (синьо) и дехидросилибин В (зелено). И в двата панела висмодегиб е показан в кафяво, джобът е показан в сиво, а взаимодействащите аминокиселинни остатъци са оцветени според типовете атоми.

2.3. *In vitro* изследвания на потенциала на флавонолигнани за взаимодействия с подобрани противотуморни таргетни протеини.

Резултатите от *in silico* изследванията показват, че флавонолигнаните притежават потенциал за взаимодействия с идентифицираните таргетни протеини на избраните противотуморни лекарства. Затова са проведени допълнителни *in vitro* експерименти, чрез които да се изследват ефектите на флавонолигнаните върху протеините и върху ракови клетъчни линии, които потенциално да потвърдят *in silico* предсказанията. По отношение на BRAF киназата са проведени проучвания на ефектите на силибините върху активността на BRAF V600E киназата, както и върху жизнеспособността на човешки злокачествени меланомни клетки, експресиращи BRAF V600E киназа и нетуморогенни кожни клетки (кератиноцити). По отношение на SMO, са изследвани ефектите върху HH сигналния път както и потенциала за взаимодействие с SMO рецептора. Тъй като се очаква, че флавонолигнаните биха действали като инхибитори на таргетните протеини, аналогично на химически подобните лекарства, са избрани анализи за тестване на инхибиторната активност.

2.3.1. Ефекти върху активността на BRAF V600E киназата.

Проучванията на ефектите на силибините върху активността на BRAF V600E киназата показват, че дехидросилибин В проявява най-висока инхибиторна активност с IC_{50} от 24,9 μ M, следван от дехидросилибин А, силибин В и силибин А (Фигура 11). За сравнение, докладваната IC_{50} стойност на вемурафениб е 32,4 nM. Тези резултати са в добро съответствие с докладваните *in silico* резултати, които демонстрират по-добри резултати от докинга за дехидросилибините в BRAF киназата, както и по-голям брой взаимодействия на дехидросилибините в активното място на протеина в сравнение със силибините. Тези наблюдения в комбинация със стереоспецифичните ориентации на диастереоизомерните двойки дават механистично обяснение за ефектите на флавонолигнаните върху активността на BRAF V600E киназата.



Фигура 11. Инхибиторен ефекти на изследваните съединения върху активността на BRAF V600E киназата: (A) силибин А (IC₅₀ = 104,0 μM, 95%, доверителен интервал, CI = 34,7 ÷ 204,2 μM) и силибин В (IC₅₀=73,9 μM, CI = 32,4 ÷ 112,2 μM); (B) дехидросилибин А (IC₅₀ = 70,6 μM, CI = 30,9 ÷ 131,8 μM) и дехидросилибин В (IC₅₀ = 24,9 μM, CI = 17,8 ÷ 26,3 μM).

2.3.2. Цитотоксичност спрямо злокачествени кожни клетъчни линии.

Всички изследвани флавонолигнани показват по-висока цитотоксичност в клетъчната линия А-375, която е представителна за злокачествен меланом, експресиращ мутацията BRAF V600E, в сравнение с немеланомната туморна клетъчна линия А-431 и нетуморогенната клетъчна линия HaCaT. Стойностите на IC₅₀, получени за трите

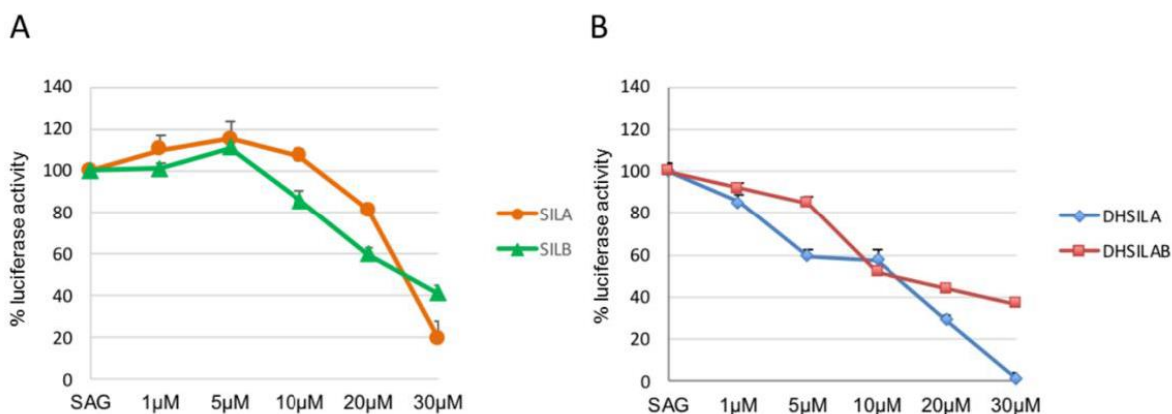
тествани клетъчни линии, са представени в Таблица 6. Дехидросилибин А и дехидросилибин В проявяват по-висока цитотоксичност спрямо клетъчната линия А-375 и са по-малко токсични спрямо клетъчните линии А-431 и HaCaT в сравнение със силибин А и силибин В. Тази тенденция е особено изразена за клетъчната линия HaCaT, спрямо която дехидросилибините проявяват най-ниска токсичност.

Таблица 6. *In vitro* цитотоксичност на силибини и дехидросилибини върху злокачествени кожни клетъчни линии и нетуморогенни кератиноцити.

Съединение	IC ₅₀ , μM (95% доверителен интервал)		
	Cell lines		
	А-375	А-431	HaCaT
Силибин А	97.0 (38.0 ÷ 245.5)	126.0 (51.3 ÷ 288.4)	120.0 (56.2 ÷ 245.5)
Силибин В	120.0 (53.7 ÷ 257.0)	1 (52.5 ÷ n.d.)	150.0 (57.5 ÷ 426.6)
Дехидросилибин А	83.0 (44.7 ÷ 158.5)	97.0 (55.0 ÷ 169.8)	231.0 (91.2 ÷ 457.1)
Дехидросилибин В	86.0 (64.6 ÷ 120.2)	130.0 (79.4 ÷ 213.8)	164.0 (75.9 ÷ 309.0)

2.3.3. Инхибиторна активност спрямо Hedgehog (НН) сигналния път.

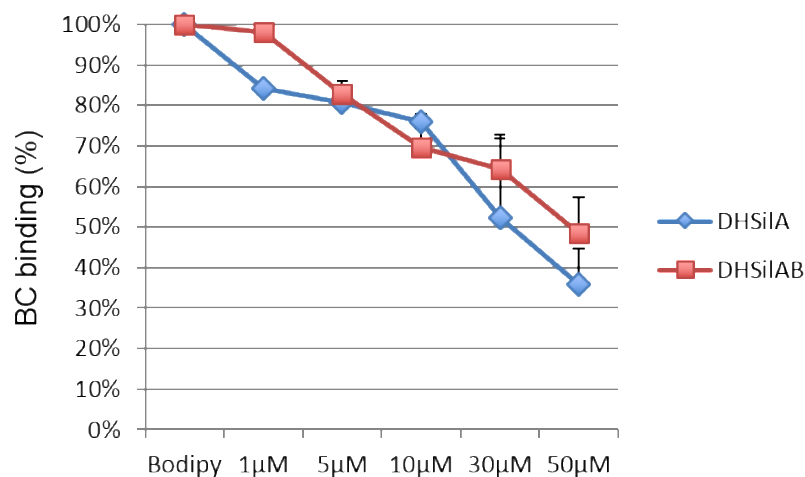
НН инхибиторната активност на съединенията (индивидуално и под формата на рацемат) е изследвана чрез луциферазен репортерен анализ, който се използва широко за характеризиране на НН инхибитори. НН инхибиторната активност на молекулите е оценена в NIH3T3 Shh Light II клетки, стабилно инкорпориращи Gli-чувствителна луцифераза от светулки (Alfonsi et al. 2017), третирани със синтетичния SMO агонист SAG (Chen 2002), самостоятелно и в комбинация с тествания съединения. При максимална концентрация от 30 μM, силибин А и силибин В (Фигура 12А) показват слаба инхибиторна активност спрямо НН, докато дехидросилибин А и рацематът на дехидросилибин А и дехидросилибин В (дехидросилибин АВ) показват висока активност със стойности на IC₅₀ от 5–10 μM (Фигура 12В). Силибин АВ и дехидросилибин В не показват активност.



Фигура 12. Инхибиторна активност спрямо Hedgehog сигналният път на: (А) силибин А и силибин В; (В) дехидросилибин А и дехидросилибин АВ.

2.3.4. Свързване с SMO рецептора.

За изследване на свойствата на свързване на избраните съединения със SMO рецептора, е проведен displacement анализ с BODIPY-циклопамин (Alfonsi et al. 2017; Infante et al. 2016), за който е известно, че взаимодейства в мястото на свързване с антагонисти на SMO, разположено в „heptahelical bundle“ участъка в структурата на рецептора. За тази цел HEK293T клетки са трансфектирани за експресия на SMO и след това инкубирани с BODIPY-циклопамин в отсъствието/присъствието на повишаващи се количества дехидросилибин А или дехидросилибин АВ. Тези съединения инхибират свързването на BODIPY-циклопамин към клетки, експресиращи SMO по дозозависим начин (Фигура 13).



Фигура 13. Инхибиране на свързването на BODIPY-циклопамин от дехидросилибин А и дехидросилибин АВ

Резултатите показват, че дехидросилибин А и дехидросилибин АВ се свързват със SMO рецептора в „heptahelical bundle“ участъка, което показва антагонистичен ефект спрямо SMO, както е наблюдавано за други хемотипове на природни продукти (Berardozzi et al. 2018; Lospinoso Severini и др. 2019).

Резултатите от *in vitro* анализите върху активността на флавонолигнаните върху SMO могат да се обяснят с *in silico* резултатите, подобно на тези получени за BRAF киназата. Дехидросилибините имат по-добри докинг резултати от силибините със стойности, близки до тези на висмодегиб. В допълнение, анализът на взаимодействията на флавонолигнаните със SMO показва, че само дехидросилибин А образува водородни връзки с аминокиселинни остатъци в активното място на протеина, което предполага специфична активност спрямо рецептора потвърдена от *in vitro* експериментите.

2.4. Заключение.

Чрез комбинирания *in silico* и *in vitro* подход, приложен в изследванията от този раздел, са идентифицирани нови противотуморни таргетни протеини за флавонолигнани от *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Чрез *in silico* симулациите са идентифицирани нови потенциални таргетни протеини на базата на: (i) химическото сходство на изследваните съединения с противотуморните лекарства вемурафениб и висмодегиб и (ii) способността на флавонолигнаните да взаимодействат с таргетните протеини на тези лекарства, доказано чрез докинг симулации.

In silico резултатите показват, че изследваните компоненти на силимарина могат да

се разглеждат като двойни инхибитори на BRAF киназата и SMO, които са основни таргетни протеини в съвременните противоракови терапии. Извършени са *in vitro* анализи с протеини и клетъчни линии, очертавайки дозово зависими профили на изследваните съединения, предполагащи възможни ефекти върху тези таргети. Резултатите от докинга, предоставящи оценка за енергията на взаимодействие лиганд-рецептор илюстрират добро съответствие с IC_{50} стойностите, получени чрез *in vitro* анализите. Резултатите от докинга на дехидросилибините дават по-добри стойности в сравнение със силибините и те са съединенията, показващи по-висока активност в изследванията на активността спрямо BRAF киназата и HH сигналния път. Това наблюдение е в съответствие и с други *in vitro* проучвания, потвърждаващи по-високата активност на дехидросилибините в сравнение със силибините (Agarwal et al. 2013). Експериментално са потвърдени и цитотоксичните свойства на съединенията в туморни кожни клетъчни линии, демонстриращи по-висока активност в A-375 клетки, отколкото в A-431 и HaCaT.

ПРИНОСИ

1. Разработен е QSAR модел, който позволява достоверна оценка на мембранната пропускливост и стомашно-чревната абсорбция на орално приемани биоактивни съединения. Моделът е свободно достъпен чрез базата данни за алтернативни методи на референтната лаборатория на Европейския съюз за алтернативи на опитите с животни.
2. Приложеният комбиниран *in silico/in vitro* анализ обяснява молекулни механизми на действие на флавонолигнаните от *Silybum marianum* и ги идентифицира като подходящи водещи структури за дизайн на нови биологично активни природни съединения с положителни ефекти за човешкото здраве.
 - Установено е, че основните компоненти на *Silybum marianum*, както и техните производни могат да се считат за добре преминаващи през стомашно-чревния тракт.
 - Доказано е, че енантиомерните форми на силибина осъществяват стереоспецифични взаимодействия с естрогеновия рецептор алфа, които обясняват на молекулно ниво експериментално наблюдаваните разлики в токсичните им ефекти.
 - BRAF киназата и SMO са идентифицирани като нови фармакологични таргети, участващи в механизмите на противотуморна активност на флавонолигнани от *Silybum marianum*. Дехидросилибините са очертани като обещаващи водещи структури за разработване на противотуморни лекарства.

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

- Abenavoli, Ludovico, Angelo A. Izzo, Natasa Milić, Carla Cicala, Antonello Santini, and Raffaele Capasso. 2018. "Milk Thistle (*Silybum Marianum*): A Concise Overview on Its Chemistry, Pharmacological, and Nutraceutical Uses in Liver Diseases: Milk Thistle and Liver Diseases." *Phytotherapy Research* 32 (11): 2202–13. <https://doi.org/10.1002/ptr.6171>.
- Agarwal, Chapla, Ritambhara Wadhwa, Gagan Deep, David Biedermann, Radek Gažák, Vladimír Křen, and Rajesh Agarwal. 2013. "Anti-Cancer Efficacy of Silybin Derivatives - A Structure-Activity Relationship." Edited by Stephen J. Polyak. *PLoS ONE* 8 (3): e60074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060074>.
- Alfonsi, Romina, Bruno Botta, Sandro Cacchi, Lucia Di Marcotullio, Giancarlo Fabrizi, Roberta Faedda, Antonella Goggiamani, Antonia Iazzetti, and Mattia Mori. 2017. "Design, Palladium-Catalyzed Synthesis, and Biological Investigation of 2-Substituted 3-Aroylquinolin-4(1*H*)-Ones as Inhibitors of the Hedgehog Signaling Pathway." *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (4): 1469–77. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01135>.
- Alqahtani, Saeed. 2017. "In Silico ADME-Tox Modeling: Progress and Prospects." *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 13 (11): 1147–58. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1389897>.
- Andrew, Ruth, and Angelo A Izzo. 2017. "Principles of Pharmacological Research of Nutraceuticals: Editorial." *British Journal of Pharmacology* 174 (11): 1177–94. <https://doi.org/10.1111/bph.13779>.
- Ano, Rieko, Yukitaka Kimura, Motohiro Shima, Ryuichi Matsuno, Tamio Ueno, and Miki Akamatsu. 2004. "Relationships between Structure and High-Throughput Screening Permeability of Peptide Derivatives and Related Compounds with Artificial Membranes: Application to Prediction of Caco-2 Cell Permeability." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12 (1): 257–64. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.10.002>.
- Andrew, Worth, Bassan, A., Gallegos Saliner, A., Netzeva, T., Pavan, M., Tsakovska, I., Vracko Grobelsek, M. and Tier, G., authors. The Characterisation of (Quantitative) Structure-Activity Relationships - Preliminary Guidance. EUR 21866 EN. European Commission; 2005.
- Ascenzi, Paolo, Alessio Bocedi, and Maria Marino. 2006. "Structure–Function Relationship of Estrogen Receptor α and β : Impact on Human Health." *Molecular Aspects of Medicine* 27 (4): 299–402. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.07.001>.
- Asiamah, Isaac, Samuel Asiamah Obiri, Woasiedem Tamekloe, Francis Ackah Armah, and Lawrence Sheringham Borquaye. 2023. "Applications of Molecular Docking in Natural Products-Based Drug Discovery." *Scientific African* 20 (July): e01593. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01593>.
- Avdeef, Alex. 2012. *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118286067>.
- Avdeef, Alex, Stefanie Bendels, L.i. Di, Bernard Faller, Manfred Kansy, Kiyohiko Sugano, and Yukinori Yamauchi. 2007. "PAMPA—Critical Factors for Better Predictions of Absorption." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96 (11): 2893–2909. <https://doi.org/10.1002/jps.21068>.
- Berardozzi, Simone, Flavia Bernardi, Paola Infante, Cinzia Ingallina, Sara Toscano, Elisa De Paolis, Romina Alfonsi, et al. 2018. "Synergistic Inhibition of the Hedgehog Pathway by Newly Designed Smo and Gli Antagonists Bearing the Isoflavone Scaffold." *European Journal of Medicinal Chemistry* 156 (August): 554–62.

- <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.017>.
- Berman, H. M. 2000. "The Protein Data Bank." *Nucleic Acids Research* 28 (1): 235–42. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- Biedermann, D., E. Vavříková, L. Cvak, and V. Křen. 2014. "Chemistry of Silybin." *Nat. Prod. Rep.* 31 (9): 1138–57. <https://doi.org/10.1039/C3NP70122K>.
- Bijak, Michal. 2017. "Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum Marianum* L. Gaernt.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism." *Molecules* 22 (11): 1942. <https://doi.org/10.3390/molecules22111942>.
- Brigo, Alessandro, Doha Naga, and Wolfgang Muster. 2022. "Increasing the Value of Data Within a Large Pharmaceutical Company Through In Silico Models." In *In Silico Methods for Predicting Drug Toxicity*, edited by Emilio Benfenati, 2425:637–74. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1960-5_24.
- Brown, A. C., and T. R. Fraser. 1868. "On the Connection between Chemical Constitution and Physiological Action; with Special Reference to the Physiological Action of the Salts of the Ammonium Bases Derived from Strychnia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia, and Nicotia." *Journal of Anatomy and Physiology* 2 (2): 224–42.
- Butina, Darko, Matthew D Segall, and Katrina Frankcombe. 2002. "Predicting ADME Properties in Silico: Methods and Models." *Drug Discovery Today* 7 (11): S83–88. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02288-2](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02288-2).
- Camini, Fernanda Caetano, and Daniela Caldeira Costa. 2020. "Silymarin: Not Just Another Antioxidant." *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 0 (0). <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2019-0206>.
- Chambers, Christopher Steven, Veronika Holečková, Lucie Petrásková, David Biedermann, Kateřina Valentová, Martin Buchta, and Vladimír Křen. 2017. "The Silymarin Composition... and Why Does It Matter???" *Food Research International* 100 (October): 339–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.017>.
- Chen, J. K. 2002. "Inhibition of Hedgehog Signaling by Direct Binding of Cyclopamine to Smoothed." *Genes & Development* 16 (21): 2743–48. <https://doi.org/10.1101/gad.1025302>.
- Csupor, Dezső, Attila Csorba, and Judit Hohmann. 2016. "Recent Advances in the Analysis of Flavonolignans of *Silybum Marianum*." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 130 (October): 301–17. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.034>.
- Diukendjieva, Antonia, Merilin Al Sharif, Petko Alov, Tania Pencheva, Ivanka Tsakovska, and Ilza Pajeva. 2017. "ADME/Tox Properties and Biochemical Interactions of Silybin Congeners: In Silico Study." *Natural Product Communications* 12 (2): 1934578X1701200. <https://doi.org/10.1177/1934578X1701200208>.
- Džubák, Petr, Marián Hajdúch, Radek Gažák, Alena Svobodová, Jitka Psotová, Daniela Walterová, Petr Sedmera, and Vladimír Křen. 2006. "New Derivatives of Silybin and 2,3-Dehydrosilybin and Their Cytotoxic and P-Glycoprotein Modulatory Activity." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14 (11): 3793–3810. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.01.035>.
- Ertl, Peter, Bernhard Rohde, and Paul Selzer. 2000. "Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties." *Journal of Medicinal Chemistry* 43 (20): 3714–17. <https://doi.org/10.1021/jm000942e>.
- Fujikawa, Masaaki, Rieko Ano, Kazuya Nakao, Ryo Shimizu, and Miki Akamatsu. 2005. "Relationships between Structure and High-Throughput Screening Permeability of Diverse Drugs with Artificial Membranes: Application to Prediction of Caco-2 Cell Permeability." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13 (15): 4721–32.

- <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.04.076>.
- Fujikawa, Masaaki, Kazuya Nakao, Ryo Shimizu, and Miki Akamatsu. 2007. "QSAR Study on Permeability of Hydrophobic Compounds with Artificial Membranes." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 15 (11): 3756–67. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.03.040>.
- Gažák, Radek, Kateřina Fuksová, Petr Marhol, Marek Kuzma, Rajesh Agarwal, and Vladimír Křen. 2013. "Preparative Method for Isosilybin Isolation Based on Enzymatic Kinetic Resolution of Silymarin Mixture." *Process Biochemistry* 48 (1): 184–89. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.11.006>.
- Gažák, Radek, Petr Sedmera, Marek Vrbacký, Jitka Vostálová, Zdeněk Drahotka, Petr Marhol, Daniela Walterová, and Vladimír Křen. 2009. "Molecular Mechanisms of Silybin and 2,3-Dehydrosilybin Antiradical Activity—Role of Individual Hydroxyl Groups." *Free Radical Biology and Medicine* 46 (6): 745–58. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.11.016>.
- Gažák, Radek, Patrick Trouillas, David Biedermann, Kateřina Fuksová, Petr Marhol, Marek Kuzma, and Vladimír Křen. 2013. "Base-Catalyzed Oxidation of Silybin and Isosilybin into 2,3-Dehydro Derivatives." *Tetrahedron Letters* 54 (4): 315–17. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.11.049>.
- Gažák, Radek, Kateřina Valentová, Kateřina Fuksová, Petr Marhol, Marek Kuzma, Miguel Ángel Medina, Ivana Oborná, Jitka Ulrichová, and Vladimír Křen. 2011. "Synthesis and Antiangiogenic Activity of New Silybin Galloyl Esters." *Journal of Medicinal Chemistry* 54 (20): 7397–7407. <https://doi.org/10.1021/jm201034h>.
- Gazak, Radek, Daniela Walterova, and Vladimír Kren. 2007. "Silybin and Silymarin - New and Emerging Applications in Medicine." *Current Medicinal Chemistry* 14 (3): 315–38. <https://doi.org/10.2174/092986707779941159>.
- Grabowski, Kristina, Karl-Heinz Baringhaus, and Gisbert Schneider. 2008. "Scaffold Diversity of Natural Products: Inspiration for Combinatorial Library Design." *Natural Product Reports* 25 (5): 892. <https://doi.org/10.1039/b715668p>.
- Harvey, Alan L., RuAngelie Edrada-Ebel, and Ronald J. Quinn. 2015. "The Re-Emergence of Natural Products for Drug Discovery in the Genomics Era." *Nature Reviews Drug Discovery* 14 (2): 111–29. <https://doi.org/10.1038/nrd4510>.
- Hawkins, Paul C. D., A. Geoffrey Skillman, and Anthony Nicholls. 2007. "Comparison of Shape-Matching and Docking as Virtual Screening Tools." *Journal of Medicinal Chemistry* 50 (1): 74–82. <https://doi.org/10.1021/jm0603365>.
- Infante, Paola, Romina Alfonsi, Cinzia Ingallina, Deborah Quaglio, Francesca Ghirga, Ilaria D'Acquarica, Flavia Bernardi, et al. 2016. "Inhibition of Hedgehog-Dependent Tumors and Cancer Stem Cells by a Newly Identified Naturally Occurring Chemotype." *Cell Death & Disease* 7 (9): e2376–e2376. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.195>.
- Kansy, Manfred, Holger Fischer, Krystyna Kratzat, Frank Senner, Björn Wagner, and Isabelle Parrilla. 2001. "High-Throughput Artificial Membrane Permeability Studies in Early Lead Discovery and Development." In *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*, edited by Bernard Testa, Han van de Waterbeemd, Gerd Folkers, and Richard Guy, 447–64. Zürich: Verlag Helvetica Chimica Acta. <https://doi.org/10.1002/9783906390437.ch24>.
- Kansy, Manfred, Frank Senner, and Klaus Gubernator. 1998. "Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes." *Journal of Medicinal Chemistry* 41 (7): 1007–10. <https://doi.org/10.1021/jm970530e>.
- Khan, Muhammad Azim, Robert E. Blackshaw, and Khan B. Marwat. 2009. "Biology of Milk Thistle (*Silybum Marianum*) and the Management Options for Growers in North-

- Western Pakistan.” *Weed Biology and Management* 9 (2): 99–105.
<https://doi.org/10.1111/j.1445-6664.2009.00326.x>.
- Kosina, Pavel, Vladimír Křen, Rolf Gebhardt, František Grambal, Jitka Ulrichová, and Daniela Walterová. 2002. “Antioxidant Properties of Silybin Glycosides.” *Phytotherapy Research* 16 (S1): 33–39. <https://doi.org/10.1002/ptr.796>.
- Křen, Vladimír. 2021. “Chirality Matters: Biological Activity of Optically Pure Silybin and Its Congeners.” *International Journal of Molecular Sciences* 22 (15): 7885.
<https://doi.org/10.3390/ijms22157885>.
- Křenek, K., P. Marhol, Ž. Peikerová, V. Křen, and D. Biedermann. 2014. “Preparatory Separation of the Silymarin Flavonolignans by Sephadex LH-20 Gel.” *Food Research International* 65 (November): 115–20. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.001>.
- Kumar, Ashutosh, and Kam Y. J. Zhang. 2018. “Advances in the Development of Shape Similarity Methods and Their Application in Drug Discovery.” *Frontiers in Chemistry* 6 (July): 315. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00315>.
- Kvasnička, F, B Bíba, R Ševčík, M Voldřich, and J Krátká. 2003. “Analysis of the Active Components of Silymarin.” *Journal of Chromatography A* 990 (1–2): 239–45.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01971-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01971-4).
- Langowski, Jan, and Anthony Long. 2002. “Computer Systems for the Prediction of Xenobiotic Metabolism.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (3): 407–15.
[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00011-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00011-X).
- Li, Feng, Yongli Wang, Dapeng Li, Yilun Chen, and Q. Ping Dou. 2019. “Are We Seeing a Resurgence in the Use of Natural Products for New Drug Discovery?” *Expert Opinion on Drug Discovery* 14 (5): 417–20. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1582639>.
- Lorenzo, José M., Predrag Putnik, Danijela Bursać Kovačević, Marinko Petrović, Paulo E. Munekata, Belén Gómez, Krystian Marszałek, Shahin Roohinejad, and Francisco J. Barba. 2020. “Silymarin Compounds: Chemistry, Innovative Extraction Techniques and Synthesis.” In *Studies in Natural Products Chemistry*, 64:111–30. Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817903-1.00004-8>.
- Lospinoso Severini, Quaglio, Basili, Ghirga, Bufalieri, Caimano, Balducci, et al. 2019. “A Smo/Gli Multitarget Hedgehog Pathway Inhibitor Impairs Tumor Growth.” *Cancers* 11 (10): 1518. <https://doi.org/10.3390/cancers11101518>.
- Luke, Jason J., and F. Stephen Hodi. 2012. “Vemurafenib and BRAF Inhibition: A New Class of Treatment for Metastatic Melanoma.” *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (1): 9–14.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2197>.
- Machhar, Janvhi, Ansh Mittal, Surendra Agrawal, Anil M. Pethe, and Prashant S. Kharkar. 2019. “Computational Prediction of Toxicity of Small Organic Molecules: State-of-the-Art.” *Physical Sciences Reviews* 4 (10). <https://doi.org/10.1515/psr-2019-0009>.
- Marchant, Carol A., Katharine A. Briggs, and Anthony Long. 2008. “In Silico Tools for Sharing Data and Knowledge on Toxicity and Metabolism: Derek for Windows, Meteor, and Vitic.” *Toxicology Mechanisms and Methods* 18 (2–3): 177–87.
<https://doi.org/10.1080/15376510701857320>.
- Moumbock, Aurélien F.A., Jianyu Li, Pankaj Mishra, Mingjie Gao, and Stefan Günther. 2019. “Current Computational Methods for Predicting Protein Interactions of Natural Products.” *Computational and Structural Biotechnology Journal* 17: 1367–76.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.08.008>.
- Newman, David J., and Gordon M. Cragg. 2020. “Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019.” *Journal of Natural Products* 83 (3): 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.
- Peter, Swathik Clarancia, Jaspreet Kaur Dhanjal, Vidhi Malik, Navaneethan Radhakrishnan,

- Mannu Jayakanthan, and Durai Sundar. 2019. "Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR): Modeling Approaches to Biological Applications." In *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 661–76. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20197-0>.
- Petrásková, Káňová, Biedermann, Křen, and Valentová. 2020. "Simple and Rapid HPLC Separation and Quantification of Flavonoid, Flavonolignans, and 2,3-Dehydroflavonolignans in Silymarin." *Foods* 9 (2): 116. <https://doi.org/10.3390/foods9020116>.
- Plíšková, Martina, Jan Vondráček, Vladimír Křen, Radek Gažák, Petr Sedmera, Daniela Walterová, Jitka Psotová, Vilím Šimánek, and Miroslav Machala. 2005. "Effects of Silymarin Flavonolignans and Synthetic Silybin Derivatives on Estrogen and Aryl Hydrocarbon Receptor Activation." *Toxicology* 215 (1–2): 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.06.020>.
- Rodrigues, Tiago, Daniel Reker, Petra Schneider, and Gisbert Schneider. 2016. "Counting on Natural Products for Drug Design." *Nature Chemistry* 8 (6): 531–41. <https://doi.org/10.1038/nchem.2479>.
- Rogers, David J., and Taffee T. Tanimoto. 1960. "A Computer Program for Classifying Plants: The Computer Is Programmed to Simulate the Taxonomic Process of Comparing Each Case with Every Other Case." *Science* 132 (3434): 1115–18. <https://doi.org/10.1126/science.132.3434.1115>.
- Rudrapal, Mithun, and Chukwuebuka Egbuna. 2022. *Computer Aided Drug Design (CADD): From Ligand-Based Methods to Structure-Based Approaches*. San Diego: Elsevier.
- Sandhiya, Selvarajan, George Melvin, Srinivasamurthy Suresh Kumar, and Steven Aibor Dkhar. 2013. "The Dawn of Hedgehog Inhibitors: Vismodegib." *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics* 4 (1): 4–7. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.107628>.
- Silva, Fredson, and Gustavo Trossini. 2014. "The Survey of the Use of QSAR Methods to Determine Intestinal Absorption and Oral Bioavailability During Drug Design." *Medicinal Chemistry* 10 (5): 441–48. <https://doi.org/10.2174/1573406410666140415122115>.
- Soleimani, Vahid, Parisa Sadat Delghandi, Seyed Adel Moallem, and Gholamreza Karimi. 2019. "Safety and Toxicity of Silymarin, the Major Constituent of Milk Thistle Extract: An Updated Review." *Phytotherapy Research*, May. <https://doi.org/10.1002/ptr.6361>.
- Stanzione, Francesca, Ilenia Giangreco, and Jason C. Cole. 2021. "Use of Molecular Docking Computational Tools in Drug Discovery." In *Progress in Medicinal Chemistry*, 60:273–343. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004>.
- Stenberg, Patric, Christel A.S. Bergström, Kristina Luthman, and Per Artursson. 2002. "Theoretical Predictions of Drug Absorption in Drug Discovery and Development." *Clinical Pharmacokinetics* 41 (11): 877–99. <https://doi.org/10.2165/00003088-200241110-00005>.
- the International Natural Product Sciences Taskforce, Atanas G. Atanasov, Sergey B. Zotchev, Verena M. Dirsch, and Claudiu T. Supuran. 2021. "Natural Products in Drug Discovery: Advances and Opportunities." *Nature Reviews Drug Discovery* 20 (3): 200–216. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>.
- Verma, Rajeshwar P., Corwin Hansch, and Cynthia D. Selassie. 2007. "Comparative QSAR Studies on PAMPA/Modified PAMPA for High Throughput Profiling of Drug Absorption Potential with Respect to Caco-2 Cells and Human Intestinal Absorption." *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 21 (1–3): 3–22. <https://doi.org/10.1007/s10822-006-9101-z>.

- Wang, Junmei, and Tingjun Hou. 2009. "Chapter 5 Recent Advances on in Silico ADME Modeling." In *Annual Reports in Computational Chemistry*, 5:101–27. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1574-1400\(09\)00505-2](https://doi.org/10.1016/S1574-1400(09)00505-2).
- Wang, Xin, Zhen Zhang, and Shuai-Cheng Wu. n.d. "Health Benefits of Silybum Marianum: Phytochemistry, Pharmacology, and Applications." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21.
- Waterbeemd, Han van de, Hans Lennernäs, and Per Artursson, eds. 2003. *Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption, and Bioavailability*. Methods and Principles in Medicinal Chemistry, v. 18. Weinheim: Wiley-VCH.
- Wishart, D. S. 2006. "DrugBank: A Comprehensive Resource for in Silico Drug Discovery and Exploration." *Nucleic Acids Research* 34 (90001): D668–72. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj067>.
- Wright, Gerard D. 2017. "Opportunities for Natural Products in 21st Century Antibiotic Discovery." *Natural Product Reports* 34 (7): 694–701. <https://doi.org/10.1039/C7NP00019G>.
- Wright. 2019. "Unlocking the Potential of Natural Products in Drug Discovery." *Microbial Biotechnology* 12 (1): 55–57. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13351>.

НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ПУБЛИКАЦИИ В НАУЧНИ СПИСАНИЯ

1. **Diukendjieva A.**, M. Al Sharif, P. Alov, T. Pencheva, I. Tsakovska, I. Pajeva. ADME/Tox Properties and Biochemical interactions of Silybin Congeners: *In Silico* Study. *Natural Product Communications*, 2017, 12(2), 175-178. **IF=0.809 (2017), Q2. Citations: 6 (WoS), 5 (Scopus)**
2. **Diukendjieva A.**, P. Alov, I. Tsakovska, T. Pencheva, A. Richarz, V. Kren, M.T.D. Cronin, I. Pajeva. *In vitro* and *in silico* studies of the membrane permeability of natural flavonoids from *Silybum marianum*(L.) Gaertn. and their derivatives. *Phytomedicine*, 2018, 53. pp. 79-85. ISSN 0944-7113 . **IF = 4.268 (2019), Q1. Citations: 11 (WoS), 11 (Scopus)**
3. **Diukendjieva A.**, I. Tsakovska, P. Alov, T. Pencheva, I. Pajeva, A. Worth, M.T.D. Cronin. Advances in the prediction of gastrointestinal absorption: QSAR PAMPA modelling. *Computational Toxicology* (Special Issue “*In Silico* Approaches for the Safety Assessment of Cosmetic-Related Substances”), 2019, 51–59. **SJR = 0.579(2019), Q2. Citations: 12 (Scopus)**
4. **Diukendjieva A.**, M. Zaharieva, M. Mori, P. Alov, I. Tsakovska, T. Pencheva, H. Najdenski. Dual SMO/BRAF Inhibition by Flavonolignans from *Silybum Marianum*. *Antioxidants*, 2020, 9 (5): 384. **IF=6.313 (2020), Q2. Citations: 14 (WoS); 9 (Scopus)**

ДОКЛАДИ В ПЪЛЕН ТЕКСТ В СБОРНИЦИ ОТ КОНФЕРЕНЦИИ

1. **Diukendjieva A.**, L. Marinov, P. Alov, I. Tsakovska, I. Pajeva. *In silico* modelling to predict transcellular permeability of bioactive compounds. *Series G. Medicine, Pharmacy and Dental medicine, Union of Scientists in Bulgaria – Plovdiv*, Vol. XVII, p. 187-190, 2015. ISSN 1311-9427
2. **Diukendjieva, A.**, M. Al Sharif, I. Tsakovska, T. Pencheva, P. Alov, I. Pajeva. *In silico* study of natural compounds: prediction of metabolism, toxicity and biochemical interactions. In: *Proceedings of the Humboldt Kolleg, 16-18 Nov 2017, Sofia*, Faber, 2018, 24-33.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ ФОРУМИ

- 1. Diukendjieva A.**, Mori M., Alov P., Tsakovska I., Botta M., Pajeva I. *In silico* evaluation of new potential target proteins of flavonolignans from *Silybum marianum*. 6th Edition of *International Conference on Pharmacognosy and Medicinal Plants*, 16-17 April, 2018, Amsterdam, Netherlands.
- 2. Diukendjieva A.**, Al Sharif M., Tsakovska I., Pencheva T., Alov P., Pajeva I. *In silico* study of natural compounds: prediction of metabolism, toxicity and biochemical interactions. *Humboldt Kolleg, Humboldtians and scientific progress in the Central and East European countries*, 16–18 November, 2017, Sofia, Bulgaria.
- 3. Diukendjieva A.**, Alov P., Tsakovska I., Pencheva T., Cronin M., Madden J., Yang C., Pajeva I. *In Silico* Model of PAMPA Permeability as an Estimator of Gastrointestinal Absorption of Bioactive Compounds. *21st European Symposium On Quantitative Structure-Activity Relationship*, 4-8 September 2016, Verona, Italy.
- 4. Diukendjieva A.**, Fratev F. Alov P. Al Sharif M., Pencheva T., Kren V., Tsakovska I., Pajeva I. *In Silico* Study of ADME/Tox Properties of Selected Flavonolignans. 2nd Meeting of Cost Action CM1407 “*Challenging Organic Syntheses Inspired By Nature - From Natural Products Chemistry To Drug Discovery*”, 4-5 April 2016, Madrid, Spain.
- 5. Diukendjieva A.**, Al Sharif M., Alov P., Pencheva T., Kren V., Tsakovska I., Pajeva I. Adme/Tox Properties and Biochemical Interactions of Silybin Congeners: *In Silico* Study. *9th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries – 9th CMAPSEEC*, 11 – 12 June 2015, Plovdiv, Bulgaria.

НАЦИОНАЛНИ НАУЧНИ ФОРУМИ

- 1. Diukendjieva A.**, Al Sharif M., Alov P., Pencheva T., Tsakovska I., Pajeva I. Natural flavonoids from *Silybum marianum* L. (milk thistle): *in vitro* and *in silico* studies of pharmacokinetic properties and toxicity. *Scientific session "Biomedicine and quality of life - young people in science"*, 26 - 27 June 2017, Sofia, Bulgaria.
- 2. Diukendjieva A.**, Alov P., Pencheva T., Tsakovska I., Fratev F., Al Sharif M., Pajeva I. *In Vitro* and *In Silico* Studies of the Membrane Transport of Selected Flavonoids. *Third National Congress On Physical Sciences*, 29 September – 2 October, 2016, Sofia, Bulgaria.
- 3. Diukendjieva A.**, Alov P, Tsakovska I, Pajeva I. QSAR Models For Predicting Transcellular Permeability of Bioactive Compounds,. *9th Workshop "Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products*, 26 – 28 November, 2014, Sofia, Bulgaria.

