

УДК 547.466.6

ИССЛЕДОВАНИЕ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНОГО КОМПЛЕКСА МОНОАММОНИЙНОЙ СОЛИ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ГЛИЦИРАМА) С L-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

¹Джуманазарова А.С., ²Матаипова А.К., ²Маметова А.С., ²Абдуллаева Ж.Д.

¹*Институт химии и фитотехнологий Национальной академии наук*

Кыргызской Республики, Бишкек, e-mail: dzhumanazarova@gmail.com;

²*Ошский государственный университет, Ош, e-mail: mataipova@list.ru, mametova10@mail.ru, jypar.science@oshsu.kg*

В последние три десятилетия большой интерес представляет синтез супрамолекулярных систем (СМС), которые образованы по принципу «хозяин – гость». Такие СМС обладают новыми свойствами, являются достаточно устойчивыми, но при определенных условиях способны распадаться на исходные вещества, при этом растворимость плохо растворимого компонента значительно повышается, обуславливая его большую биодоступность. Базовая биологическая активность в таких СМС не только сохраняется, но и усиливается. Одним из широко и успешно используемых комплексообразующих веществ является моноаммонийная соль глицирризиновой кислоты – глицирам (GC). Нами изучена СМС GC и L-глутаминовой кислоты (L-Glu), синтезированная в твердой фазе. Такая система представляет большой интерес с точки зрения биологической активности, поскольку исходные компоненты обладают уникальными активностями. GC обладает сильными противовоспалительными свойствами и проявляет активирующее влияние на функцию клеток кроветворного микроокружения. L-Glu является энергетическим материалом для ткани мозга и обладает хорошими нейропротекторными свойствами. L-Glu обладает низкой водной растворимостью, получение же СМС с GC способствует повышению ее растворимости. Синтезированная СМС GC с L-Glu изучена с помощью ИК-Фурье, УФ-спектроскопии и рентгенофазовым анализом. Выполненные биологические испытания СМС-препарата на крысах в условиях высокогорья показали хороший нейропротекторный эффект по сравнению с исходными компонентами.

Ключевые слова: супрамолекулярные системы, глицирам, L-глутаминовая кислота, нейропротекторная активность

STUDY OF THE MONOAMMONIUM SALT SUPRAMOLECULAR COMPLEX OF GLYCYRRHIZIC ACID (GLYCYRAM) WITH L-GLUTAMIC ACID

¹Dzhumanazora A.S., ²Mataipova A.K., ²Mametova A.S., ²Abdullaeva Zh.D.

¹*Institute of Chemistry and Phytotechnology of the National Academy of Sciences Kyrgyz Republic, Bishkek, e-mail: dzhumanazarova@gmail.com;*

²*Osh State University, Osh, e-mail: mataipova@list.ru, mametova10@mail.ru, jypar.science@oshsu.kg*

In the last three decades, the synthesis of supramolecular systems (SMS), which formed according to the «host-guest» principle, has been of great interest. Such SMS have new properties, are quite stable, but, under certain conditions, are capable of decomposing into the starting substances, while the solubility of the poorly soluble component increases significantly, causing its greater bioavailability. The basic biological activity in such SMS is not only preserved, but also enhanced. One of the widely and successfully used complexing agent is the monoammonium salt of glycyrrhizic acid – glycyram (GC). We have studied CMC GC and L-glutamic acid (L-Glu) synthesized in the solid phase. Such a system is of great interest from the point of view of biological activity, since the initial components have unique activities. GC has strong anti-inflammatory properties and has an activating effect on the function of cells in the hematopoietic microenvironment. L-Glu is an energetic material for brain tissue and has good neuroprotective properties. L-Glu has a low aqueous solubility, while the preparation of CMC with GC helps to increase its solubility. The synthesized SMS GC with L-Glu was studied using FTIR, UV spectroscopy and X-ray phase analysis. The performed biological tests of the CMC preparation on rats, in high altitude conditions, showed a good neuroprotective effect in comparison with the initial components.

Keywords: supramolecular systems, glycyram, L-glutamic acid, neuroprotective activity

Синтез супрамолекулярных систем (СМС) на основе глицирама (GC) и аминокислот является актуальным и перспективным подходом для получения препаратов с улучшенными и полезными свойствами [1–4]. В работе [5] указывается, что нет принципиальной разницы, когда СМС образует глицирризиновая кислота (GA) или ее моноаммонийная соль – глицирам (GC). По-

этому мы в равной степени рассматривали СМС обеих молекул. Сочетание GA и GC с различными аминокислотами дает препараты с очень полезными свойствами.

Так, показано [6], что комплекс GA и Arg обладает выраженным гепатопротекторным действием, и поэтому он входит в состав различных биологически активных композиций. Сочетание соли GA с аминокисло-

тами аргинином, орнитинном и гистидином оказывает более высокий лечебный эффект, чем свободная GA [7, 8].

В работе [9–11] изучена антиоксидантная активность GA и аминокислот: L-триптофана, L-метионина, L-цистеина, DL-карнитина, природных полифенолов и их СМС. Авторы отмечают, что СМС, полученные на основе GA, оказывали более эффективное антиоксидантное действие, чем отдельно взятые соединения.

Комплексообразование [12] обеспечивает защиту базового препарата от быстрого метаболизма в организме, улучшает его транспорт через биологические мембраны, позволяет пролонгировать эффект действующего вещества за счет повышения аффинности к рецептору органа-мишени.

Исследование супрамолекулярного комплекса между GC и L-Glu представляло интерес с нескольких точек зрения:

– СМС GC и Glu еще не изучена. Такие системы интересны с точки зрения природы сил, которые удерживают компоненты вместе, обуславливая изменения свойств исходных продуктов, главным образом повышая их растворимость в воде, следовательно, повышая биодоступность [13]. L-Glu, в отличие от большинства аминокислот, обладает плохой растворимостью в воде [12];

– представляет интерес синтез комплекса в твердой фазе, поскольку он имеет ряд преимуществ и является более перспективным для таких систем, чем синтез в жидкой фазе [14]. Кроме этого, основанием для выбора твердофазного синтеза послужило то, что в работе [5] с помощью рентгеноструктурного анализа изучено строение кристаллов GC. Авторы констатируют, что молекулы GC расположены относительно друг друга таким образом, что образуют каналы и полости, что, на наш взгляд благоприятствует внедрению в них фармаконов;

– СМС GC и L-Glu представляет интерес с биологической точки зрения. Известно, что L-Glu является энергетическим материалом для ткани мозга. Это связано с ее способностью окисляться в митохондриях через стадию образования кетоглутаровой кислоты с выходом энергии, запасаемой в виде АТФ. L-Glu обладает хорошими нейротропными свойствами.

Хорошо известно, что GC является сильным противовоспалительным средством. Кроме того, в работе [15] показано, что глицирам стимулирует восстановление как гранулоцитарного, так и эритроидного ростка костномозгового кроветворения. Стимулирующий эффект глицирама связан с его активирующим влиянием на функцию клеток кроветворного микроокружения.

Поэтому сочетание таких полезных свойств исходных соединений – GC и L-Glu в одной супрамолекулярной системе представляет значительный практический интерес.

Цель исследования супрамолекулярного комплекса моноаммонийной соли глицирризиновой кислоты (глицирама) с L-глутаминовой кислотой основывается на свойствах супрамолекулярных соединений, которые достаточно устойчивы, но при определенных условиях способны распадаться на исходные вещества, при этом растворимость плохо растворимого компонента значительно повышается, обуславливая его большую биодоступность.

Материалы и методы исследования

Твердофазный синтез. Навеску GC и Glu брали в мольном соотношении 1:1. Механохимическую обработку проводили в планетарной мельнице РМ-200 (Retsch) в течение 3–5 мин.

ИК-спектры исходных соединений и комплекса сняты на ИК-Фурье-спектрометре Agilent Cary 600, прессованные в КВг.

УФ-спектры изучены на спектрофотометре ПЭ-5400. Приготовленные растворы GC и L-Glu, с концентрацией 10^{-4} М, брали в соотношениях GC:L-Glu 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 при постоянном объеме. Смешивание водных растворов компонентов комплекса для съемки УФ-спектров производили на орбитальном мультишейкере Multi PSU-20 в течение 40 мин при комнатной температуре.

Рентгеновский порошковый дифракционный анализ используется для подтверждения физической фазы продукта. Рентгеноструктурные исследования проводились с использованием рентгеновского дифрактометра XPERT-PRO ($\lambda = 1,541874 \text{ \AA}$). Образец порошка отсканирован в диапазоне 2 θ 15–800 40kv/30mA, шаг 2 θ 0,020 при комнатной температуре.

Испытания синтезированных комплексов на биологическую активность проведены на высокогорном полигоне Туя-Ашуу (3500 м, Кыргызстан) в условиях гипоксии [16].

Гипоксия представляет собой универсальный патологический процесс, сопровождающий и определяющий развитие различных патологий. Известно, что наиболее чувствительны к дефициту кислорода головной мозг, эндотелий сосудов, миокард, почки – т.е. ткани, менее приспособленные к анаэробному способу получения энергии.

Опыты проводились на половозрелых крысах-самцах весом 220–260 г в количестве 36 крыс. Эксперимент описан в работе [16].

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ ИК-спектров

ИК-спектр GC (KBr, ν , cm^{-1}): 3197 (OH, NH), 2837 (CH), 1717 (C=O), 1699,8 (C=O), 1647,7 ($\text{C}_{11}=\text{O}$, C=C), 1589 (COO^-), 1456 (CH_2 , CH_3), 1418 (NH_4^+), 1387,6 (CH), 1362 (CH), 1212 (CH), 1165 (C-O-C, C-OH), 1040,6 (C-O-C, C-OH), 981 (=CH).

ИК-спектр Glu (KBr, ν , cm^{-1}): 3064 (NH_3^+), 2741 (OH, NH, CH), 1699 (COOH неионизованная), 1636 (аминокислотная полоса I, NH_3^+), 1558,7 (COO^-), 1506 (аминокислотная полоса II, NH_3^+), 1419 (COO^-), 1349,6 (CH), 1310 (CH), 1256 (CH), 1232 (CH), 1212 (CH), 1149 (CH), 1126 (CH), 1073 (C-O-C, C-OH), 1051 (C-O-C, C-OH), 945 (OH), 911 (OH).

ИК-спектр комплекса GC:Glu (1:1), (KBr, ν , cm^{-1}): 3051 (OH, NH), 1699 (COOH), 1636,9 (аминокислотная полоса I), 1615 (COO^-), 1516 (аминокислотная полоса II), 1420 (COO^-), 1349 (CH), 1310 (CH), 1254 (CH), 1231 (CH), 1151 (CH), 1126 (CH), 1053 (C-O-C, C-OH), 946 (OH), 913 (OH).

Дикарбоновые моноаминокислоты, к которым относится L-Glu, содержат в своём составе протонированную аминогруппу, ионную форму карбоксила, участвующую в образовании цвиттер-ионной формы аминокислоты, а также недиссоциированную форму карбоксила.

Взаимодействие GC с Glu вызывает в ИК-спектрах сдвиги ряда полос поглощения. В образовании комплекса GC и L-Glu участвуют группы COO^- и NH_3^+ аминокислоты, что подтверждается смещением аминокислотной полосы I на 1 cm^{-1} , амино-

кислотной полосы II на 10 cm^{-1} в длинноволновую область. При образовании комплекса GC и L-Glu в его ИК-спектре наблюдается уменьшение интенсивности частот поглощения симметрических валентных колебаний групп COO^- . Значительные изменения претерпевают валентные колебания NH_3^+ аминокислоты: широкая полоса с вершиной в области $3011,4 \text{ cm}^{-1}$ в аминокислоте смещается в область $3051,4 \text{ cm}^{-1}$ в комплексе, что свидетельствует об образовании водородных связей. Неионизованные карбоксильные группы, как GC, так L-Glu, остаются без изменения, следовательно, они не принимают участия во взаимодействии. Значительные изменения претерпевают связи (C-O-C, C-OH) в GC – их интенсивность сильно уменьшается, следовательно, они также участвуют в образовании водородных связей с аминогруппой цвиттер-иона.

Такие изменения спектральных данных можно объяснить электростатическими взаимодействиями цвиттер-ионной формы аминокислоты с ионизованной карбоксильной группой, а также другими функциональными группами GC, содержащими атом кислорода [17].

Анализ УФ-спектров

Из УФ-спектров изоляльных серий GC и L-Glu определено соотношение компонентов, при котором образуется комплекс. Состав комплекса определен методом изоляльных серий [18]. Изоляльные кривые, полученные для смесей GC:L-Glu, приведены на рис. 1 и 2. Наличие изобестической точки (рис. 1) свидетельствует об образовании только одного типа комплекса между веществами.

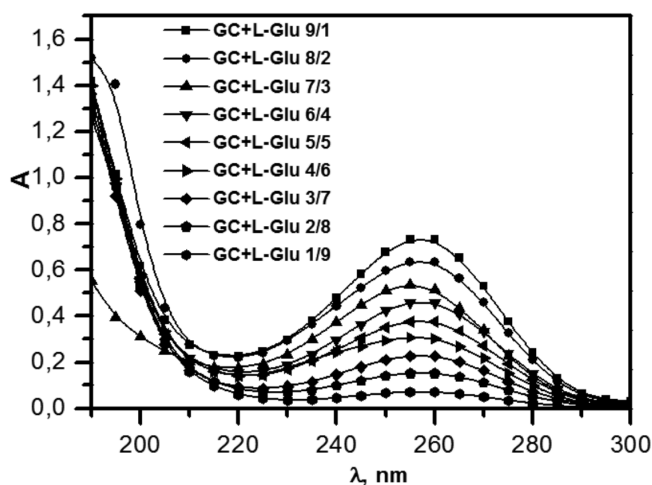


Рис. 1. УФ-спектры поглощения растворов GC и L-Glu в изоляльных соотношениях при pH 7,2

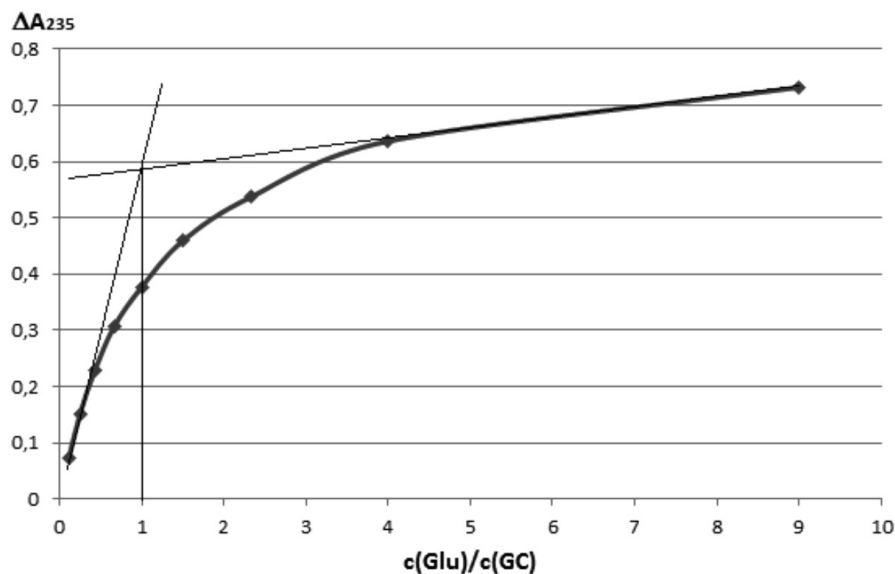


Рис. 2. Зависимость изменения оптической плотности ΔA от соотношения компонентов изомолярной серии при $\lambda = 235$ нм ($c(\text{Glu}) = 10^{-4}\text{M}$, $c(\text{GC}) = 10^{-4}\text{M}$, pH 7,2)

Для компонентов комплексов получено молярное соотношение 1:1 (рис. 2).

Анализ рентгенофазовых спектров

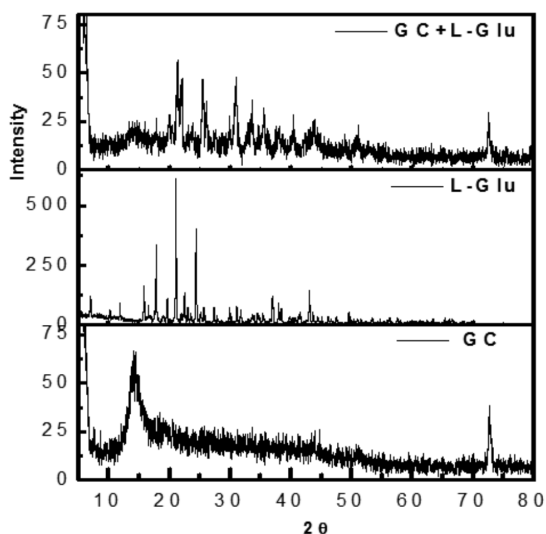


Рис. 3. Дифрактограммы GC; Glu; GC+L-Glu

Из сравнения дифрактограмм исходных соединений GC, L-Glu и дифрактограммы комплекса GC+L-Glu можно видеть снижение интенсивности рефлексов GC, а также снижение интенсивности и уширение рефлексов L-Glu, что может свидетельствовать о значительной потере кристалличности L-Glu. Данный эффект может быть связан с молекулярным диспер-

гированием L-Glu в твердую фазу комплексообразователя с образованием комплексов.

Выводы из биологических испытаний

L-Glu в комплексе с GC оказывают выраженное нейропротекторное действие по сравнению с исходными компонентами. Клетки мозга и кардиомиоциты были с более выраженными ядрами и цитоплазмой. Хорошо сохранилась поперечная исчерченность миофибрилл сердечной ткани. Пирамидальные клетки и клетки нейроглии хорошо выражены. Данная картина возможна из-за митохондриальной активности и аккумуляции АТФ в этих клетках за счет препаратов L-Glu в комплексе с GC.

Заключение

Проведенные исследования позволили установить, что при твердофазном синтезе между GC и L-Glu образуется супрамолекулярный комплекс с соотношением компонентов 1:1, удерживаемый за счет электростатических взаимодействий, за счет образования водородных связей между компонентами и изменения их кристаллической структуры. Комплекс обладал более выраженным нейропротекторным эффектом в условиях гипоксии, по сравнению с исходными соединениями, и может представлять интерес для практического использования.

Список литературы

1. Zhu H., Wang H., Shi B., Shanguan L., Tong W., Yu G., Mao Z., Huang F. Supramolecular peptide constructed by mo-

lecular Lego allowing programmable self-assembly for photodynamic therapy. *Nat Commun.* 2019. 3. 10 (1). P. 2412.

2. Martins J.N., Lima J.C., Basílio N. Selective Recognition of Amino Acids and Peptides by Small Supramolecular Receptors. *Molecules.* 2020. Vol. 26 (1). P. 106–151.

3. Bera S., Mondal S., Rencus-Lazar S., Gazit E. Organization of Amino Acids into Layered Supramolecular Secondary Structures. *Acc Chem Res.* 2018. Vol. 51 (9). P. 2187–2197.

4. Bera S., Xue B., Rehak P., Bera S., Xue B., Rehak P., Jacoby G., Ji W., Shimon L.J.W., Beck R., Král P., Cao Y., Gazit E. Self-Assembly of Aromatic Amino Acid Enantiomers into Supramolecular Materials of High Rigidity. *ACS Nano.* 2020. Vol. 14 (2). P. 1694–1706.

5. Tykarska E., Sobiak S., Gdaniec M. Supramolecular Organization of Neutral and Ionic Forms of Pharmaceutically Relevant Glycyrrhizic Acid-Amphiphile Self-Assembly and Inclusion of Small Drug Molecules. *Growth. Des.* 2012. Vol. 12. P. 2133–2137.

6. Алмакаева Л.Г., Литвинова Е.В. Аргинин и его применение в медицине и фармации // *Ліки України плюс.* 2011. № 1. С. 23–26.

7. Какегава К. Заявка. 44-11913, 30.05.84. Япония. Соли глицирризиновой кислоты. Марудзэнфармац.

8. Яковичин Л.А., Гришконец В.И., Корж Е.Н. Супрамолекулярный комплекс моноаммонийной соли глицирризиновой кислоты (глицирама) с кофеином // *Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия.* 2017. № 3. С. 270–277.

9. Francioso A., Conrado A.B., Mosca L., Fontana M. Chemistry and Biochemistry of Sulfur Natural Compounds: Key Intermediates of Metabolism and Redox Biology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2020, Article ID 8294158. P. 27.

10. Hwang H.S., Winkler-Moser J.K., Liu S.X. Study on Antioxidant Activity of Amino Acids at Frying Temperatures and Their Interaction with Rosemary Extract, Green Tea Extract, and Ascorbic Acid. *J Food Sci.* 2019. No. 84 (12). P. 3614–3623.

11. Далимова С.Н., Кузиев Ш.Н., Далимов Д.Н., Умарова Г.Б., Мухамаджанова Г.М., Абдуллаева У.А. Скрининг антиоксидантной активности супрамолекулярных комплексов, созданных на основе природных соединений // *Журн. теорет. и клин. медицины.* 2017. № 3. С. 14–17.

12. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты. Пептиды. Белки. Под ред. докт. хим. наук, проф. Ю.В. Митина. М.: «Мир», 1985. 82 с.

13. Толстиков Т.Г., Толстиков А.Г., Толстикова Г.А. На пути к малодозным лекарствам // *Вестн. РАН.* 2007. Т. 77. № 10. С. 867–874.

14. Метелева Е.С., Душкин А.В., Толстикова Т.Г., Хвостов М.В. Создание лекарственных препаратов повышенной эффективности механохимического комплексования глицирризиновой кислоты с фармаконами // *Актуальные проблемы химии природных соединений: тез. докл. Междунар. конф. Ташкент (Узбекистан).* 2010. С. 64.

15. Дыгай А.М., Жданов В.В., Хлусов И.А., Любавина П.А., Новицкий Е.В., Кусмарцев С.А., Гольдберг Е.Д. О возможности стимуляции глицирамом костномозгового кроветворения в условиях цитостатической гемодепрессии // *Эксп. и клин. фармакология.* 1995. Т. 58. № 2. С. 40–42.

16. Джуманазарова А.З., Матаипова А., Кадыралиев Т.К., Райымбеков Ж.К., Курамаева Т.Э., Маметова А., Кундашев У.К. Биологические испытания в условиях высокогорья комплексов глицирама с L-глутаминовой и D-аспарагиновой кислотами // *Здравоохранение Кыргызстана.* 2017. № 3. С. 52–57.

17. Яковичин Л.А., Гришконец В.И., Корж Е.Н. Супрамолекулярные комплексы моноаммонийной соли глицирризиновой кислоты (глицирама) с L-аргинином и глицином // *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Сер. «Биология, химия».* 2014. Т. 27 (66). № 4. С. 131–137.

18. Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. 5-е изд. Л.: Химия, 1986. 432 с.