

Полные статьи

УДК 544.16; 615.322; 577.352

Исследование мембраномодифицирующей активности глицирризиновой кислоты

О. Ю. Селютина,^{а,б} И. Е. Апанасенко,^{а,б} Н. Э. Поляков^а*

*^аИнститут химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского
Сибирского отделения Российской академии наук,
Российская Федерация, 630090 Новосибирск, ул. Институтская, 3.
E-mail: olga.gluschenko@gmail.com*

*^бНовосибирский государственный университет,
Российская Федерация, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2*

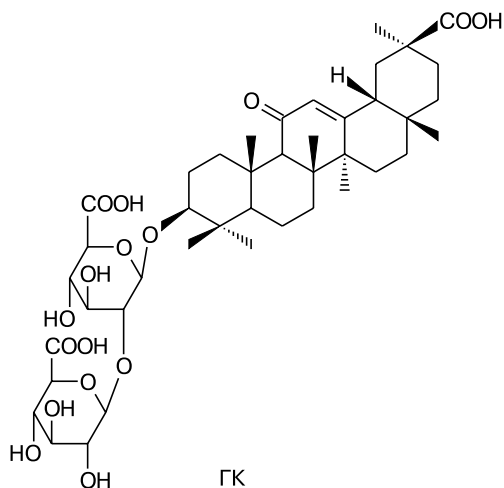
Глицирризиновая кислота благодаря своей амфифильности может образовывать комплексы со множеством гидрофобных лекарственных соединений, что сопровождается значительным снижением терапевтической дозы лекарства. Кроме того, она оказывает сильное влияние на проницаемость и упругость клеточных мембран. Для выяснения молекулярного и клеточного механизмов наблюдаемых эффектов в настоящей работе методом ЯМР-релаксации было исследовано влияние глицирризиновой кислоты на динамику липидов внутри мембраны. Установлено, что глицирризиновая кислота способна встраиваться в мембрану, увеличивая подвижность липидов.

Ключевые слова: глицирризиновая кислота, глицирризин, эритроциты, мембраны, подвижность липидов, холестерин, доставка лекарств.

В настоящее время фармацевтические компании тратят миллиарды долларов на поиск и разработку средств доставки лекарственных препаратов, обладающих низкой растворимостью и биодоступностью. Одним из решений данной проблемы может быть использование наноразмерных агрегатов для повышения растворимости лекарственных соединений и их адресной доставки к очагам заболевания. За последние годы появилось много публикаций, посвященных биологической активности глицирризиновой кислоты, что открывает широкие перспективы для ее использования в качестве агента для доставки лекарственных соединений^{1,2}.

Глицирризиновая кислота (глицирризин, ГК) — тритерпеновый сапонин из экстракта корней солодки. В 2012 г. солодка была названа «лекарственным растением года»¹, а ГК является ее основным действующим агентом.

Глицирризиновая кислота обладает широким спектром биологической активности и используется для лечения различных заболеваний, от обычной простуды до язвы желудка и двенадцатиперстной кишки^{3,4}. Кроме того, в присутствии ГК наблюдается значительное усиление терапевтического действия многих лекарственных соединений, а в некоторых случаях даже изменение его механизма^{2–4}. С целью выяс-



нения молекулярного и клеточного механизма действия ГК был проведен целый ряд физико-химических исследований ее свойств. Установлено, что благодаря наличию гидрофильной и гидрофобной частей в структуре глицирризиновой кислоты способна образовывать прочные комплексы со многими органическими молекулами^{5–9}, а в водных и водно-спиртовых растворах формировать самоассоциаты^{8–14}. При этом структура ассоциатов зависит от концентрации ГК и от pH раствора. Так, при низких концентрациях (10^{-3} – 10^{-5} моль·л⁻¹) ГК существует в растворах преимущественно в виде димеров, в то время как при высоких концентрациях ($>10^{-3}$ моль·л⁻¹) образуются крупные мицеллоподобные агрегаты^{15,16}.

В предыдущих работах нами было установлено, что ГК способна формировать нерастворимые комплексы с холестерином и продуктами его окисления^{17,18}. Вместе с тем известно, что холестерин является важной составляющей клеточных мембран, ответственной за их физические свойства, в частности за вязкость и проницаемость. Таким образом, на основании полученных результатов можно предположить, что одним из механизмов биологической активности ГК как переносчика лекарственных препаратов является ее воздействие на свойства клеточных мембран. Дальнейшие исследования показали, что ГК оказывает существенное влияние на упругость мембран, а также на их проницаемость для малых молекул¹⁹. Кроме того, было установлено, что воздействие ГК приводит к «омоложению» эритроцитов и усилению их осмотической стойкости²⁰.

Однако молекулярный и клеточный механизм воздействия ГК по-прежнему требует дальнейшего более глубокого изучения. Установленные нами ранее факты позволяют предположить два возможных механизма: 1) ГК встраивается в мембраны и локально «раздвигает» липидный слой, что приводит к увеличению диффузионной проницаемости мембраны для малых молекул; 2) ГК извлекает мембранный холестерин, что приводит к снижению жесткости мембраны и облегчает проникновение молекул через нее. С целью выяснения, какой из этих механизмов реализуется на практике, методом ЯМР-релаксации были проведены эксперименты по изучению подвижности липи-

дов внутри мембраны на модели эритроцитов и липосом различного состава.

Экспериментальная часть

Материалы. Образцы крови помещали в фосфатно-солевой буфер производства фирмы «Биолот» (pH 7.3), содержащий NaCl (0.137 моль·л⁻¹) и KCl (0.0027 моль·л⁻¹). Для анализа использовали клетки крови человека и крысы. Для экспериментов с липосомами использовали фосфатидилхолин (Egg-PC, «Sigma Aldrich») и холестерин («MP Biomedicals»).

Подготовка образцов. Суспензию эритроцитов получали из трижды центрифугированной крови крыс (200 г, 5 мин). Каждый раз после центрифугирования надосадочную жидкость замещали свежим буферным раствором (в дейтерированной воде, pH 7.4). Проводили два типа экспериментов с концентрацией ГК как во много раз превышающей концентрацию липида в суспензии (эксперименты с малым количеством крови), так и во много раз меньшей (эксперименты с большим количеством крови).

Многослойные липосомы готовили по стандартной методике²¹. Для приготовления многослойных липосом производили предварительное растворение компонентов в хлороформе. Затем раствор высушивали под потоком воздуха, оставшуюся пленку растворяли в воде. В качестве контрольного образца использовали липосомы из липида Egg-PC в дейтерированной воде. В экспериментах с ГК липидную пленку помещали в раствор в дейтерированной воде. Использовали несколько типов образцов: контрольный (чистый липид в дейтерированной воде), липид в растворе ГК, липид + холестерин в дейтерированной воде. Соотношение концентраций липид : холестерин составляло 4 : 1.

Проведение измерений. Изучение подвижности липида производили методом ЯМР-релаксации: время спин-спиновой релаксации протонов напрямую связано с подвижностью молекул и обратно пропорционально времени вращательной корреляции^{22–26}, уменьшение времени релаксации означает уменьшение подвижности молекулы. Спектры ЯМР ¹H растворов в D₂O регистрировали на спектрометре «Bruker AVANCE III 500» (Германия) на частоте 500 МГц. Измерение времен фазовой релаксации проводили с использованием стандартной последовательности Кара—Парсела—Мебума—Гилла (CPMG).

Обсуждение полученных результатов

Влияние ГК на подвижность липидов в мембране эритроцитов. Известно, что времена спин-решеточной и спин-спиновой релаксации протонов (T_1 и T_2 соответственно) очень чувствительны к межмолекулярным взаимодействиям, а также к вращательной и диффузионной подвижности молекул²⁷. В связи с этим метод можно использовать для исследования межмолекулярных взаимодействий и комплексов включения^{22–26}. Когда молекулы в связанном и свободном состоянии находятся в состоянии быстрого обмена, изменение сигнала ЯМР при варьировании задержки описывается моноэкспоненциальным законом, в случае же так называемого медленного обмена (по сравнению с временем релаксации) наблюдается биэкспоненциальная кинетика:

$$A(t) = P_1 \exp(-t/T_{21}) + P_2 \exp(-t/T_{22}),$$

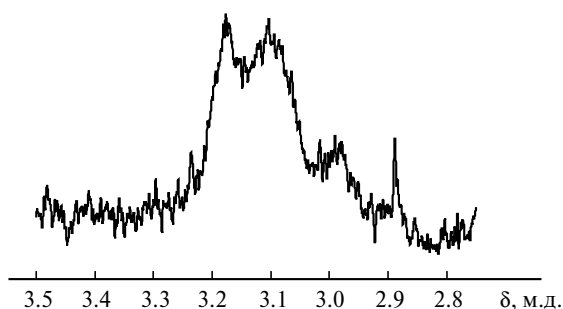


Рис. 1. Фрагмент спектра ЯМР ^1H эритроцитов в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4.

где A — интенсивность сигнала ЯМР, T_{21} и T_{22} — времена спин-спиновой релаксации молекул в связанном и свободном состоянии, P_1 и P_2 — доли молекул в связанном и свободном состоянии, t — время.

На рисунке 1 представлен фрагмент спектра ^1H ЯМР эритроцитов. Сигнал при δ 3.1 м.д. принадлежит метильным протонам группы $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, расположенной в полярной «голове» липида в мембране²⁸.

Нами была проведена серия экспериментов с малым количеством крови (50 мкл на ампулу 0.6 мл) и различными концентрациями ГК в растворе (0, 0.5, 1, 2, 5 ммоль \cdot л $^{-1}$). Для чистых эритроцитов, не обработанных ГК, кинетика спада сигнала эха носит моноэкспоненциальный характер со временем релаксации 10 мс. На рисунке 2 приведена кинетика спада сигнала эха от липида, обработанного ГК (2 и 5 ммоль \cdot л $^{-1}$).

Видно, что в обоих случаях кинетика имеет биэкспоненциальный характер. Короткие времена релаксации составляют 10 и 18 мс соответственно, а время медленной релаксации — 50 мс, что в пять раз превышает время релаксации протонов липида в отсутствие ГК. Короткая компонента релаксации составляет ~50% в обоих случаях. Так как клеточная мембрана имеет вид бислоя, то в спектре наблюдается сигнал как от внешнего, так и от внутреннего слоя. При добавлении ГК, вероятно, воздействию подвергается только внешний слой, что приводит к появлению биэкспоненциальной кинетики с соотношением длинной и короткой компоненты 1 : 1. Полученный результат означает существенное увеличение подвижности верхнего слоя мембраны, обработанной ГК.

Изменение подвижности глицеризиновой кислоты.

Для выяснения вопроса о возможности встраивания молекул ГК в липидный слой мембраны методом ЯМР-релаксации была изучена подвижность самой ГК в суспензии эритроцитов. Для этого были проведены эксперименты с большим количеством крови (0.3 мл на ампулу 0.6 мл). На рисунке 3 приведены спектры ЯМР ^1H эритроцитов и ГК (5 ммоль \cdot л $^{-1}$). В качестве сигнала от ГК был выбран пик при δ 1.13 м.д.

На рисунке 4 представлена кинетика спада сигнала эха в логарифмических координатах при δ 1.13 м.д. для раствора ГК (5 ммоль \cdot л $^{-1}$), а также для смеси эритроцитов и ГК той же концентрации.

Времена релаксации приведены в таблице 1. Эритроциты не имеют сигнала в этой области спектра. Для

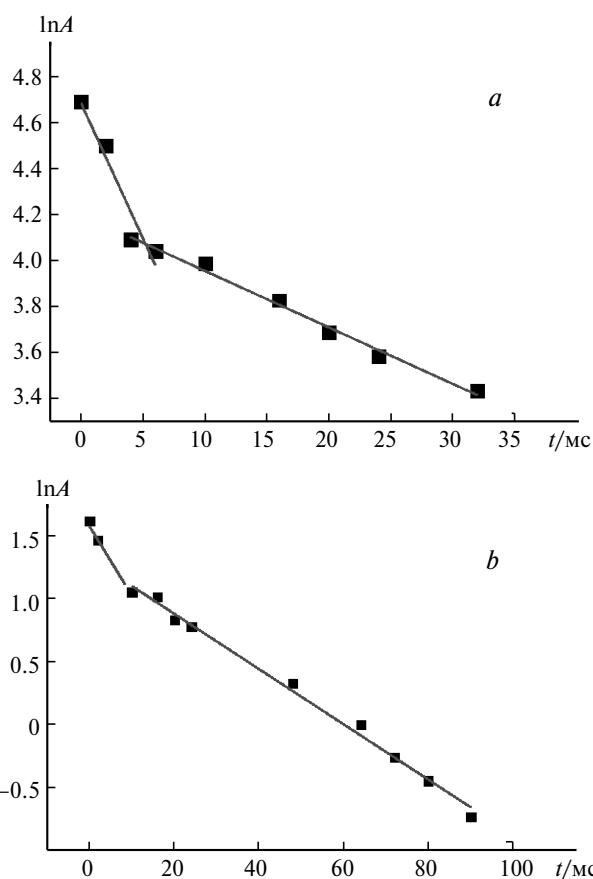


Рис. 2. Кинетика спада сигнала эха при δ 3.1 м.д. (сигнал метильных протонов группы $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ липидов, обработанных ГК с концентрацией 2 (a) и 5 ммоль \cdot л $^{-1}$ (b)).

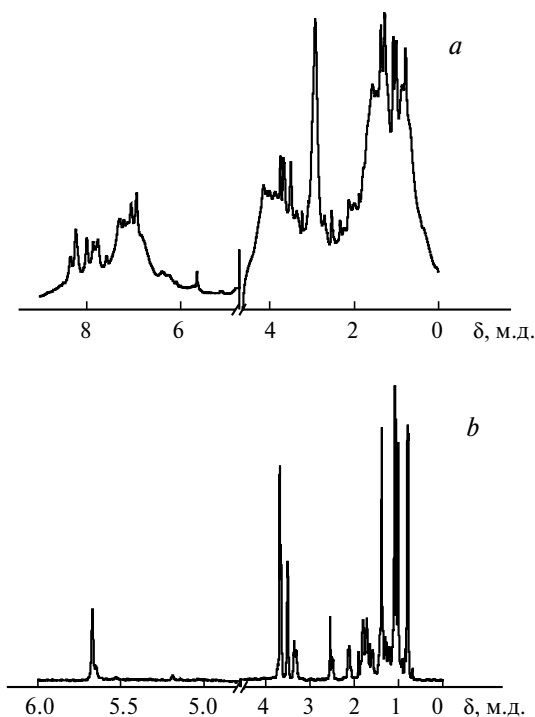


Рис. 3. Спектры ЯМР ^1H чистых эритроцитов (a) и ГК (b) в фосфатно-солевом буфере, pH 7.4 (концентрация ГК 5 ммоль \cdot л $^{-1}$).

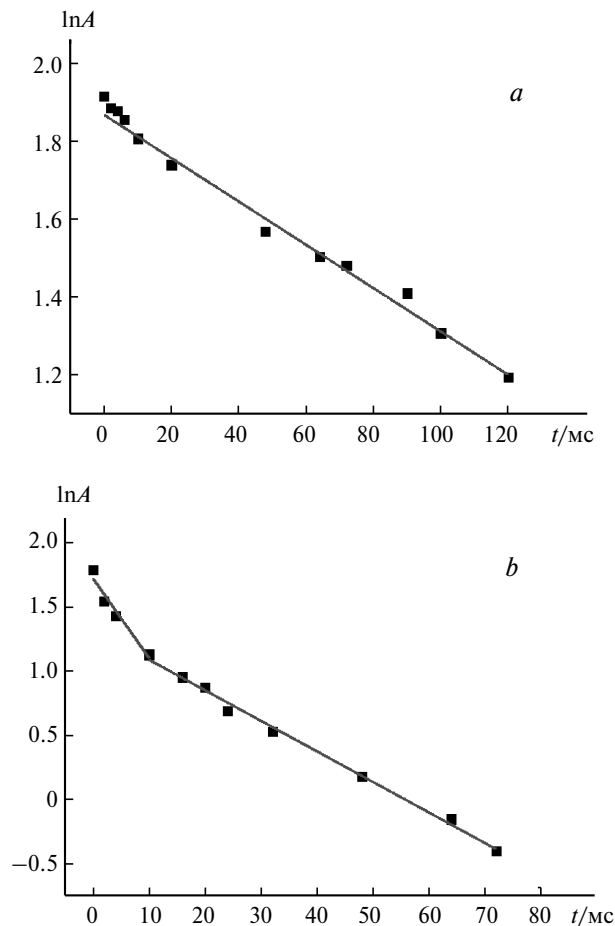


Рис. 4. Кинетика спада сигнала эха при δ 1.13 м.д.: ГК (а) и смесь эритроцитов и ГК (б) в фосфатно-солевом буфере, рН 7.4 (концентрация ГК 5 ммоль \cdot л $^{-1}$).

Таблица 1. Времена спин-спиновой релаксации (мс) для эритроцитов (быстрая компонента — T_{21} , медленная — T_{22})

Соединение	T_{21}	T_{22}
ГК*	—	180
Эритроциты + ГК*	16	40

* Концентрация ГК 5 ммоль \cdot л $^{-1}$.

чистой ГК кинетика носит моноэкспоненциальный характер, для смеси наблюдается биэкспоненциальная зависимость. Кроме того, в кинетике для смеси не наблюдается присутствия медленной компоненты со временем, близким к времени релаксации свободной ГК. Это означает, что вся ГК находится в связанном виде.

Влияние ГК на подвижность липидов в липосомах. В экспериментах с липосомами для анализа был выбран сигнал от липида при δ 3.2 м.д. Для всех трех образцов (чистый липид, липид + холестерин (5 ммоль \cdot л $^{-1}$), липид + ГК (5 ммоль \cdot л $^{-1}$)) наблюдалась биэкспоненциальная кинетика спада сигнала эха. Времена релаксации приведены в таблице 2. Следует отметить, что на модели липосом также происходит увеличение времени релаксации в присутствии ГК.

Таблица 2. Времена спин-спиновой релаксации (мс) для многослойных липосом (быстрая компонента — T_{21} , медленная — T_{22})

Соединение	T_{21}	T_{22}
Чистый липид	6	30
Липид + холестерин*	5	45
Липид + ГК*	7	45

* Концентрация ГК и холестерина 5 ммоль \cdot л $^{-1}$.

Наблюдаемая биэкспоненциальная кинетика для сигнала от липида может быть связана с тем, что в экспериментах использовались многослойные липосомы и подвижность $N^+(\text{CH}_3)_3$ -групп в разных слоях могла различаться. Следует отметить, что воздействие ГК на подвижность $N^+(\text{CH}_3)_3$ -групп липида аналогично действию холестерина. Указанная группа находится в полярной «голове» липида, и при встраивании как ГК, так и холестерина в бислой происходит «раздвижение» полярных «голов» друг относительно друга, что обуславливает большую подвижность, чем в исходном бислое. В то же время воздействие холестерина и ГК на подвижность гидрофобных «хвостов» липида может различаться: известно, что встраивание холестерина делает мембраны более жесткими и упорядоченными²⁹, в то время как под действием ГК мембраны становятся менее жесткими^{19,20}.

Таким образом, нами установлено, что воздействие ГК приводит к увеличению времени спин-спиновой релаксации липида при ее избытке и к уменьшению времени спин-спиновой релаксации самой ГК при ее недостатке. Время спин-спиновой релаксации — параметр, тесно связанный с вращательной подвижностью молекул. Короткое время релаксации соответствует менее подвижным молекулам или связанному состоянию, а длинное время релаксации — более подвижным молекулам или свободному состоянию. Полученные данные подтвердили связывание ГК с клеточными мембранами. Кроме того, можно объяснить установленный в предыдущих работах факт увеличения проницаемости мембран эритроцитов для малых молекул в присутствии ГК: локальное увеличение подвижности липидов позволяет малым молекулам слегка «раздвинуть» липидный слой и облегчить диффузионное проникновение молекулы внутрь клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 15-04-02538).

Список литературы

1. S. Sakamoto, H. Nakahara, T. Uto, Y. Shoyama, *BBA-Biomembranes*, 2013, **1828**, 1271.
2. S. Nafisi, F. Manouchehri, M. Bonsaii, *J. Photochem. Photobiol.*, 2012, **111**, 273; T. G. Tolstikova, M. Khvostov, A. O. Bryzgalov, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2009, **9**, 1317.
3. Г. А. Толстикова, Л. А. Болтина, В. П. Гранкина, Р. М. Кондратенко, Т. Г. Толстикова, *Солодка. Биоразнообра-*

- зие, химия, применение в медицине, Изд-во «Гео», Новосибирск, 2007, 238.
4. G. A. Tolstikov, L. A. Baltina, E. E. Shults, A. G. Pokrovskii, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 1997, **23**, 625.
 5. N. E. Polyakov, T. V. Leshina, *The Open Conf. Proc. J.*, 2011, **2**, 64.
 6. V. A. Vavilin, N. F. Salakhutdinov, Yu. I. Ragino, N. E. Polyakov, M. B. Taraban, T. V. Leshina, E. M. Stakhneeva, V. V. Lyakhovich, Yu. P. Nikitin, G. A. Tolstikov, *Biomed. Chem.*, 2008, **54**, 301.
 7. Yu. I. Ragino, V. A. Vavilin, N. F. Salakhutdinov, S. I. Makarova, E. M. Stakhneeva, O. G. Safronova, Yu. P. Nikitin, G. A. Tolstikov, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2008, **145**, 285.
 8. V. S. Kornievskaya, A. I. Kruppa, N. E. Polyakov, T. V. Leshina, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2007, **60**, 123.
 9. K. C. James, J. B. Stanford, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1962, **5**, 445.
 10. R. J. Gilbert, K. C. James, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1964, **16**, 394.
 11. E. Azaz, R. Segal, *Pharm. Acta Helv.*, 1980, **55**, 183.
 12. M. Kondo, H. Minamino, G. Okiyama, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1986, **37**, 177.
 13. M. Maskan, *J. Food Process Eng.*, 1999, **39**, 389.
 14. T. V. Romanenko, Yu. I. Murinov, *J. Phys. Chem. B*, 2001, **75**, 1601.
 15. В. С. Корниевская, А. И. Круппа, Н. Э. Поляков, Т. В. Лешина, *Вестн. НГУ, Сер. физ.*, 2007, **2**, 21.
 16. V. S. Kornievskaya, A. I. Kruppa, N. E. Polyakov, T. V. Lyoshina, *J. Phys. Chem.*, 2007, **111**, 11447.
 17. O. Yu. Gluschenko, N. E. Polyakov, T. V. Leshina, *Appl. Magn. Res.*, 2011, **41**, 283.
 18. О. Ю. Глущенко, Н. Э. Поляков, Т. В. Лешина, *Химия в интересах устойчивого развития*, 2011, **6**, 649.
 19. O. Yu. Selyutina, N. E. Polyakov, D. V. Korneev, B. N. Zaitsev, *Drug Delivery*, 2014, DOI: 10.3109/10717544.2014.919544.
 20. О. Ю. Селютина, Н. Э. Поляков, Д. В. Корнеев, Б. Н. Зайцев, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2014, 1201 [O. Yu. Selyutina, N. E. Polyakov, D. V. Korneev, B. N. Zaitsev, *Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.)*, 2014, **63**, 1201].
 21. Е. А. Котова, А. П. Полозкова, Т. В. Денисова, И. И. Краснюк, Н. А. Оборотова, *Хим.-фарм. журн.*, 2011, **45**, 37 [*Pharm. Chem. J.*, 2011, **45**].
 22. N. E. Polyakov, V. K. Khan, M. B. Taraban, T. V. Leshina, *J. Phys. Chem. B*, 2008, **112**, 4435.
 23. А. В. Душкин, Е. С. Метелева, Т. Г. Толстикова, Г. А. Толстиков, Н. Е. Поляков, Е. Н. Медведева, Н. А. Неворова, В. А. Бабкин, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2008, 1274 [A. V. Dushkin, E. S. Meteleva, T. G. Tolstikova, G. A. Tolstikov, N. E. Polyakov, E. N. Medvedeva, N. A. Neverova, V. A. Babkin, *Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.)*, 2008, **56**, 1299].
 24. А. В. Душкин, Ю. С. Чистяченко, Т. Г. Толстикова, М. В. Хвостов, Н. Э. Поляков, Н. З. Ляхов, Г. А. Толстикова, *Докл. АН*, 2013, **451**, 107 [*Dokl. Chem. (Engl. Transl.)*, 2013, **451**].
 25. Yu. S. Chistyachenko, A. V. Dushkin, N. E. Polyakov, M. V. Khvostov, T. G. Tolstikova, G. A. Tolstikov, N. Z. Lyakhov, *Drug Deliv.*, 2014, DOI: 10.3109/10717544.2014.884655.
 26. I. E. Apanasenko, O. Yu. Selyutina, N. E. Polyakov, L. P. Suntsova, E. S. Meteleva, A. V. Dushkin, P. Vachali, P. S. Bernstein, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2015, DOI: 10.1016/j.abb.2014.12.010
 27. J. W. Emsley, J. Feeney, L. H. Sutcliffe, *High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Pergamon Press, Oxford, 1966, 1154.
 28. T. James, *Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry*, Academic Press, 1975, 413.
 29. Ч. Кантор, П. Шиммель, *Биофизическая химия*, т. 3, Мир, Москва, 1985, 537 [Ch. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry*, V. 3, 1980, 536].

Поступила в редакцию 15 января 2015