

УДК 544.35

**МОДЕЛИРОВАНИЕ АССОЦИАТОВ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ
С ХОЛЕСТЕРИНОМ В МЕТАНОЛЕ****А.В. Аникеенко^{1,2}, М.В. Зеликман^{1,2}, Е.Д. Кадцын^{1,2}, Н.Н. Медведев^{1,2}**¹*Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, Новосибирск, Россия*

E-mail: nikmed@kinetics.nsc.ru

²*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Россия**Статья поступила 1 марта 2016 г.*

Имеются экспериментальные указания на то, что в растворе глицирризиновой кислоты (ГК) и холестерина в метаноле молекулы холестерина имеют два типа различных окружений. Одно соответствует свободным молекулам, а другое — ассоциированным с ГК. Однако природа этих ассоциатов остается неясной. Мы провели полноатомное молекулярно-динамическое моделирование растворов ГК в метаноле. Показано, что в отличие от водных растворов в метаноле не образуется малых устойчивых кластеров ГК, в том числе в присутствии холестерина. Возникающие малые ассоциаты не имеют четких структур и существуют не дольше, чем десятки наносекунд. Оценены концентрации этих кластеров и константы их устойчивости. Предполагается, что для объяснения экспериментальных данных необходимо допустить существование более крупных ассоциатов.

DOI: 10.15372/JSC20170207

Ключевые слова: молекулярно-динамическое моделирование, водные растворы, глицирризиновая кислота, холестерин, метанол, структура ассоциатов.

ВВЕДЕНИЕ

В народной медицине широко известен экстракт из корня солодки, который содержит глицирризиновую кислоту (ГК) и используется для лечения и профилактики различных заболеваний [1, 2]. В работах [3—10] было отмечено, что ГК помогает растворению некоторых малорастворимых лекарственных молекул, однако детальный механизм этого до конца не понят. Недавнее молекулярно-динамическое моделирование димеров ГК в воде в присутствии молекулы холестерина показало, что при низких концентрациях молекулы ГК образуют устойчивые димеры, а при наличии гидрофобной молекулы (холестерина) возникают устойчивые ассоциаты, в которых молекула холестерина располагается рядом с димером [11]. Для растворов в метаноле такие работы не проводились. Однако ассоциация молекул ГК и холестерина в метаноле исследована методом ЯМР в работе [12], где было показано, что существует два типа локального окружения холестерина, которые можно интерпретировать как свободные и ассоциированные с ГК молекулы холестерина. Оценки показали, что стехиометрия таких ассоциатов ГК/холестерин составляет 2:1. Однако природа таких комплексов остается неясной, не известны ни их размеры, ни время жизни.

В данной работе мы изучаем ассоциацию молекул ГК с холестерином в метаноле, используя полноатомное молекулярно-динамическое моделирование, что позволяет получить данные о строении и свойствах малых ассоциатов.

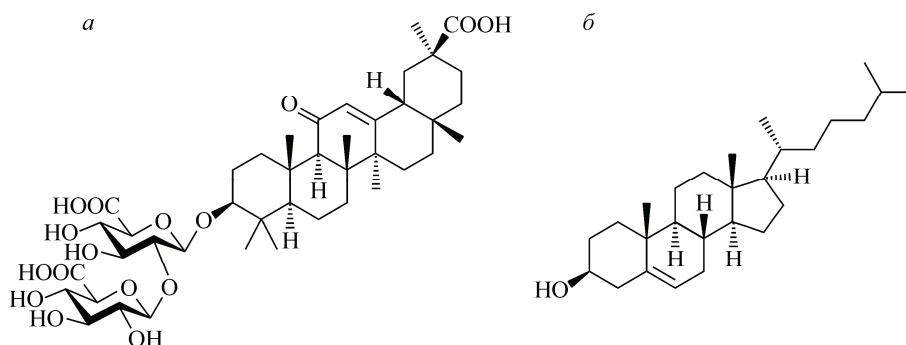


Рис. 1. Молекула глицирризиновой кислоты (а) и холестерина (б)

МОДЕЛИРОВАНИЕ

Известны два изомера ГК, отличающиеся *транс*—*цис*-конформацией в тритерпеновом агликоне [13—15]. Эти формы ГК несколько различаются по физическим свойствам, в частности, в способности к гелеобразованию [15, 16]. В литературе их обозначают как α - и β -формы, причем в природе встречается в основном β -форма. Кроме того, имеются различные конформации за счет типа гликозидных связей, одна из которых связывает между собой сахарные остатки, а другая присоединяет их к терпеновому остову (рис. 1, а). Возможны две различные конфигурации этих связей, которые также называют α - и β -связями. В природной ГК обе гликозидные связи имеют β -конфигурацию [14, 15]. На эту особенность строения ГК иногда не обращают внимание при моделировании и работают с α -связями, хотя в природе встречаются только β -связи. В данной работе мы использовали как α -, так и β -гликозидные связи. В обоих случаях терпеновый остов был в природной β -форме.

В случае α -связей использовали параметризацию ГК из нашей предыдущей работы [11]. Параметризацию для β -связей мы не нашли в литературе, поэтому провели свою с использованием полей сил GAFF (для агликона) [17] и GLYCAM (для глюкуроновых кислот в дисахаридной части) [18]. Для холестерина была взята параметризация из поля Amber [19], для метанола TraPPE [20].

Молекулярно-динамическое моделирование проводили в пакете Gromacs [21]. Шаг моделирования составлял 2 фс, радиус обрезания взаимодействий 1 нм, электростатическое взаимодействие рассчитывали методом Particle Mesh Ewald, валентные колебания связей с участием атомов водорода ограничивались алгоритмом LINCS. Температуру в системе поддерживали двумя отдельными термостатами v-rescale, один для растворенных молекул, а другой для растворителя. Давление в модельном боксе с периодическими граничными условиями поддерживали баростатом Парринелло—Рамана и оно составляло 1 бар для всех моделей. Для визуализации конфигураций модели использовали программу VMD [22]. Используемые молекулы показаны на рис. 1.

ДИМЕРЫ ГК В МЕТАНОЛЕ

В работе [11] для установления ассоциации молекул ГК в молекулярно-динамическом моделировании было предложено рассчитывать энергию леннард-джонсовского взаимодействия E_{LJ} между атомами молекул, не связанных ковалентными связями. В пакете Gromacs предусмотрена возможность вычислять энергию взаимодействия между атомами заданной группы. В данном случае это атомы молекул ГК, за пределами 1—4 взаимодействий [23]. Эта энергия не имеет специального физического смысла и используется нами исключительно как удобная мера для установления факта сближения молекул. (Заметим, что E_{LJ} немного отличается от реальной энергии леннард-джонсовского взаимодействия между разными молекулами ГК, поскольку в нашем случае учитывает также леннард-джонсовское взаимодействие между удален-

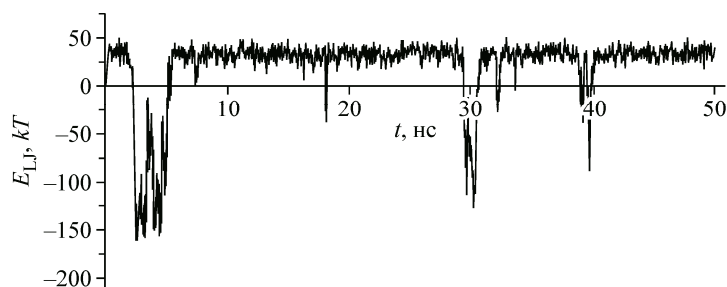


Рис. 2. Поведение энергии леннард-джонсовского взаимодействия E_{LJ} двух молекул ГК в растворе метанола при молекулярно-динамическом моделировании. Выбросы на кривой указывают, что в данный момент времени молекулы находятся в контакте

ными (по связям) атомами одной молекулы, которые могут сближаться при изгибании молекулы. Однако это не сказывается на выделении ассоциата.)

При сближении молекул величина E_{LJ} испытывает резкий скачок. На рис. 2 показано поведение энергии E_{LJ} для модели, где в модельной ячейке с метанолом растворены две молекулы ГК. Видно, что встретившиеся молекулы ГК вскоре расходятся. Отметим, что в воде наблюдается другое поведение: сблизившиеся молекулы ГК больше не расходятся до конца моделирования, см. работу [11] и рис. 2 в ней. Кроме того, в метаноле E_{LJ} -взаимодействие для пары молекул ГК не превышает по величине 160 kT , тогда как в воде было около 250 kT . Таким образом, моделирование показывает, что молекулы ГК в метаноле не образуют устойчивых пар, как было в воде. Подчеркнем, что в этих расчетах мы использовали ГК как с α -, так и с β -гликозидными связями, и в обоих случаях молекулы ГК показали отсутствие стремления к ассоциации.

АНАЛИЗ МАЛЫХ АССОЦИАТОВ В РАСТВОРЕ

Для более подробного изучения малых ассоциатов ГК и холестерина в метаноле мы провели молекулярно-динамическое моделирование раствора восьми молекул ГК и двух молекул холестерина в метаноле при температурах 300 и 285 К. Размер бокса (8,7 нм) и количество молекул метанола (9637) были выбраны такими, чтобы концентрация ГК составляла 20,4 ммоль/л, что приблизительно в 2 раза больше, чем в экспериментальной работе [12]. Для указанных температур были получены и исследованы равновесные молекулярно-динамические траектории длительностью 200 и 500 нс соответственно. Типичная конфигурация этих моделей показана на рис. 3.

Для изучения возникающих ассоциатов молекул ГК и холестерина друг с другом мы строили хронограммы контактов, предложенные в свое время Г.Г. Маленковым [24]. На рис. 4 показана хронограмма для температуры 285 К. Непрерывными линиями (отрезки разной длины) отмечаются периоды времени, в течение которых данная пара молекул находилась в контакте. Контактom мы считаем ситуацию, когда расстояние между какими-либо атомами пары молекул было меньше заданной величины (в данном случае использовали значение 0,35 нм, что соответствует расстоянию для определения водородной связи). Хронограмма состоит из десяти полос (по числу используемых молекул, которые пронумерованы числами от 1 до 10). Две верхних (10 и 9) относятся

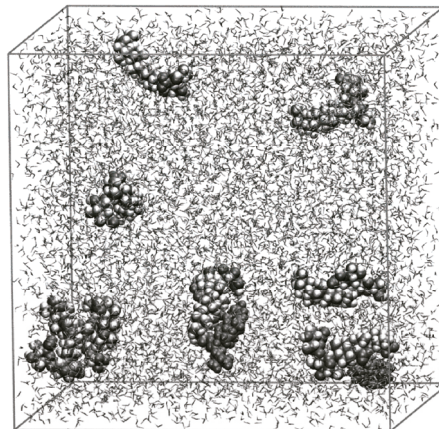


Рис. 3. Конфигурация молекулярно-динамической модели раствора, содержащего 8 молекул ГК и 2 молекулы холестерина в метаноле.

Видны ассоциаты из двух и трех молекул. Молекулы ГК и холестерина изображены ван-дер-ваальсовыми сферами

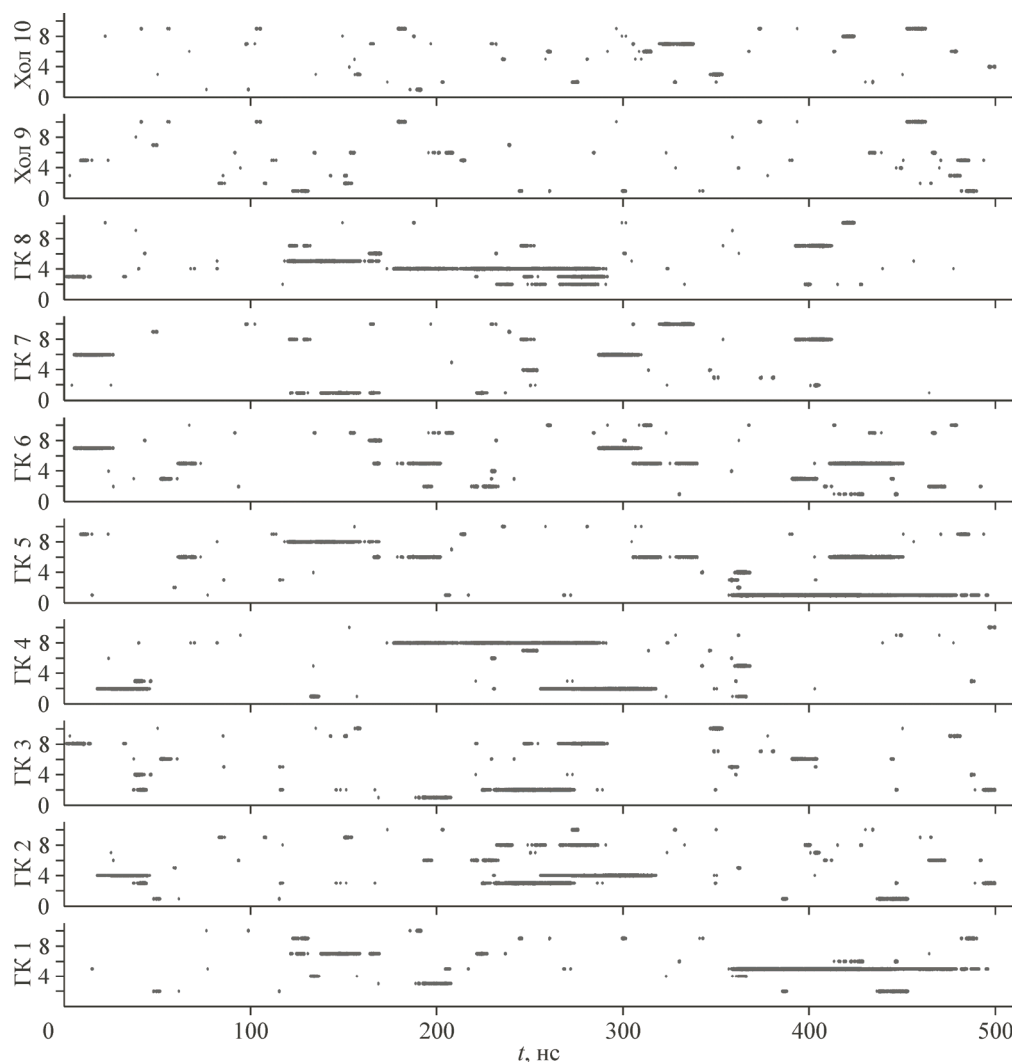


Рис. 4. Хронограмма контактов молекул ГК и холестерина для раствора в метаноле при 285 К. Две верхних полосы относятся к молекулам холестерина, остальные 8 — для ГК. Горизонтальные отрезки отмечают время контакта соответствующей пары молекул, см. текст

к молекулам холестерина, а остальные — к ГК. В каждой полосе имеется десять дорожек, также пронумерованных от 1 до 10. Итак, если на некотором интервале времени нашей молекулярно-динамической траектории молекула i имеет контакт с молекулой j , то на j -ой дорожке i -ой полосы рисуется линия, соответствующая данному периоду времени. Таким образом, хронограмма отражает всю историю контактов молекул между собой. (Заметим, что хронограмма симметрична к замене i на j .)

Из рис. 4 хорошо видно, то в данной системе нет устойчивых ассоциатов из наших молекул. Хотя можно усмотреть пары, живущие вплоть до 100 нс, например, молекулы ГК с номерами 8 и 4, а также 1 и 5. Интересно, что молекулы холестерина демонстрируют только короткие контакты как друг с другом, так и с ГК. Хронограммы для других температур демонстрируют сходную картину. Для 300 К длительность контактов немного уменьшилась (самая долгоживущая пара просуществовала около 60 нс).

Информация о контактах между молекулами определяет граф связности, из которого с помощью стандартных алгоритмов определения связанных компонент на графах [25] легко найти все кластеры из наших молекул. Рассчитывая кластеры для разных моментов молекулярно-динамической траектории, мы можем оценить среднее число ассоциатов данного размера в нашей

Концентрация ассоциатов разного состава (в ммоль/л) в растворе 8 молекул ГК и 2 холестерина в метаноле при 300 К (верхние значения) и 285 К (нижние)

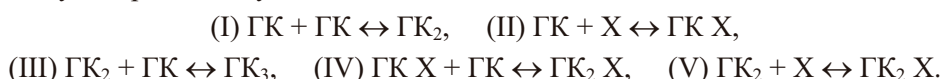
Ассоциат*	Холестерин			Ассоциат*	Холестерин		
	0	1	2		0	1	2
0 ГК	—	—	0,05±0,02	3 ГК	0,53±0,20	0,09±0,06	0
	—	—	0,11±0,04		0,41±0,08	0,05±0,03	0
1 ГК	—	0,57±0,14	0,01±0,003	4 ГК	0,03±0,02	0,01±0,004	0
	—	0,56±0,06	0,00±0,002		0,29±0,19	0,04±0,02	0,00±0,001
2 ГК	1,99±0,23	0,16±0,08	0,01±0,008	5 ГК	0	0	0
	2,21±0,18	0,19±0,06	0		0,06±0,05	0,00±0,003	0

* Концентрация мономеров составила $[ГК_1] = 13,11$ и $12,04$ мМ для 300 и 285 К, холестерина $[X_1] = 4,06$ и $4,04$ мМ соответственно. Полная концентрация кислоты $[ГК] = 20,4$ мМ, холестерина $[X] = 5,1$ мМ. Оценка ошибок произведена по разбросу значений при разбиении всей МД-траектории на 5 равных временных отрезков.

модели и, следовательно, рассчитать их концентрацию. В таблице приведены найденные концентрации ассоциатов для двух разных температур. В обоих случаях мы видим только малые ассоциаты. Статистически различимы не более чем тетрамеры, в состав которых может входить холестерин (см. выделенные ячейки).

Видно, что наиболее вероятными являются ассоциаты из двух и трех молекул ГК без холестерина. При этом холестерин предпочитает контактировать с одной молекулой ГК и намного реже с двумя или тремя.

Зная концентрации разных ассоциатов, можно выписать для них константы устойчивости. Поскольку в нашем моделировании мы используем ограниченное число молекул растворенных компонент, то получающиеся у нас ассоциаты не могут соответствовать реальному раствору той же концентрации, в котором количество растворенных молекул подразумевается неограниченным. Тем не менее мы оценили константы устойчивости для простейших ассоциатов комплексами из двух и трех молекул:



Напомним, что константа реакции $a + b \leftrightarrow ab$ вычисляется как $k = [ab] / ([a][b])$. Используя это определение и данные таблицы, получаем следующие значения констант устойчивости для ассоциатов: (I) 11,6, (II) 10,7, (III) 20,3, (IV) 21,4, (V) 19,8, для температуры 300 К и (I) 15,2, (II) 11,5, (III) 15,4, (IV) 28,2, (V) 21,3 для 285 К. Константы записаны в стандартных единицах (моль/л). Несмотря на то, что найденные нами константы могут указывать только на порядок величины, мы с уверенностью можем сказать, что присутствующие ассоциаты возникают в результате динамического равновесия в растворе и не могут объяснить существования двух разных типов окружения у молекулы холестерина, фиксируемых в ЯМР эксперименте.

РАСТВОРЕНИЕ ФРАГМЕНТА КРИСТАЛЛА ГК

Наблюдаемое в эксперименте существование ассоциатов ГК с холестерином в метаноле может быть связано с наличием в реальном растворе более крупных ассоциатов. Однако это не макроскопические мицеллы, поскольку, как отмечают экспериментаторы, раствор остается прозрачным. Тот факт, что молекулы ГК способны формировать в воде димеры специфической структуры (как было показано в [11]), дает основание предположить, что в метаноле также могут быть устойчивые ассоциаты специфической структуры, но более крупные, чем димеры. В качестве такого агрегата мы рассмотрели фрагмент кристаллической структуры ГК [14].

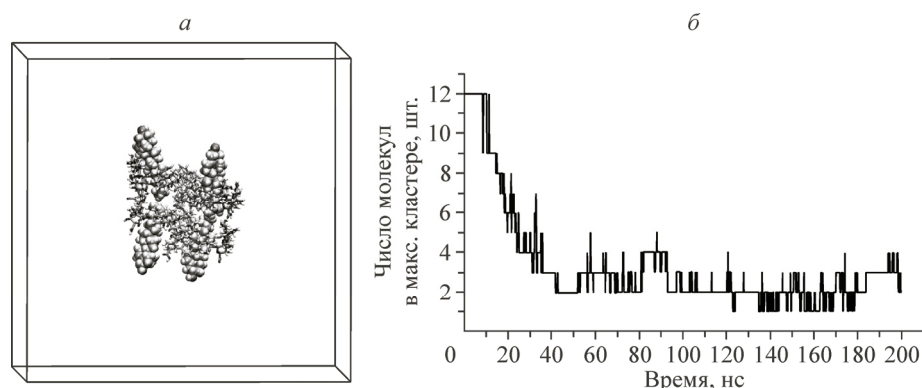


Рис. 5. Модельный бокс с агрегатом из восьми молекул ГК и четырех молекул холестерина, построенным на основе кристаллической структуры ГК. Окружающие 9649 молекул метанола не показаны (а). Кинетика распада данного агрегата в метаноле: зависимость числа молекул в наибольшем кластере от времени (б)

Кристалл ГК является рыхлым и получить его удастся только при введении стабилизирующих добавок (пропионовой кислоты), поскольку в нем присутствуют широкие каналы, доступные для молекул-гостей.

Мы построили фрагмент кристалла из восьми молекул ГК, стабилизированный четырьмя молекулами холестерина, которые были частично погружены в имеющиеся каналы между ГК (см. рис. 5, а). Этот агрегат был помещен в метанол при температуре 300 К. Сначала мы провели предварительную релаксацию окружения в течение 100 пс. Затем было запущено стандартное моделирование. Примерно через 10 нс кластер начал быстро распадаться и к 40 нс от него не осталось и следа (см. рис. 5, б). Таким образом, выбранный агрегат оказался неудачным претендентом на роль устойчивого нано-ассоциата из ГК и холестерина. Однако проведенный расчет не закрывает вопрос о возможности существования устойчивого агрегата специфической структуры в метаноле. Интересно опробовать другие способы для получения таких кластеров. Например, работая с раствором высокой концентрации ГК и холестерина, можно получить достаточно плотный "самоорганизованный" агрегат, который может оказаться долгоживущим и при низких концентрациях. Однако это является предметом отдельного исследования.

АССОЦИАЦИЯ В СМЕСИ ВОДА—МЕТАНОЛ

Мы также провели исследование ассоциации наших молекул в смешанном растворе метанол—вода в мольных долях 0,7/0,3, 0,5/0,5 и 0,3/0,7. Для воды использовали модель TIP4P/2005. Концентрацию и количество молекул ГК и холестерина поддерживали такими же, как при работе с чистым метанолом. Для модели, содержащей наибольшее количество воды, использовали 11557 молекул воды и 4800 молекул метанола, размер бокса составлял ~8,7 нм. Температура растворов равнялась 300 К, длительность траектории 200 нс. Нашей целью было узнать, при каких количествах воды начинает формироваться устойчивый ассоциат из молекул ГК и холестерина.

Оказалось, что пока воды меньше метанола, наши молекулы не стремятся объединяться. Качественно их поведение такое же, как в чистом метаноле: возникают небольшие ассоциаты, которые живут некоторое время, затем распадаются и образуются новые. Однако если воды становится больше, то ситуация меняется принципиально.

Из рис. 6, а видно, что молекулы постепенно слипаются и уже к 90 нс все собираются в единый ассоциат, который сохраняется до конца моделирования. При этом в ассоциате они совершают покачивания и даже могут менять свои положения. Молекулы холестерина частично "погружены" в ассоциат, однако время от времени выходят на его поверхность.

Можно думать, что большой кластер может образоваться и при меньшей доли воды, однако для его получения может потребоваться более длительное моделирование. С другой стороны,

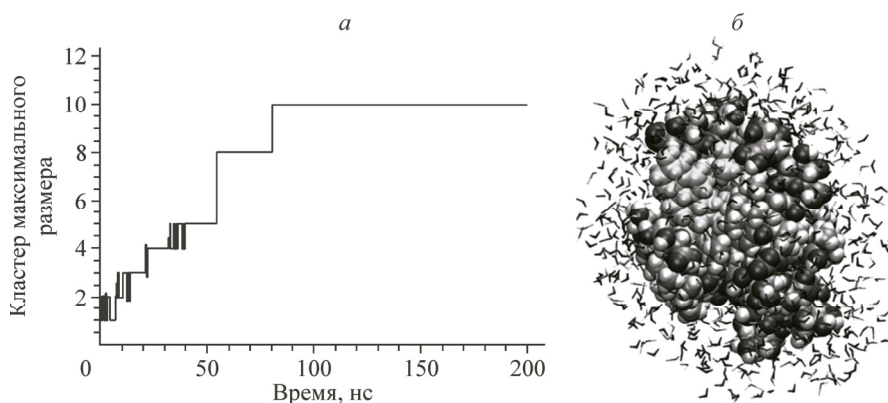


Рис. 6. Изменение со временем числа молекул ГК и холестерина в ассоциате максимального размера в растворе метанол—вода состава 0,3/0,7 (а). Иллюстрация ассоциата, получившегося через 100 нс. Ближайшие молекулы растворителя (воды и метанола) показаны своими скелетами (б)

мы считаем, что в чистом метаноле с помощью классического моделирования невозможно получить устойчивые нано-ассоциаты. Для этого понадобилось бы "макроскопическое" время моделирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью полноатомного молекулярно-динамического моделирования показано, что, в отличие от водных растворов [11, 26], в метаноле малые ассоциаты как глицирризиновой кислоты (ГК), так и ГК с холестерином являются неустойчивыми образованиями. С помощью хронограммы молекулярных контактов исследована динамика образования и распада ассоциатов. Рассчитана средняя концентрация различных ассоциатов (димеров, тримеров и тетрамеров), сделана оценка для их констант устойчивости.

Таким образом, экспериментальное указание [12] на существование двух состояний холестерина в растворе с ГК в метаноле (свободное и в ассоциате) можно объяснить только наличием более крупных образований из молекул ГК, включающих в себя холестерин. Однако моделирование таких ассоциатов требует специальных подходов и вычислительных затрат.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 15-03-03329.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Толстикова Г.А., Болтина Л.А., Кондратенко Р.М. и др. Солодка: биоразнообразие, химия и применение в медицине. – Новосибирск: НП Академическое изд-во "Гео", 2007.
2. James K.C., Stanford J.B. // J. Pharm. Pharmacol. – 1962. – 5. – P. 445 – 450.
3. Толстикова Т.Г., Хвостов М.В., Брызгалов А.О., Душкин А.В., Метелева Е.С. // Биомедицинская химия. – 2010. – 56, № 2. – С. 187 – 194.
4. Polyakov N.E., Leshina T.V. // The Open Conf. Proc. J. – 2011. – 2. – P. 64 – 72.
5. Vavilin V.A., Salakhutdinov N.F., Ragino Yu.I., Polyakov N.E., Taraban M.B., Leshina T.V., Stakhneev E.M., Lyakhovich V.V., Nikitin Yu.P., Tolstikov G.A. // Biomed. Chem. – 2008. – 54. – P. 301 – 313.
6. Ragin Yu.I., Vavilin V.A., Salakhutdinov N.F., Makarov S.I., Stakhneva E.M., Safronova O.G., Nikitin Yu.P., Tolstikov G.A. // Bull. Exp. Biol. Med. – 2008. – 145. – P. 285 – 287.
7. Kornievskaya V.S., Kruppa A.I., Polyakov N.E., Leshina T.V. // J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. – 2007. – 60. – P. 123 – 130.
8. Hibasami H., Iwase H., Yoshioka K., Takahashi H. // Int. J. Mol. Med. – 2006. – 17. – P. 215 – 219.
9. Nafisi S., Manouchehri F., Bonsaii M. // J. Photochem. Photobiol. – 2012. – 111. – P. 27 – 34.
10. Polyakov N.E., Khan V.K., Taraban M.B. et al. // J. Phys. Chem. B. – 2008. – 112. – P. 4435 – 4440.
11. Зеликман М.В., Ким А.В., Медведев Н.Н., Селютин О.Ю., Поляков Н.Э. // Журн. структур. химии. – 2015. – 56, № 1. – С. 73 – 82.

12. *Gluschenko O.Yu., Polyakov N.E., Leshina T.V.* // *Appl. Magn. Res.* – 2011. – **41**. – P. 283 – 294.
13. *Sakamoto S. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Biomembr.* – 2013. – **1828**, N 4. – P. 1271 – 1283.
14. *Tykaraska E., Sobiak S.* // *Cryst. Growth Des.* – 2012. – **12**, N 4. – P. 2133 – 2137.
15. *Толстиков Г.А. и др.* // *Биоорганическая химия.* – 1997. – **23**, № 9. – С. 691 – 709.
16. *Kondo M. et al.* // *J. Soc. Cosmet. Chem.* – 1986. – **37**, № 3. – P. 177 – 189.
17. *Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A.* // *J. Comput. Chem.* – 2004. – **25**. – P. 1157 – 1174.
18. *Kirschner K.N., Yongye A.B., Tschampel S.M., Daniels C.R., Foley B.L, Woods R.J.* // *J. Comput. Chem.* – 2008. – **29**. – P. 622 – 655.
19. *Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K.E., Simmerling C.* // *Chem. Theory Comput.* – 2015. – **11**. – P. 3696 – 3713.
20. *Chen B., Potoff J.J., Siepmann J.I.* // *J. Phys. Chem. B.* – 2001. – **105**. – P. 3093 – 3104.
21. *Páll S., Abraham M.J., Kutzner C., Hess B., Lindahl E.* *Solving Software Challenges for Exascale* / Eds. S. Markidis, E. Laure. – Springer International Publishing, 2015. – P. 3 – 27.
22. *Humphrey W., Dalke A., Schulten K.* // *J. Molec. Graphics.* – 1996. – **14**. – P. 33 – 38.
23. *Van der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J.C.* // *J. Comput. Chem.* – 2005. – **26**, N 16. – P. 1701 – 1718.
24. *Маленков Г.Г., Тытик Д.Л.* *Метод молекулярной динамики в физической химии* / Ред. Ю.К. Товбин. – М.: Наука, 1996. – С. 204 – 233.
25. *Кормен Т., Лейзерсон Ч., Ривест Р., Штайн К.* *Алгоритмы: построение и анализ*, 2-е изд. Пер. с англ. – М.: ИД "Вильямс", 2005.
26. *Зеликман В.А., Ким А.В., Медведев Н.Н.* // *Журн. структур. химии.* – 2016. – **57**, № 5. – С. 940 – 946.