

УДК 544.353.3:544.272

**СТРУКТУРА МАЛЫХ АССОЦИАТОВ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ  
С ХОЛЕСТЕРИНОМ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ.  
МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ**

**М.В. Зеликман<sup>1</sup>, А.В. Ким<sup>1,2</sup>, Н.Н. Медведев<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Россия  
E-mail: nikmed@kinetics.nsc.ru

<sup>2</sup>Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, Новосибирск, Россия

Статья поступила 19 января 2016 г.

В недавней работе Зеликман М.В. и др. ЖСХ, 2015, **56**(1), 73–82 было проведено молекулярно-динамическое исследование димеров глицирризиновой кислоты (ГК), возникающих при спонтанной встрече двух молекул ГК в воде. Было обнаружено несколько относительно устойчивых структур димеров, а при добавлении молекулы холестерина зафиксированы ассоциаты, представляющие собой димер ГК с "прилипшей" к нему молекулой холестерина. В данной работе моделируются ассоциаты, состоящие из трех и четырех молекул ГК и молекулы холестерина. Оказалось, что молекула холестерина, как правило, также располагается при поверхности ассоциата ГК. При этом тримеры не образуют четких характерных структур, как димеры, а тетрамеры могут представлять собой два слипшихся димера.

DOI: 10.15372/JSC20160513

**Ключевые слова:** молекулярно-динамическое моделирование, водные растворы, глицирризиновая кислота, холестерин, структура ассоциатов, механизм гость—хозяин.

**ВЕДЕНИЕ**

Глицирризиновая кислота (ГК) обладает широким спектром биологической активности и широко используется для лечения и профилактики различных заболеваний [ 1, 2 ]. Установлено также, что кроме собственной биологической активности ГК способна усиливать действие других лекарственных препаратов и увеличивать растворимость многих гидрофобных лекарственных соединений, однако молекулярный механизм такого действия ГК до сих пор не понят [ 2—4 ]. Экспериментально установлено, что молекулы ГК способны образовывать самоассоциаты в водных и водно-спиртовых растворах, а также комплексы со многими органическими молекулами [ 4—15 ]. Структура этих агрегатов и механизм их образования также неизвестны, хотя есть указания, что стехиометрия комплексов ГК с органической молекулой при низких концентрациях обычно составляет 2:1 или 4:1 (ГК:молекула-гость) [ 16 ].

Механизм того как ГК способствует транспорту в воде малорастворимых молекул является предметом обсуждения, см., например, [ 4, 15 ]. Нам не известны работы по молекулярно-динамическому моделированию ассоциатов ГК и гидрофобной молекулы в воде, кроме работы [ 17 ]. Попытки моделирования комплексов ГК методами квантовой химии в вакууме [ 18 ] не имеют прямого отношения к данной проблеме, поскольку влияние растворителя здесь является определяющим.

В предыдущей работе [17] использовано молекулярно-динамическое моделирование для изучения спонтанного образования димеров ГК в воде, а также ее ассоциатов с холестерином состава 2:1. Было проведено по 30 независимых прогонок длительностью 30 нс для каждого состава. В первом случае в модельный бокс, содержащий 7000 молекул воды, случайным образом помещали две молекулы ГК на возможно далеком расстоянии друг от друга, во втором — две молекулы ГК и одну молекулу холестерина. После этого молекулы свободно диффундировали в растворе при комнатной температуре и нормальном давлении. Было показано, что слипшиеся молекулы больше не расходятся, однако молекулы продолжали движение в составе агрегата. Было найдено несколько относительно устойчивых структур димеров, отличающихся взаимными ориентациями терпеновых остовов и сахарных хвостов, при этом эти структуры со временем переходят одна в другую. При наличии холестерина ассоциат возникает разными путями: может сначала образоваться димер ГК, к которому затем подходит холестерин, или холестерин встречается с одной молекулой ГК, а затем подключается вторая молекула. Однако результирующий агрегат в подавляющем большинстве случаев представлял собой димер ГК известной структуры, а молекула холестерина располагалась на его поверхности. При этом молекулы ассоциата оставались подвижными.

В данной работе мы моделируем спонтанное образование агрегатов из трех и четырех молекул ГК в присутствии молекулы холестерина, т.е. изучаем ассоциаты составов 3:1 и 4:1. Как и в работе [17], нас интересует естественное возникновение ассоциатов в растворе. Для этого сначала мы готовим конфигурацию, в которой молекулы ГК и холестерина располагаются раздельно. После этого мы рассчитываем молекулярно-динамическую траекторию и анализируем структуру получающихся агрегатов. Для репрезентативности было проведено по 30 независимых прогонок, каждая длительностью 30 нс.

#### ПОЛУЧЕНИЕ МОДЕЛЕЙ

На рис. 1 показаны исходные конфигурации наших моделей для получения ассоциатов 3:1 и 4:1. Молекулы ГК и холестерина помещали в модельный бокс произвольным образом как можно дальше друг от друга (учитывая периодические граничные условия). Использовали примерно 14000 молекул воды, что в 2 раза больше, чем в работе [17], чтобы обеспечить достаточно исходное разделение молекул.

Для каждого состава проведено по 30 независимых прогонок, каждая из которых начиналась со своей начальной конфигурации. Для моделирования, так же как в работе [17], использован пакет Gromacs [19]. Релаксацию начальной конфигурации проводили в два этапа: сначала в течение 100 пс в *NVT*-ансамбле с использованием термостата Берендсена, затем в *NPT*-ансамбле также в течение 100 пс, где использовали термостат Нозе—Хувера [20] в комбинации с баростатом Парринелло—Рамана [21] с параметрами равновесного моделирования. Электростатическое взаимодействие рассчитывали при помощи быстрого метода суммирова-

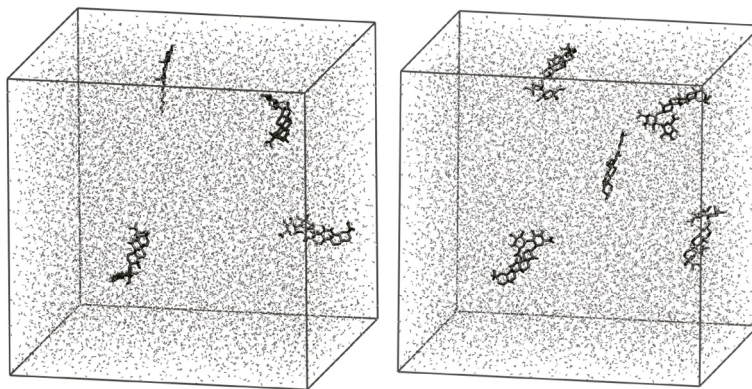


Рис. 1. Пример исходных конфигураций для моделей состава 3:1 и 4:1 (ГК:холестерин). Молекулы ГК и холестерина изображены своими скелетами, молекулы воды показаны точками

ния Эвальда [ 22 ] с интерполяцией четвертого порядка. Поля сил и параметризация молекул ГК и холестерина были теми же, что и в работе [ 17 ], для воды использовали модель Tip4p-Ew. Все равновесное моделирование проводили при давлении 1 бар и температуре 300 К.

### ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ АССОЦИАТОВ

Как было показано в работе [ 17 ], момент слипания молекул ГК и холестерина просто и надежно устанавливается по величине ван-дер-ваальсова взаимодействия между этими молекулами. В пакете Gromacs предусмотрена возможность вычислять энергию взаимодействия между выделенными группами атомов. В данном случае предлагается рассчитывать энергию леннард-джонсовых взаимодействий  $E_{LJ}$  между всеми атомами выбранных молекул, не связанными ковалентными связями. Величина  $E_{LJ}$  испытывает резкий скачок при встрече молекул. Заметим, что аналогичным образом себя ведет суммарная площадь поверхности, доступной растворителю (SAS) (см. подробнее [ 17 ]).

Характеризовать взаимную ориентацию пары молекул ГК можно с помощью углов между векторами, связанными с данными молекулами ГК. В работе [ 17 ] было предложено использовать два вектора, характеризующих молекулу ГК (рис. 2). Вектор **A** определяет направление терпенового остова молекулы (соединяет дальние атомы углерода в крайних кольцах остова). Вектор **B** связан с сахарным хвостом, он соединяет удаленные атомы углерода в сахарных кольцах.

Для анализа взаимного расположения пары молекул ГК было предложено рассчитывать углы (косинусы углов) между этими векторами в разных молекулах. Например, если первая молекула ГК имеет векторы **A1** и **B1**, а вторая — векторы **A2** и **B2**, то их взаимная ориентация описывается четырьмя углами между соответствующими векторами: (**A1A2**), (**B1B2**), (**A1B2**) и (**A2B1**). С помощью этих углов удалось выделить характерные структуры димеров ГК [ 17 ].

Для анализа ансамбля димеров было предложено рассчитывать их населенность в координатах  $\cos(\mathbf{A1}, \mathbf{A2}) - \cos(\mathbf{B1}, \mathbf{B2})$ . Сгущения (пятна) на такой диаграмме указывают на характерные структуры димеров [ 17 ].

Молекулу холестерина можно характеризовать одним вектором **C**, связанным с его стерновым остовом. Углы между вектором **C** и векторами молекулы ГК (**A** и/или **B**) позволяют говорить об относительной ориентации этих молекул.

### АССОЦИАТЫ 3:1

На рис. 3 показана зависимость  $E_{LJ}$  от времени сразу для всех тридцати прогонок модели раствора, содержащего три молекулы ГК и холестерин. Как отмечалось ранее, уровень  $E_{LJ} \approx -170 \text{ kT}$  соответствует появлению пары ГК—холестерин (ассоциат 1:1), при этом остальные

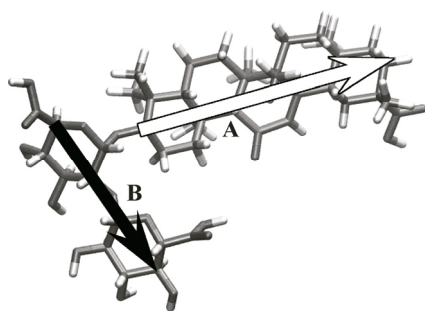


Рис. 2 Молекула глицирризиновой кислоты и связанные с ней векторы. Вектор **A** характеризует ориентацию терпенового остова (соединяет атомы углерода в крайних кольцах остова; вектор **B** характеризует ориентацию сахарной части (соединяет удаленные атомы углерода в сахарных кольцах)

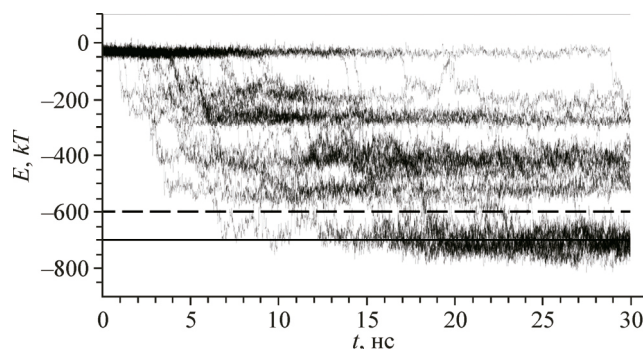


Рис. 3. Зависимость от времени суммарной энергии леннард-джонсова взаимодействия  $E_{LJ}$  трех молекул ГК и холестерина для 30 независимых прогонок. Пунктирная линия указывает уровень энергии  $600 \text{ kT}$ , ниже которого, мы считаем, ассоциаты имеют состав 3:1. Сплошная линия показывает средний уровень энергии таких ассоциатов

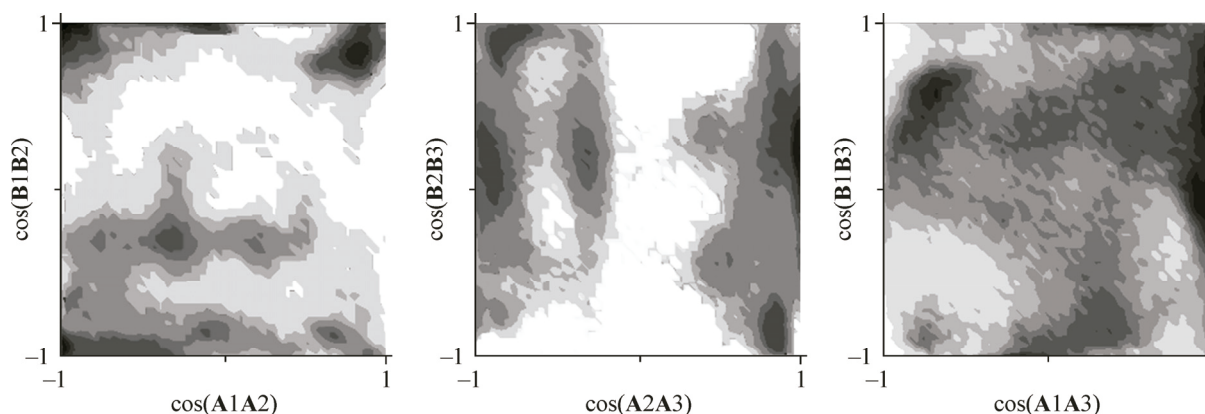


Рис. 4. Двумерные диаграммы населенности в координатах  $\cos(A1,A2)$ — $\cos(B1,B2)$  для каждой пары молекул ГК в ассоциатах 3:1

молекулы остаются изолированными,  $E_{LJ} \approx -270$  kT соответствует появлению димера ГК (2:0), а  $E_{LJ} \approx -400$  kT указывает на появление ассоциата 2:1. На нашем рисунке уровень  $E_{LJ} \approx -500$  kT соответствует трем слипшимся молекулам ГК (3:0). Наконец, энергия  $E_{LJ} \approx -700$  kT говорит, что возник ассоциат 3:1. Видно, что он образуется в большинстве прогонок, но в разное время и разными путями, а возникнув, сохраняется до конца нашего моделирования. Для выделения конфигураций молекулярно-динамических траекторий, содержащих ассоциат 3:1, мы используем условие  $E_{LJ} < 600$  kT (см. рис. 3).

При анализе димеров в работе [17] рассчитывали одну диаграмму населенности димеров в координатах  $\cos(A1,A2)$ — $\cos(B1,B2)$ . Теперь у нас три молекулы ГК, т.е. в ассоциате имеется три пары молекул ГК. Поэтому мы строим не одну, а три диаграммы распределений (рис. 4). Каждый ассоциат 3:1 представляется в каждой из этих диаграмм своей точкой с координатами, равными косинусам углов между векторами соответствующих пар молекул.

При построении диаграмм использованы все 30 независимых траекторий модели с дискриминацией  $E_{LJ} < 600$  kT. Примерное количество точек в диаграмме 300 000. Для каждой пары наблюдаются только размытые пятна. Отсутствие четко выраженных выделенных областей на всех трех диаграммах означает, что для данного ансамбля конфигураций нет характерных структур, подобных тем, которые мы видели для димеров [17].

Извлекая ассоциаты из молекулярно-динамической модели, мы видим, что тройка молекул ГК образует компактную группу, а молекула холестерина располагается сбоку от слипшихся молекул ГК (рис. 5).

Единственное исключение из этого правила мы наблюдали только в одной прогонке, где молекула холестерина оказалась в кольце из трех молекул ГК (рис. 6). Эта структура образова-

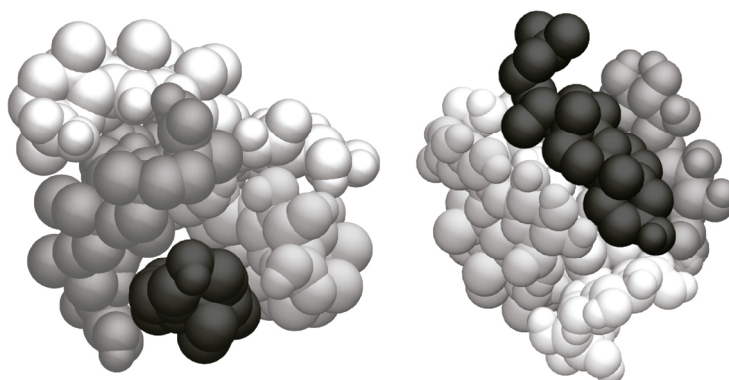


Рис. 5. Примеры ассоциатов состава 3:1. Молекула холестерина (показана черным) располагается сбоку от слипшихся молекул ГК



лась сама по себе и сохранялась до конца стандартного моделирования (30 нс). Для выяснения устойчивости такого ассоциата мы продолжили моделирование с данной структурой. Оказалось, что она сохраняется в растворе в течение 300 нс. Однако затем произошла спонтанная перестройка: кольцо исчезло и образовался обычный компактный тример молекул ГК, а молекула холестерина оказалась сбоку. Дальнейшее моделирование в течение 200 нс не выявило существенных изменений структуры ассоциата, кольцо больше не возникло.

Наблюдение за величиной  $E_{LJ}$  в данной прогонке показало, что эта энергия примерно одинакова как при наличии кольца, так и после его разрушения. Интересно отметить: она флуктуирует около значения  $-700$ , что является средней величиной для выделенных ассоциатов 3:1 (см. рис. 3). Таким образом, структура, где холестерин оказался внутри кольца из трех молекул ГК, не является характерной. Однако для количественной оценки устойчивости таких агрегатов, например для расчета их константы равновесия, необходимы специальные подходы, поскольку классическая полноатомная молекулярная динамика не дает прямого решения такой задачи.

#### АССОЦИАТЫ 4:1

Для модели с четырьмя молекулами ГК и молекулой холестерина мы также провели 30 прогонок по 30 нс. Здесь возможно образование ассоциатов всех упомянутых выше составов и дополнительно 4:0 и 4:1. Расчет энергии  $E_{LJ}$  дает возможность видеть формирование всех этих ассоциатов (рис. 7). Видно, что искомые ассоциаты успевают возникнуть во многих прогонках, при этом, так же как на рис. 3, это происходит по-разному. Характерное значение энергии  $E_{LJ}$  для ассоциата 4:1 получается примерно равным  $-1000$  kT. Учитывая флуктуации, мы относим к ним все те, для которых  $E_{LJ} < -900$  kT.

Для исследования структуры этих ассоциатов мы также рассчитывали двумерные диаграммы населенности в координатах  $\cos(A1,A2) - \cos(B1,B2)$ . В данном случае имеется 6 диаграмм — по числу возможных пар из четырех молекул. Оказалось, что на всех этих диаграммах видны пятна, существенно более обособленные, чем на диаграммах состава 3:1. Интересно, что их расположение для некоторых пар подобно тому, что мы видели для димеров. На рис. 8 показана одна из шести диаграмм для ассоциата 4:1 и диаграмма для димеров из работы [17]. Очевидно, что сходство в расположении пятен не может быть случайным. Всем характерным структурам димера (пятнам на диаграмме) соответствуют пятна на данной диаграмме для ассоциата 4:1. Очевидно, что взаимное расположение данной пары молекул ГК в нем такое же, как в димере.

Визуализируя ассоциаты 4:1, мы видим, что они представляют собой компактные группы молекул. В целом трудно судить о структуре таких кластеров, тем более, что молекулы нахо-

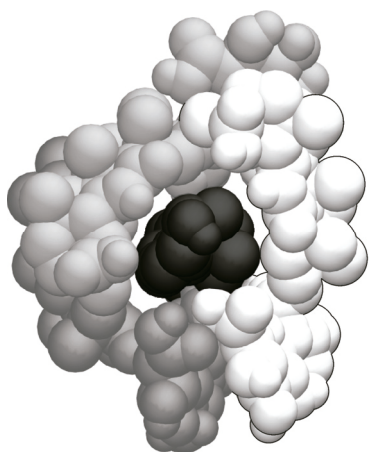


Рис. 6. Агрегат состава 3:1, где молекула холестерина (показана черным цветом) "захвачена" в кольцо из молекул ГК

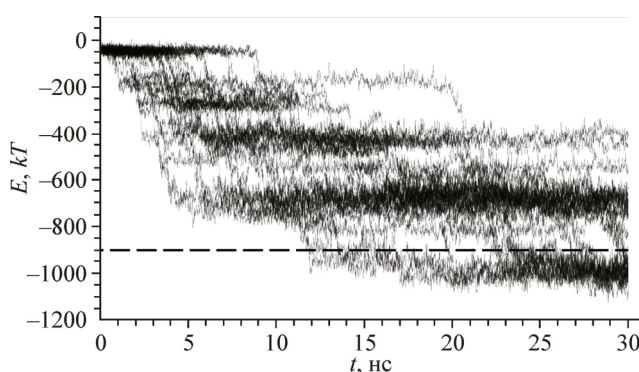


Рис. 7. Зависимость суммарной энергии  $E_{LJ}$  для четырех молекул ГК и одной молекулы холестерина для 30 прогонок. Видны уровни энергии, характерные для ассоциатов разного состава. Для выбора ассоциатов состава 4:1 используется условие  $E_{LJ} < -900$  kT, пунктирная линия

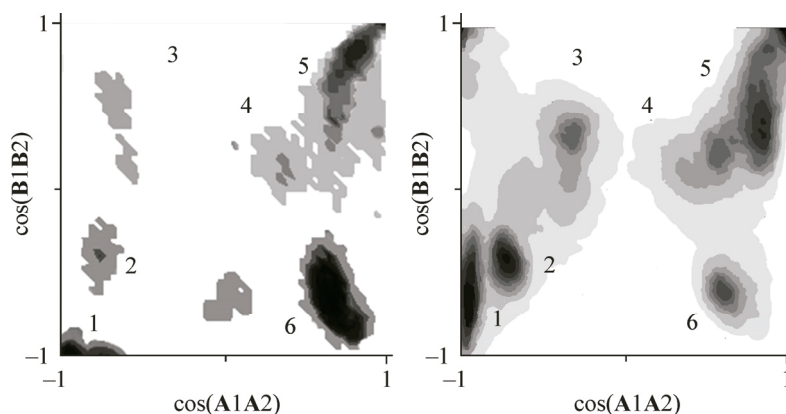


Рис. 8. Двумерные диаграммы населенности в координатах  $\cos(A1,A2)$ — $\cos(B1,B2)$  для одной из пар молекул ГК ассоциата 4:1 (слева) и для димера из работы [ 17 ] (справа)

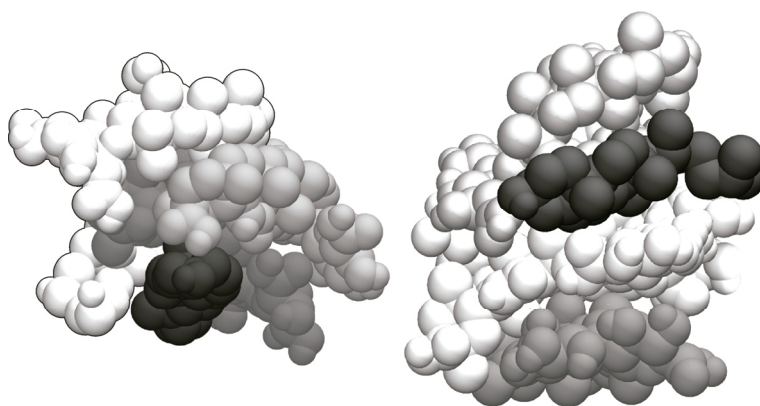


Рис. 9. Примеры ассоциатов состава 4:1. Молекула холестерина (показана черным цветом) располагается сбоку от слипшихся молекул ГК

дятся в постоянном относительном движении. Однако во многих случаях можно усмотреть, что кластер из четырех молекул ГК напоминает две слипшиеся пары димеров ГК известной структуры [ 17 ].

Наблюдая за молекулой холестерина в ассоциатах 4:1, мы не нашли каких-либо преимущественных структур. Как и в случае состава 3:1, холестерин также стремится располагаться снаружи кластера (рис. 9).

Теоретически кажется возможным, чтобы 4 молекулы ГК могли организовать кольцо вокруг молекулы холестерина. Однако в нашем моделировании мы не наблюдали таких структур, хотя бывают случаи, когда молекула холестерина слегка углубляется в "клубок" ГК. Тем не менее в целом можно говорить, что она предпочитает располагаться рядом с кластером ГК.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено молекулярно-динамическое моделирование водных растворов, состоящих из трех и четырех молекул ГК с добавкой молекулы холестерина. Образующиеся ассоциаты составов 3:1 и 4:1 достаточно устойчивы в воде: за время моделирования молекулы не расходятся, однако остаются подвижными и могут менять взаимную ориентацию, находясь в составе ассоциата.

Ассоциаты состава 3:1 представляют собой тройку тесно связанных молекул ГК, к которой прилипла молекула холестерина. Какой-то преимущественной упорядоченности между

молекулами в ассоциате не обнаружено. Три молекулы ГК могут "захватить" молекулу холестерина в кольцо. Однако такая конфигурация встретила нам только один раз. При дальнейшем моделировании кольцо исчезло и получился обычный тример с молекулой холестерина снаружи.

Ассоциаты 4:1 также являются плотной группой молекул ГК с молекулой холестерина у его поверхности. Однако здесь можно усмотреть, что четверка ГК во многих случаях представляет собой два слипшихся димера ГК, которые, как было показано ранее [ 17 ], имеют набор специфических структур.

Обнаруженные устойчивые ассоциаты молекул ГК с холестерином на их поверхности иллюстрируют механизм того, как молекулы ГК могут способствовать растворимости и транспорту гидрофобных молекул в воде.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Толстиков 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. Tolstikova T.G., Khvostov M.V., Bryzgalov A.O. // Mini-Rev. Med. Chem. – 2009. – **9**. – P. 1317 – 1328.
3. Толстикова Т.Г., Хвостов М.В., Брызгалов А.О., Душкин А.В., Метелева Е.С. // Биомед. химия. – 2010. – **56**, № 2. – P. 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. Polyakov N.E., Leshina T.V., Salakhutdinov N.F. et al. // J. Phys. Chem. B. – 2006. – **110**. – P. 6991 – 6998.
8. Kornievskaya V.S., Kruppa A.I., Polyakov N.E., Leshina T.V. // J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. – 2007. – **60**. – P. 123 – 130.
9. James K.C., Stanford J.B. // J. Pharm. Pharmacol. – 1962. – **5**. – P. 445 – 450.
10. Hibasami H., Iwase H., Yoshioka K., Takahashi H. // Int. J. Mol. Med. – 2006. – **17**. – P. 215 – 219.
11. Nafisi S., Manouchehri F., Bonsaii M. // J. Photochem. Photobiol. – 2012. – **111**. – P. 27 – 34.
12. Polyakov N.E., Leshina T.V., Salakhutdinov N.F. et al. // Free Rad. Biol. Med. – 2006. – **40**. – P. 1804 – 1809.
13. Polyakov N.E., Khan V.K., Taraban M.B. et al. // J. Phys. Chem. B. – 2008. – **112**. – P. 4435 – 4440.
14. James K.C., Stanford J.B. // J. Pharm. Pharmacol. – 1962. – **5**. – P. 445 – 450.
15. Gluschenko O.Yu., Polyakov N.E., Leshina T.V. // Appl. Magn. Res. – 2011. – **41**. – P. 283 – 294.
16. Зеликман М.В., Ким А.В., Медведев Н.Н., Селютин О.Ю., Поляков Н.Э. // Журн. структур. химии. – 2015. – **56**, № 1. – P. 73 – 82.
17. Лекарь А.В., Милов А.А., Борисенко С.Н. и др. // Вест. Южного научн. центра РАН. – 2012. – **8**, № 2. – P. 18 – 26.
18. 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.
19. Hoover W.G. // Phys. Rev. A. – 1985. – **31**. – P. 1695 – 1697.
20. Parrinello M., Rahman A. // J. Appl. Phys. – 1981. – **52**. – P. 7180 – 7182.
21. Essmann U., Perera L.M., Berkowitz L., Darden T.A., Lee H., Pedersen L.G. // J. Chem. Phys. – 1995. – **103**. – P. 8577 – 8593.