

**ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ НЕКОТОРЫХ
РАСТВОРИМЫХ ФОРМ СУПРАМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ
НА ОСНОВЕ МОНОАММОНИЕВОЙ СОЛИ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ**

Далимова Сурайё Нугмановна

д-р биол. наук,
проф. кафедры биохимии Национального Университета,
Республика Узбекистан, Ташкент
E-mail: s_dalimova@mail.ru

Хамдамова Нигора Азамжон кизи

преподаватель кафедры биохимии Национального Университета,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: nigorahamdamaova@gmail.com

Левицкая Юлия Владимировна

доц. кафедры биофизики Национального Университета,
Центр передовых технологий,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: yv.levickaya@gmail.com

Кузиев Шерали Насруллоевич

ст. преп., PhD кафедры биохимии Национального Университета,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: kuziev.sherali@gmail.com

Гафуров Махмуд Бакиевич

д-р хим. наук, вед. науч. сотр.
лаборатории низкомолекулярных биологически активных соединений,
ИБОХ АН РУз.,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: mahmudgafurov@mail.ru

Юлдашев Хабибулла Абдурасулевич

кандидат хим. наук,
ст. науч. сотр. лаборатории низкомолекулярных биологически активных соединений,
ИБОХ АН РУз.
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: khabibullay@mail.ru

Умарова Гулбахор Базарбаневна

кандидат биологических наук,
доц. кафедры биохимии Национального Университета,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: gulbakhorumarova@gmail.com

Мухаммаджонова Гузал Мухаммаджановна

канд. биол. наук,
доц. кафедры биохимии Национального Университета,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: muhammadjonovagozal@gmail.com

Выпова Наталия Леонидовна

ст. науч. сотр., Институт биоорганической химии
им. акад. А.С. Садыкова АН РУз,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: vyrova.natalia@mail.ru

Тагайалиева Нигора Абдунабиевна

зав. лаб., Институт биоорганической химии
им. акад. А.С. Садыкова АН РУз,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: tnigora@mail.ru

Махмудов Лазизбек Умаржонович

мл. науч. сотр., Институт биоорганической химии
им. акад. А.С. Садыкова АН РУз,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: mahmudov.lazizbek@mail.ru

Хамраев Собир Хусенович

магистр 2- курса кафедры биохимии
Национального университета Узбекистана,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: sobirjonhamroyev@bk.ru

**STUDIES OF THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SOME SOLUBLE FORMS
OF SUPRAMOLECULAR COMPLEXES BASED ON THE MONOAMMONIUM SALT
OF GLYCYRRHIZIC ACID**

Surayo Dalimova

Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Biochemistry National University,
Uzbekistan, Tashkent

Nigora Azamjon kizi Khamdamova

Lecturer, Department of Biochemistry National University,
Uzbekistan, Tashkent

Yuliya Levitskaya

Center for Advanced Technologies, Associate Professor of the Department of Biophysics National University,
Uzbekistan, Tashkent

Sherali Kuziev

Senior Lecturer, PhD Department of Biochemistry National University,
Uzbekistan, Tashkent

Mahmud Gafurov

Doctor of Chemistry, Leading Researcher,
Laboratory of Low Molecular Weight Biologically Active Compounds,
Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent

Khabibulla Yuldashev

Candidate of Chemical Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Low Molecular Biologically Active Compounds,
Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent

Gulbahor Umarova

Candidate of Biological Sciences,
Associate Professor of the Department of Biochemistry National University,
Uzbekistan, Tashkent

Guzal Mukhammadjonova

Candidate of Biological Sciences,
Associate Professor of the Department of Biochemistry National University,
Uzbekistan, Tashkent

Natalia Vypova*Senior researcher Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent***Nigora Tagayalieva***Head of laboratory Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent***Lazizbek Makhmudov***Junior researcher Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent***Sobir Khamraev***2-year master of the Department of Biochemistry
of the National University of Uzbekistan,
Uzbekistan, Tashkent***DOI: 10.32743/UniChem.2021.79.1-1.16-22**

АННОТАЦИЯ

Исследован антиоксидантный эффект супрамолекулярных комплексов на основе моноаммонийной соли глицирризиновой кислоты (МАСГК) в гомогенате и митохондриях печени крыс на модели парацетомолового гепатита. Установлено, что парацетамол вызывает значительное увеличение в гомогенате печени диеновых конъюгатов и сопряженных триенов, а также в митохондриях вторичного продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ). Введение гепатитным животным супрамолекулярных комплексов снижало содержание первичных и вторичных продуктов ПОЛ. Наиболее эффективным антиоксидантным действием обладал комплекс МАСГК/кверцетин.

ABSTRACT

The antioxidant effect of supramolecular complexes based on the monoammonium salt of glycyrrhizin acid (MASGA) in the homogenate and mitochondria of rat liver was studied using a model of paracetamol hepatitis. It was found that paracetamol causes a significant increase in the liver homogenate of diene conjugates and conjugated trienes, as well as in the mitochondria of the secondary product of lipid peroxidation (LPO). Administration of supramolecular complexes to hepatitis animals reduced the content of primary and secondary LPO products. The most effective antioxidant effect was shown by the (MASGA)/quercetin complex.

Ключевые слова: гепатит, парацетамол, перекисное окисление липидов, митохондрии, малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты, полифенолы, моноаммонийная соль глицирризиновой кислоты, аминокислоты.

Keywords: hepatitis, paracetamol, lipid peroxidation, mitochondria, malondialdehyde, diene conjugates, polyphenols, glycyrrhizin acid monoammonium salt, amino acids.

Гепатиты представляют одну из наиболее серьезных и актуальных проблем современного здравоохранения. Известно, что при гепатитах различной этиологии чрезвычайно высок риск развития циррозов печени и первичного рака печени. К 2020 году число больных различными видами гепатитов возросло до 450 млн. человек. Ежегодно в мире от гепатитов умирает около 1 млн. человек. В последние годы в некоторых странах Средиземноморья и Азии отмечено преобладание вялотекущих форм гепатита [1], при котором наблюдается изменение иммунной системы, вызывающее активацию провоспалительных цитокинов и деструктивных процессов в гепатоцитах [2]. В большинстве случаев поражения печени, в том числе при инфекции гепатотропными вирусами, в основе гибели клетки лежит апоптоз [3]. Известно, что одной из ключевых органелл в запуске, реализации и регуляции апоптоза, является митохондрия, что делает её значимой мишенью в исследованиях,

посвященных гепатитам. Доказано, что гепатиты сопровождаются разнообразными метаболическими изменениями и симптоматикой. Для лечения гепатитов используют гепатозащитные средства, препятствующие развитию метаболических, функциональных и структурных нарушений в клетках печени. Эффективность многочисленных гепатопротекторных средств, несмотря на их положительное воздействие на основные синдромы гепатита, все же остается невысокой. Причем, большинство применяемых в клинической практике гепатопротекторов являются дорогостоящими, т.к. выпускаются за рубежом, они малодоступны для широких слоев населения.

В связи с этим необходимость поиска новых, эффективных отечественных средств гепатопротекторного действия для лечения заболеваний печени является актуальной проблемой.

В настоящее время успехи в разработке новых лекарственных средств связаны не только с синтезом новых химических соединений, но и, в значительной степени, с улучшением свойств существующих препаратов, в том числе, путем создания новых лекарственных форм с направленной доставкой к органу-мишени [4, 5]. Одним из перспективных подходов в разработке подобных лекарственных форм является связывание действующего вещества в молекулярный комплекс с растительными углеводсодержащими метаболитами, который обеспечивает защиту базового препарата от быстрого метаболизма в организме и улучшает его транспорт через биологические мембраны [6]. Кроме этого, комплексобразование позволяет пролонгировать эффект действующего вещества за счет повышения аффинности к рецептору органа-мишени. К настоящему времени наиболее изученным в качестве комплексирующего растительного углеводсодержащего метаболита является глицирризиновая кислота, получаемая из корня солодки. В последние годы в клинической практике применяются различные медицинские препараты, содержащие производные глицирризиновой кислоты, получаемые из корня солодки и обладающие разнообразной биологической активностью в сочетании с низкой токсичностью. Они применяются в медицинской практике в качестве лекарственных препаратов широкого спектра действия. Используются комплексы и в качестве гепатопротекторов при лечении патологий печени различной этиологии [7].

Целью исследования является изучение супрамолекулярных комплексов, созданных на основе моноаммониевой соли глицирризиновой кислоты (МАСГК) с различными соединениями на процесс липопероксидации при экспериментальном токсическом гепатите, вызванном парацетамолом.

Материал и методы исследования

В работе были использованы белые беспородные крысы массой тела 160-180 г. обоего пола. Лекарственное поражение печени воспроизводили введением парацетамола в желудок в дозе 500 мг/кг в течение 2 дней [4]. Все животные были разделены на 11 групп. Первая группа контрольная; вторая группа – модельные животные, получавшие парацетамол. Третья группа - крысы, которым вводили 2,5 мг/кг комплекса МАСГК/DL - карнитин·HCl, условно обозначенное как соединение №1, четвертая - животные, получившие этот же комплекс в дозе 5,0 мг/кг (№2). В пятую группу вошли крысы, которым вводили комплекс МАСГК/Метион в дозе 2,5 мг/кг, обозначенное как соединение №3, а в шестую – животные, получившие этот же комплекс в дозе 5,0 мг/кг (№4). Седьмую группу составили живот-

ные, которым вводили 2,5 мг/кг комплекса МАСГК/Метоксикоричная кислота – соединение №5; восьмую – крысы, которым вводили 5,0 мг/кг комплекса (№6). В девятую и десятую группу вошли крысы, получавшие соответственно 2,5 и 5,0 мг/кг веса тела животного комплекс МАСГК/Кверцетин (соединения №7 и №8). Одиннадцатой группе животных вводили препарат сравнения СТД (соединение №9). В качестве препарата сравнения с высокими гепатопротекторными свойствами использовали инъекционное лекарственное средство Стронгер Нео-Минофаген С (Япония) (СТГ), имеющий в составе глицирризиновую кислоту и аминокислоты Глицин и L-Цистеин.

Супрамолекулярные комплексы и препарат сравнения вводили гепатитным животным в течение 7 дней. Супрамолекулярные комплексы были выделены и синтезированы в институте Биоорганической химии АН РУз.

Митохондрии из печени опытных и контрольных крыс выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования [8].

В гомогенате печени животных всех групп определяли содержание превичных продуктов перекисного окисления липидов - диеновые конъюгаты (ДК) и сопряженные триены (СТ) [9].

Для определения содержания малонового диальдегида (МДА) – вторичного продукта ПОЛ в митохондриях печени осадок, содержащий митохондрии отмывали от сахарозы в среде, содержащей в мМ: 125 – KCl; 10 – трис – HCl, pH - 7,5. Количество образовавшегося МДА определяли, пользуясь значением коэффициента молярной экстинкции, равным 1,56. Концентрацию МДА выражали в нмоль МДА на мг белка [10]. Белок в пробах определяли по биуретовой реакции [11].

Результаты и их обсуждение

В механизме развития токсических поражений печени ведущее место принадлежит усилению процессов перекисного окисления липидов, вследствие которого происходит повреждение мембранных структур гепатоцита, изменение активности и синтеза мембраносвязанных ферментов, а также целого ряда внутриклеточных процессов, что может привести в конечном итоге к развитию цитолиза, который при тяжелых формах заканчивается декомпенсацией жизненно важных функций печени.

Первым этапом наших исследований явилось изучение первичных продуктов ПОЛ-диеновых конъюгатов (ДК) и сопряженных триенов (СТ) в гомогенате печени при токсическом гепатите, вызванном введением парацетамола и лечении различными супрамолекулярными комплексами. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Изменение содержания ДК и СТ печени крыс с токсическим гепатитом и введением различных комплексов (n=6; M±m)

№	Группы животных	Первичные продукты ПОЛ(в ед.ИО)			
		ДК	%изменения	СТ	% изменения
1	Контроль	1,22±0,091	100	0,28±0,04	100
2	Токсический гепатит (ТГ)	2,38±0,11	195,1	0,57±0,01	203,5
3	СТД	1,87±0,11	153,3	0,40±0,02	142,8
4	ТГ+№1	1,97±0,02	161,5	0,45±0,07	160,7
5	ТГ+№2	1,93±0,01	158,1	0,51±0,03	182,1
6	ТГ+№3	1,85±0,07	151,6	0,49±0,01	175
7	ТГ+№4	1,79±0,01	146,7	0,42±0,02	150
8	ТГ+№5	1,69±0,01	138,5	0,43±0,01	153,6
9	ТГ+№6	1,65±0,015	135,2	0,42±0,0117	150
10	ТГ+№7	1,25±0,011	100	0,31±0,016	110,7
11	ТГ+№8	1,23±0,017	100,8	0,30±0,011	107,1

Из представленных результатов установлено, что введение парацетамола привело к снижению выживаемости животных до 25%, вызывая токсический гепатит, характеризующийся увеличением в гомогенате печени почти в два раза первичных продуктов ПОЛ–диеновых конъюгатов и сопряженных триенов. Введение гепатитным животным препарата сравнения–СТД значительно снижало содержание первичных показателей ПОЛ. Все исследованные комплексы проявляли антиоксидантный эффект, выраженный в различной степени. Однако только

соединения №7 и №8 снижали уровень ДК и СТ почти до контрольных значений.

Аналогичные результаты были получены и при определении содержания вторичных продуктов ПОЛ–малонового альдегида (МДА) в митохондриях печени интактных и гепатитных крыс. Токсический гепатит вызывал в митохондриях гепатоцитов увеличение скорости образования неферментативного-аскорбатзависимого МДА до 225%, ферментативного NADH-зависимого-до 244 % (табл. 2).

Таблица 2.

Изменение содержания МДА в митохондриях печени крыс с токсическим гепатитом и введением различных комплексов (n=6; M±m)

№	Группы животных	Малоновый альдегид, МДА нмоль/мг белка			
		Аскорбат зависимый	%	NADH-зависимый	%
1	Контроль	0,340±0,017	100 %	0,365±0,015	100 %
2	Токсический гепатит (ТГ)	0,765±0,013	225 %	0,891±0,011	244 %
3	СТД	0,526±0,57	155 %	0,578±0,023	158 %
4	ТГ+№1	0,657±0,012	193 %	0,625±0,017	183 %
5	ТГ+№2	0,603±0,015	177 %	0,589±0,011	161 %
6	ТГ+№3	0,645±0,013	189 %	0,629±0,013	172 %
7	ТГ+№4	0,620±0,014	182 %	0,608±0,012	167 %
8	ТГ+№5	0,665±0,012	195 %	0,6340±0,012	173 %
9	ТГ+№6	0,655±0,015	192 %	0,623±0,017	171 %
10	ТГ+№7	0,505±0,011	149 %	0,529±0,016	144 %
11	ТГ+№8	0,494±0,017	145 %	0,485±0,011	133 %

Введение гепатитным животным СТД вызывало достоверное снижение обеих форм МДА на 70 и 86% соответственно. Из таблицы 2 видно, что все исследуемые супрамолекулярные комплексы при 7-ти дневном введении, в разной степени, ингибировали процесс липопероксидации в митохондриях печени. В основном эффект изученных комплексов вполне сопоставим с действием препарата сравнения СТД. Однако, и в этой серии исследований было обнаружено, что среди изученных соединений комплекс

МАСГК/Кверцетин (соединения №7 и №8) значительно превосходили антиоксидантный эффект СТД и других супрамолекулярных комплексов. Так, введение этого комплекса в дозе 5 мг/кг опытным крысам снижает процесс ферментативного и неферментативного ПОЛ на 80% и 111% соответственно. Остальные комплексы также снижают процесс липопероксидации, но эффект последних намного меньше эффекта препарата сравнения и комплекса МАСГК/Кверцетин в обеих исследованных дозах.

Таким образом, нами установлено, что токсический парацетамоловый гепатит вызывает увеличение процесса липопероксидации, которое снижалось при введении гепатитным животным различных супрамолекулярных комплексов. Очевидно, механизм возрастания интенсивности ПОЛ при токсическом поражении печени, заключается не только в повреждении мембран митохондрий, но при этой патологии и видимо страдают и процессы, протекающие в цитоплазме клеток печени.

Наши данные согласуются с результатами исследований других авторов, обнаруживших аналогичное повышение уровня ПОЛ при исследовании гомогената, мембран митохондрий и эндоплазматического ретикула клеток печени при различных ее поражениях [12]. В патогенезе гепатитов, как токсического, так и острого большая роль отводится ускорению процессов липопероксидации, причем, по мнению многих авторов, концентрация продуктов ПОЛ, а также интенсивность индуцированного ПОЛ в сыворотке крови при гепатитах повышены в соответствии с выраженностью цитолитического синдрома и степени тяжести заболевания [13]. Большинство исследователей, занимающихся изучением процессов ПОЛ в развитии патологических процессов в печени, считают, что ключевая роль принадлежит интенсификации процессов перекисного окисления липидов. Усиление ПОЛ в мембранах гепатоцитов, или его полное ингибирование связаны, по их мнению, с нарушением равновесия про- и антиоксидантных систем [14]. Очевидно, в обоих случаях происходит отклонение от нормального функционирования этих систем, что одинаково опасно для клеток.

Кроме того, в различных биологических мембранах, в том числе и митохондриальных, вследствие интенсификации ПОЛ индуцируется проницаемость для различных ионов, неэлектролитов и макромолекул. Этот эффект потери мембранами барьерных функций лежит в основе развития токсических форм гепатита. В результате увеличения липопероксидации происходят изменения свойств таких

мембраносвязанных ферментов, как Ca^{2+} -АТФаза, Na^+/K^+ -АТФаза, цитохромы P-450, в5, цитохром с, глюкоза-6 фосфатаза, моноаминоксидаза, фосфолипаза и др. Инактивация Ca^{2+} -АТФазы приводит к замедлению «откачивания» ионов Ca^{2+} из клетки и одновременно к ускорению входа кальция в клетку. Это сопровождается увеличением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} и повреждением клетки [15].

Для предотвращения подобной ситуации широко используются различные антиоксиданты. Поскольку процесс перекисного окисления развивается в виде цепных реакций в липидной фазе мембран и липопротеинов, а начальные (возможно и промежуточные) стадии этой сложной системы реакций протекают в водной фазе, то поиск водорастворимых антиоксидантов является весьма актуальным.

Таковыми соединениями могут быть флавоноиды и полифенолы растительного происхождения. Данные литературы об антиоксидантной активности веществ полифенольной природы указывают на перспективность поиска на их основе новых препаратов-антиоксидантов. Практически все фенольные соединения обладают антиоксидантной активностью. В частности, при их взаимодействии с окислительными радикалами образуются семихиноидные радикалы и ион-радикалы. В присутствии последних интенсивность пероксидации снижается. При этом активность полифенольных соединений зависит от количества гидроксильных групп в молекуле.

В наших экспериментах наибольшей антиоксидантной активностью обладал супрамолекулярный комплекс МАСГК/Кверцетин. Характерно, что общая картина нормализующего влияния этого и других изученных комплексов на состояние ПОЛ аналогична действию стандартного антиоксиданта-СТД, но по эффективности комплекс МАСГК/Кверцетин значительно превышает действие СТД, и может быть рекомендован для создания на его основе гепатопротекторного препарата.

Список литературы:

1. Rizzato M., Volpes R., Smedile A. Response of pre-core mutant chronic hepatitis B infection to polyphenols // J.Med.Vini. 2000.,61 p. 398-402.
2. Ивашкин В.Т. Клеточная и молекулярная биология воспаления печени // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. -1998. - № 5. -С. 13-18.
3. Буеверов А.О., Грязин А.Е. Клинические аспекты изучения апоптоза при хронических вирусных гепатитах // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии-2006. - № 2.-С. 4-10.
4. Толстикова Г.А., Болтина Л.А., Кондратенко Р.М.Солодка: биоразнообразие, химия и применение в медицине. Новосибирск: НП Академическое изд-во "Гео", 2007.305 С.
5. Liang B.L., Guo J. Jin, Y. C. Ma, Z. Q. Feng. Glycyrrhizic acid inhibits apoptosis and fibrosis in carbon-tetrachloride-induced rat liver in jury. //World Journal of Gastroenterology -2015. - Vol. 21. P. 5271-5280.
6. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Коваленко ИЛ., Толстикова А.Г. Влияние клатратообразования на активность фармакона в комплексах с глицирризиновой кислотой//Доклады АН. 2004. Т. 394. № 2.189-193
7. Доркина Е.К. Изучение гепатозащитного действия природных флавоноидных соединений // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2004.-т.67. -№ 6. -С. 41-46.
8. Ichikawa K., Hashizume K., Yamada I. Ividence for induction by thyroid hormone of cytosolic proteins which control mitochondrial protein synthesis//Endocrinology, -1995.-v.117.-p.1749-1757.

9. Горячковский А.И. Справочное пособие по клинической биохимии. Одесса: ОКФА, 1994. - 415 с.
10. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. - М: Наука, - 1972. - 139 с.
11. Scaffner W., Weisman C. A rapid sensitive and specific method for the determination of protein in deplete solution // *Analyt. Biochem.* -1973.- v.56.-p. 502-506.
12. Гогвадзе В.Г., Брустовский Н.Н., Жукова А.А. Участие фосфолипазы А в индуцированном продуктами перекисного окисления липидов разобщении митохондрий печени крыс//*Биохимия* - Москва, 1990. - т. 55. вып.12 - С. 2195-2199.
13. Ивашкин В.Т. Болезни печени и желчевыводящих путей. М: ООО «Издательский дом м-Вести», 2002. - 416 с.
14. Владимиров Ю.А. Роль нарушения липидного слоя мембран в развитии патологических процессов // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* - 1989. - №4. - С. 7-17.
15. Рубин А.Б. Биофизика. М.: Изд-во Университет. -2000. - С. 61-70.