

Марухленко Алла

**Токсикометрические, стерические и термодинамические дескрипторы
координационных соединений цинка в прогнозировании их биологической
активности**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Москва – 2023

Диссертационная работа выполнена на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»

Научный руководитель:

Морозова Мария Андреевна

кандидат химических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Сяткин Сергей Павлович

доктор биологических наук, профессор, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Медицинский институт, профессор кафедры общей патологии и патологической физиологии им. В.А.Фролова

Гармонов Сергей Юрьевич

доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», Институт нефти, химии и нанотехнологий, профессор кафедры аналитической химии, сертификации и менеджмента качества

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «25» мая 2023 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.021 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6

Электронная версия диссертации, автореферат и объявление о защите размещены на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки РФ (<http://vak.ed.gov.ru/>) и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet>

Автореферат разослан «___» апреля 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ПДС 0300.021

кандидат химических наук, доцент

М.А. Морозова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Лекарственные средства, образуя координационные соединения с ионами d-элементов, приобретают новые фармакологические и токсические свойства. Хелатирование изменяет значения pK_a кислотно-основных равновесий, влияет на активность ферментов и профиля ADME, что приводит к альтернативному протеканию химических реакций, и в итоге – к изменению биологической активности (Moriwa Y. et al., 2020). Результаты доклинических и клинических исследований демонстрируют перспективность новых методов лечения на основе координационных комплексов d-элементов (Boros E. et al., 2020). Стратегия координации иона металла – это эффективный инструмент для получения новых антимикробных препаратов. Например, комплексные соединения некоторых элементов с фторхинолонами обладают повышенной активностью в сравнении с исходными молекулами (Nunes W.D.G. et al., 2018). Соединения хрома и никеля с молекулами лекарственных препаратов (ЛП) группы нестероидных противовоспалительных средств не только сохраняют исходную фармакологическую активность, но и обеспечивают снижение их ulcerогенного действия (Sukul A. et al, 2017). Важно отметить возможность использования координационных соединений в целях повышения биодоступности дефицитных элементов, в частности цинка (Jurca T. et al., 2017; Ali H.A. et al., 2016).

В отличие от многих других эссенциальных микроэлементов цинк не имеет функциональных резервов в организме и дефицит его в пище приводит к резкому отклонению от гомеостатической нормы. Около 17,3% населения всего мира подвержены риску цинк-дефицитных состояний - от 7% в регионах с высоким уровнем доходов до 30% в странах Африки и Южной Азии (Wessells K.R. et al., 2012).

Известно, что цинк (II) транспортируется внутрь клетки с участием специфических белков-переносчиков семейства ZIP (Kambe T. et al., 2021). Конкурирующие двухзарядные катионы металлов (Cu^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+}) и некоторые компоненты пищи (фолиевая кислота, фитаты) значительно снижают транспорт Zn^{2+} (Sauer A.K. et al., 2017). Использование хелатных соединений вместо неорганических (сульфата или оксида цинка) позволяет повысить биодоступность элемента. Хелатирование приводит к делокализации π -электронной плотности в комплексном ионе и снижению полярности центрального атома, тем самым увеличивая возможность пассивного транспорта молекулы (Rahmouni N.T. et al., 2019; Kavanagh O., 2021).

Актуальная задача поиска эффективных лигандов может быть решена с применением методов компьютерного молекулярного дизайна, в частности непрямого моделирования

посредством подхода количественной корреляции «структура» - «активность» (ККСА). Однако вопрос функциональности топологических дескрипторов (индекса Балабана) в отношении прогнозирования свойств координационных соединений в литературе освещен недостаточно. Корреляции между индексом Балабана, отражающим структуру вещества и биофармацевтическими характеристиками хелатных комплексов ионов металлов с органическими лигандами не очевидны и, в связи с этим, требуют дальнейших исследований (*Zhou B., Trinajstić N., 2008; Raos N., Milicevic A., 2009*).

В настоящей работе для прогнозирования активности хелатных соединений цинка и биогенных аминокислот был использован комбинированный подход, позволивший выявить взаимосвязь между структурой соединений, описанной топологическими индексами, их физико-химическими свойствами, выраженными константой распределения октанол-вода и, наконец, энергией активации клеточной гибели как параметром биологической активности вещества. Полученные результаты позволили не только выявить наиболее эффективный лиганд – метионин – но и ответить на один из вопросов в отношении направленности действия координационных соединений цинка. Как оказалось, эффективная доставка дефицитного микроэлемента не сопровождается прямым антибиотическим действием хелата на микрофлору кишечника, но ингибирует образование биопленок патогенной флоры.

Степень разработанности темы исследования

Научно-исследовательским коллективом кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института РУДН разработано программное обеспечение «ChemicPen» и «ChemicDescript» для построения структурных графов и расчета стерических дескрипторов, соответственно (*Попов П.И., Роспатент № 2003612305, 2003; Попов П.И., Роспатент № 2005612770, 2005*). Антимикробное действие, в том числе противотуберкулезная активность, хелатных соединений цинка с биогенными аминокислотами была ранее показана на примере цинк-глицината (*Балышев А.В., Гребенникова Т.В., Сыроешкин А.В., 2004*). Для оценки биологической активности фармацевтических субстанций разработан метод биотестирования на основе изучения аррениусовской кинетики гибели организма *Spirostomum ambiguum* (*Быканова С.Н. и др., 2003; Левицкая О.В., Сыроешкин А.В., Плетенева Т.В., 2015*). В ряде работ показано, что для многих соединений энергия активации ($^{obs}E_a$) медленной стадии процесса гибели клеточного биосенсора находится в корреляции с LD_{50} для тех же субстанций при их пероральном приеме у лабораторных животных (*Goncharuk V. V. et al., 2017; Uspenskaya E.V. et al., 2021; Сыроешкин А.В. и др., 2021*). Неоднократно поднимался и обсуждался вопрос

достоверности получаемых результатов при использовании метода рентгенофлуоресцентной спектроскопии (РФС) для исследования элементного состава биологических объектов со сложной матрицей вспомогательных веществ (*Костыгина М.Н. и др., 2017; Макарова М.П. и др., 2019*). В настоящей диссертационной работе предложен комбинированный подход для прогнозирования биологической активности хелатных соединений металлов на основе взаимосвязи между стерическими (J), термодинамическими ($\log P$) дескрипторами и показателями биологической активности ($^{obs}E_a$) молекулы, а также разработана и валидирована методика количественного определения цинка в составе его хелатного комплекса с аминокислотой с применением метода РФС.

Цель работы: разработать комбинированный подход для прогнозирования биологической активности и оценки физико-химических свойств координационных соединений цинка на основе взаимосвязи между показателями токсичности ($^{obs}E_a$), стерическими (J) и термодинамическими ($\log P$) дескрипторами молекулы.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие **основные задачи:**

1. На примере комплексов цинка с аминокислотами адаптировать существующий алгоритм расчета топологического индекса Балабана для координационных соединений и оценить корректность его применения для описания структуры и прогнозирования физико-химических и биологических свойств.

2. Экспериментально подтвердить результаты, полученные на стадии прогнозирования, и определить молекулу-кандидата при исследовании ингибирующего действия хелатных соединений цинка на процесс образования биопленок в стандартной тест-культуре бактерий.

3. Исследовать антибактериальную активность молекулы-кандидата в отношении стандартных тест-культур бактерий, а также влияние на процесс формирования биопленок в культуре патогенных штаммов.

4. Подтвердить идентичность структуры и физико-химических свойств хелатного комплекса цинка, кристаллизованного из раствора и полученного в результате синтеза молекулы-кандидата.

5. Разработать и валидировать методику количественного определения цинка в составе его хелатного комплекса с аминокислотой с применением метода рентгенофлуоресцентной спектроскопии.

Научная новизна работы

Впервые в мировой практике исследована оптическая активность водных растворов хелатного комплекса цинка с метионином, а также описано изменение угла вращения плоскости поляризованного света в зависимости от концентрации иона-комплексообразователя в растворе. **Впервые** проведена дифференциальная сканирующая калориметрия синтезированного метионината цинка и обнаружены полиморфные фазовые переходы, аналогичные наблюдаемым в кристаллических структурах диморфов L-метионина. **Впервые** исследовано ингибирующее влияние метионината цинка на формирование биопленок в стандартной тест-культуре *E.coli* и в культуре клеток уропатогенных штаммов. **Впервые** разработана и валидирована методика количественного определения цинка в составе метионината цинка с применением метода рентгенофлуоресцентной спектроскопии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Показано, что комплексный подход для прогнозирования биологической активности координационных соединений металлов на основе ККСА-анализа и биотестирования с использованием клеточного биосенсора позволяет успешно имитировать стадии доклинических исследований при разработке лекарственных препаратов. Предложенный в диссертации комбинированный метод позволил выявить отсутствие антибактериального действия метионината цинка при его использовании в качестве цинксодержащей биологически активной добавки. При этом в работе была продемонстрирована способность метионината цинка ингибировать формирование биопленок в культуре клеток патогенных штаммов, что допускает использование препарата в превентивных целях. Разработанная и валидированная методика определения содержания цинка в метионинате цинка может быть использована как в учебном процессе кафедры фармацевтической и токсикологической химии, так и в практике работы контрольно-аналитических лабораторий.

В соответствии с поставленной целью **объектом исследования** выступал процесс QSAR моделирования физико-химических и биологических свойств хелатных структур.

Предметом исследования являлись стерические, термодинамические и токсикометрические молекулярные дескрипторы и их комбинированное применение для прогнозирования свойств координационных соединений цинка.

Методология и методы исследования

Топологические дескрипторы на основе молекулярного графа химического соединения успешно используются в математическом моделировании для прогноза физико-химических параметров и биологической активности молекул-кандидатов. Традиционные подходы к

расчету топологического индекса Балабана (J) основаны на построении матрицы расстояния между ковалентно-связанными атомами соединения, при этом использование стерических дескрипторов для описания молекулярной структуры координационных соединений металлов затруднено. Для учета новой ковалентной связи, возникающей между металлом-комплексообразователем и лигандом по донорно-акцепторному механизму, требуется адаптация существующего алгоритма расчета топологического индекса J. В основу данной диссертационной работы положен комбинированный ККСА подход, объединивший этапы прогнозирования взаимосвязи между структурой, описанной адаптированным стерическим индексом J, и свойствами, выраженными термодинамическим дескриптором ($\log P$) молекулы, с дальнейшей экспериментальной оценкой биологической активности хелатных соединений металлов ($^{obs}E_a$).

Положения, выносимые на защиту:

1. Топологический индекс Балабана адекватно отражает структуру координационных соединений цинка и может быть использован для прогнозирования их физико-химических и биологических свойств.

2. Хелатные комплексы цинка с метионином не оказывают антибактериального действия, однако способны ингибировать формирование биопленок в культуре клеток уропатогенных штаммов.

3. Получение хелатного комплекса путем его кристаллизации из маточного раствора, содержащего метионин и сульфат цинка, позволяет сохранить параметры структуры, присущие синтезированному аналогу, с одновременной оптимизацией биофармацевтических характеристик соединения.

4. Валидация методики количественного определения цинка в составе метионината цинка с применением метода рентгенофлуоресцентной спектроскопии.

Степень достоверности полученных результатов.

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием поверенного современного высокотехнологичного оборудования для проведения физического и физико-химического анализа исследуемых субстанций – ИК-спектроскопии, комплексонометрического титрования, рентгенофлуоресцентной спектроскопии, динамического светорассеяния, поляриметрии, термогравиметрического анализа, дифференциальной сканирующей калориметрии и рентгеновской порошковой дифракции. При проведении микробиологических экспериментов были применены стандартизированные методики, стандартные штаммы бактерий, организованы контрольные измерения. Экспериментальные данные обработаны с помощью оригинального ПО

аналитических приборов. Расчеты и статистическая обработка результатов анализа была произведена с использованием ПО OriginPro 2017 (OriginLab, США). Диссертация включает ссылки на 286 отечественные и иностранные работы, соответствующие теме исследования.

Апробация результатов диссертационной работы.

Основные результаты диссертационного исследования были представлены на конференциях: международная научная конференция 9th Semmelweis International Students' Conference 2019/2020 (Будапешт, Венгрия, 3 сентября 2020 г.); V Всероссийская научная конференция «Клинические и теоретические аспекты современной медицины - 2020» (Москва, Россия, 14 ноября 2020 г.); международная научная конференция «XII International scientific conference #SCIENCE4HEALTH2021», (Москва, Россия, 21-22 Мая 2021 г.); V Международная научно-практическая конференция «Биоэлементы», (Оренбург, Россия, 12-13 мая 2021 г.); 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим – Россия 2021» (Волгоград, Россия, 16-19 мая 2022); на научных семинарах кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института РУДН.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ: в журналах индексируемых в Scopus, WOS – 5, перечень РУДН – 1, а также тезисы конференций – 5.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия по следующим областям исследования (п. 1 и 3):

1. Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ.

3. Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в проведении научных экспериментов и получении экспериментальных данных; обработке и интерпретации полученных экспериментальных данных; апробации результатов исследования, а также соучастию с другими авторами в подготовке публикаций по выполненной работе.

Структура и объём диссертации.

Полный объём диссертации составляет 173 страницы, в том числе 38 рисунков и 22 таблицы. Библиографический список содержит 286 ссылок. Описание представляемого

исследования включает введение, 3 главы, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список цитируемой литературы и приложение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 диссертации посвящена обзору литературы по теме диссертации. В ней приводится общая характеристика цинка как биогенного d-элемента (его биологическая роль и метаболизм в организме человека, цинк-дефицитные состояния, а также его токсичность и антибактериальные свойства), химическая характеристика цинка как металла-комплексообразователя, приведены методики синтеза координационных соединений Zn, примеры их применения, описаны методы определения свободного и координационно связанного цинка в составе молекул лекарственных средств. Отдельное внимание уделено использованию топологических дескрипторов в оценке и прогнозировании свойств координационных соединений.

В Главе 2 диссертации подробно описаны использованные в работе реактивы (субстанции аминокислот и других соединений, культуральные среды, растворители), методики биологических (клеточный биосенсор *S. ambigua*) и микробиологических экспериментов (прямая антибактериальная активность, влияние на биопленки, культуры стандартных и патогенных штаммов бактерий), приведены характеристики использованного оборудования (анализатор размеров частиц Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical, Великобритания) измеритель дисперсности лазерный ИДЛ-1 «Кластер-1», ИК Фурье-спектрометр Cary 630 (Agilent, США), энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр EDX-7000 (Shimadzu, Япония), система термического анализа TGA/DSC 3+ (Mettler Toledo, Швейцария), поляриметр Atago POL-1/2 (Atago Co., LTD, Япония), дифрактометр Bruker d8 Advance (Bruker, Германия)) и методики синтеза молекулы-кандидата – метионината цинка. Отдельный раздел главы 2 посвящен расчетам и описанию программного обеспечения, использованного в ККСА анализе.

Глава 3 диссертации посвящена результатам исследования и их обсуждению:

1. Прогнозирование физико-химических и биологических свойств координационных соединений d-элементов на примере комплексов цинка и биогенных аминокислот.

Комбинация стерического, термодинамического и токсикометрического дескрипторов была использована для описания и прогнозирования свойств молекул десяти биогенных аминокислот (АК) и их хелатных комплексов с цинком.

Адаптация алгоритма расчета индекса Балабана (J) для хелатных соединений заключалась в том, что при построении матрицы расстояния связи центрального атома с лигандами принимались в расчет как равнозначные варианты ковалентной связи. В результате проведенного расчета определено значение диагонального элемента для атома цинка (0,8), а также величины недиагональных элементов матрицы для связи Zn-O и Zn-N – 0,15 и 0,171 соответственно.

Было показано, что дискриминирующая способность J в отношении отобранных аминокислот низка и не различает их между собой по значениям липофильности (рис. 1). Однако введение катиона цинка и формирование структур состава Zn(AK)₂ приводит к линейаризации зависимости между двумя переменными – J и logP. Координация металла сопровождается делокализацией электронной плотности в системе образуемых хелатных колец и в итоге позволяет получить более липофильное металлсодержащее соединение за счет снижения полярности центрального иона (Chohan Z.H., Supuran C.T., Scozzafava A., 2005). В соответствии с представлениями одного из основоположников ККСА анализа, Корвина Ханша, для эффективного распределения, трансмембранного транспорта и последующего связывания с рецептором молекула лекарственного соединения не должна обладать экстремально гидрофильными или липофильными характеристиками. Из набора анализируемых соединений указанным критериям в большей степени соответствует цинка метионинат, со средним значением logP= -2,44.

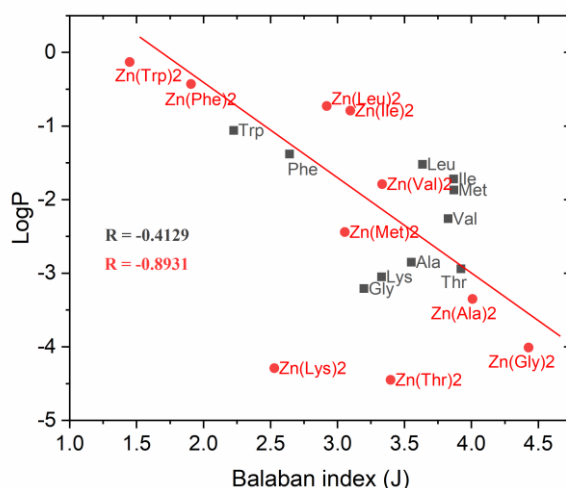


Рисунок 1. Зависимость структура (J) – свойство (logP) в выборке биогенных аминокислот и их хелатных комплексов с цинком.

Источник: составлено автором

Введение третьего, токсикометрического дескриптора, в качестве которого использовали экспериментально полученные значения кажущейся энергии активации лиганд-

индуцированной клеточной гибели изолированной клетки организма *Spirostomum ambiguum* ($^{obs}E_a$), позволило сделать ряд важных заключений (рис. 2).

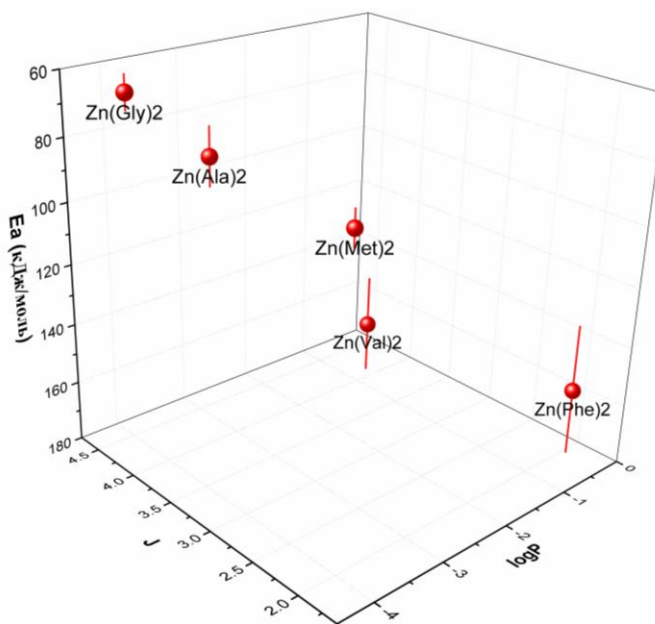


Рисунок 2. Взаимосвязь стерического, физико-химического и токсиметрического дескрипторов молекул координационных комплексов цинка с биогенными аминокислотами.

Источник: составлено автором

Так, результат биологического эксперимента, с одной стороны, демонстрирует строгую взаимосвязь энергии активации, как интегрального параметра биологической активности, с таким физико-химическим параметром соединения как липофильность, а, с другой стороны, указывает на корректность использования адаптированного индекса Балабана для описания и прогноза свойств хелатных структур.

ККСА подход с комбинацией трех видов дескрипторов позволил наиболее точным образом установить и отобрать перспективное соединение из группы хелатных комплексов цинка с аминокислотами для последующих этапов экспериментальной работы.

2. Исследование ингибирующего действия хелатных соединений цинка на процесс образования биопленок в стандартной тест-культуре бактерий.

Доказательство антибактериальной активности цинк-глицината послужило основанием для сужения поиска спектра действия аминокислотных комплексов цинка и оценки их противомикробных свойств.

Ингибирующее влияние на процесс образования биопленок в стандартной тест-культуре клеток *E. coli* BL 21 было исследовано для пяти аминокислотных координационных комплексов цинка – с Gly, Ala, Met, Val, Phe (Березинская Т.Л., 2005; Буянова Н.И. и др., 2008). Исследуемая концентрация $Zn(AK)_2$ – 1 ммоль/л, положительный контроль - среда LB,

время инкубирования – 12 часов. Метод малоуглового лазерного светорассеяния позволил получить данные о морфофункциональном состоянии бактериальной популяции по количеству и размерам частиц дисперсной фазы (Syroeshkin A.V., Popov P.I., Grebennikova T.V., 2005). Результаты численного распределения бактериальных клеток в инкубированной ночной культуре *E. coli* BL 21 приведены на рис. 3А. Частицы размером от 0,4 до 60 мкм детектируются во всех исследуемых растворах, при двадцатикратном численном преимуществе в контрольном образце, где максимум численного распределения клеток приходится на фракцию агломератов размером 20 мкм. Снижение числа полицеллюлярных ассоциатов при сохранении большого числа единичных клеток (4 мкм) наблюдается в растворах $Zn(Met)_2$ и $Zn(Ala)_2$.

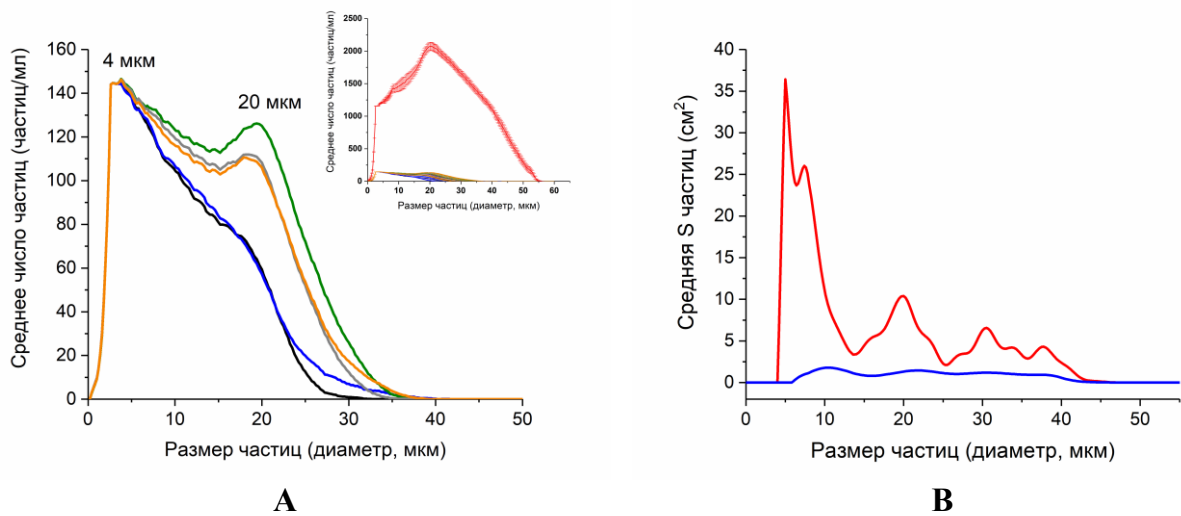


Рисунок 3. Сравнительное исследование хелатных комплексов $Zn(AK)_2$ по их ингибирующему влиянию на образование биопленок ($n=3$), красный – положительный контроль, черный – раствор $Zn(Ala)_2$, синий - раствор $Zn(Met)_2$, зеленый - раствор $Zn(Val)_2$, серый - раствор $Zn(Gly)_2$, оранжевый - раствор $Zn(Phe)_2$. **Вставка:** Среднее численное распределение частиц по размерам в контрольном (красный) и исследуемых растворах комплексов аминокислот с цинком ($\bar{X} \pm SD$, $n=3$) (А), сравнительное исследование средней общей площади поверхности частиц контрольного и испытуемого раствора метионината цинка в зависимости от их размера частиц ($n=3$), красный – положительный контроль, синий - раствор $Zn(Met)_2$ (В).

Источник: составлено автором

Полученные экспериментальные данные и результаты ККСА моделирования, с учетом липофильности и установленной токсичности, ограничили выбор молекулы-кандидата метионинатом цинка. Предварительные результаты изучения его способности угнетать развитие биопленок (рис. 3В), позволили приступить к оценке антибактериального действия метионината цинка на культурах стандартных и патогенных штаммов бактерий.

3. Исследование антибактериальной активности молекулы-кандидата в отношении стандартных тест-культур бактерий, а также влияния на формирование биопленок в культуре патогенных штаммов.

Антимикробную активность метионината цинка оценивали методом диффузии в агар Мюллера-Хинтона в отношении двух стандартных штаммов Гр «+» и Гр «-» бактерий: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Escherichia coli* ATCC 25922, соответственно. Критерием подбора максимальной концентрации испытуемого раствора служили данные о предельной растворимости метионина в воде (от 10 до 30 мл воды на 1,0 г метионина). В качестве контролей использовали водный раствор Met (204,80 ммоль/л), водный раствор ZnSO₄ (10,24 ммоль/л), воду очищенную и стандартный раствор канамицина (1024 мкг/мл). После инкубирования образцов при 37°C в течение 24 часов были измерены диаметры зон угнетения роста микроорганизмов. Исследуемый раствор метионината цинка в концентрации 10,24 ммоль/л (3,7048 мг/мл), а также все контрольные образцы, за исключением стандартного раствора канамицина, не продемонстрировали явного антимикробного действия в отношении стандартных штаммов.

Дополнительный эксперимент по определению минимальной ингибирующей концентрации (МИК) метионината цинка позволил сделать окончательный вывод о его антибактериальных свойствах. Исследование проводили с использованием 96-луночного микропланшета методом двукратного последовательного разведения испытуемого раствора метионината цинка (10,24 ммоль/л), отрицательный контроль – питательная среда СМБ без внесения инокулята бактерий. После инкубирования микропланшетов при 37°C в течение 24 часов по отсутствию видимого роста микроорганизмов была определена МИК Zn(Met)₂ в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 – 0,463 мг/мл.

Поиск антимикробных агентов, влияющих на жизнеспособность бактерий в биопленках, это перспективное направление фармацевтических исследований, поскольку формирование клеточных ассоциатов значительно снижает эффективность антибактериальной терапии инфекционных заболеваний (Harrison J.J. et al., 2005; Lopez D., Vlamakis H., Kolter R., 2010). Для исследования влияния Zn(Met)₂ на формирование биопленок использовали 6 штаммов патогенных культур (Гр «+»: *Staphylococcus aureus* 1449, *Streptococcus agalactiae* 3984, *Staphylococcus simulans* 5882; Гр «-»: *Escherichia coli* M17, *Enterococcus cloacae* 6392, *Acinetobacter baumannii* 5841), выделенных из мочи пациентов с диагностированной инфекцией мочевыделительной системы, а также указанные выше стандартные штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Escherichia coli* ATCC 25922.

Влияние метионината цинка на формирование биопленок в культуре стандартных и патогенных штаммов бактерий было изучено методом микротитрования с использованием 96-луночного микропланшета (O'Toole G.A., 2011). Водный раствор метионината цинка исследовали в пяти рабочих концентрациях: 0,512, 1,240, 2,560, 3,840 и 5,120 ммоль/л, положительный контроль – среда СМБ, отрицательный контроль – рабочие концентрации раствора $Zn(Met)_2$ без добавления инокулята бактерий. После инкубирования микропланшетов при 37°C в течение 48 часов оставшиеся на поверхности лунок биопленки, сформированные бактериями, окрашивали 1% раствором кристаллического фиолетового. По интенсивности абсорбции ($\lambda=550$ нм) оценивали степень ингибирования формирования биопленок (%).

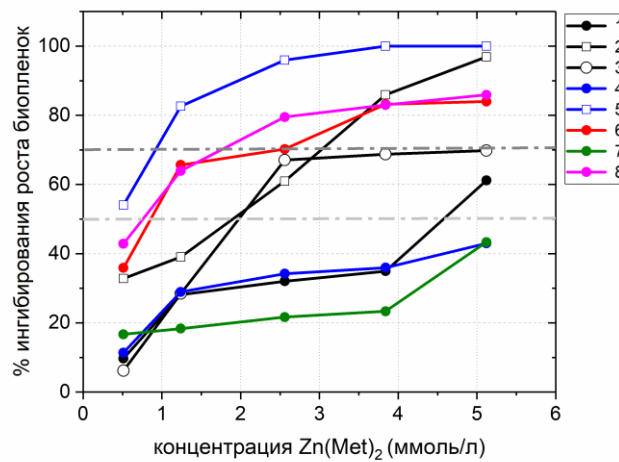


Рисунок 4. Ингибирующее влияние метионината цинка на формирование биопленок в культуре штаммов бактерий: *Staphylococcus aureus* 1449 (1), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (2), *Staphylococcus simulans* 5882 (3), *Escherichia coli* M17 (4), *Escherichia coli* ATCC 25922 (5), *Streptococcus agalactiae* 3984 (6), *Enterococcus cloacae* 6392 (7), *Acinetobacter baumannii* 5841 (8).

Источник: составлено автором

Как показано на рисунке 4, все испытуемые растворы $Zn(Met)_2$ продемонстрировали активность в отношении процесса образования биопленок – степень ингибирования увеличивается от 9,71 до 100% с ростом концентрации комплекса. Результаты исследования демонстрируют селективность действия метионината цинка в отношении испытуемых культур. Высокие значения ингибирования биопленок (>70%) в культурах *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Escherichia coli* ATCC 25922 могут быть обусловлены тем, что они являются стандартными тест-штаммами без сформированной антибиотикорезистентности. *Escherichia coli* M17 - представитель нормального микробиоценоза кишечника человека. Низкие показатели ингибирования (<45%) свидетельствуют о том, что метионинат цинка не будет влиять на образование биопленок культурой *Escherichia coli* M17 на стенках

кишечника, а, следовательно, нарушать нормальную микрофлору организма человека при систематическом приеме в качестве цинксодержащей биодобавки.

4. Синтез хелатного комплекса цинка с аминокислотой (молекулы-кандидата) и характеристика его физико-химических свойств

Для получения хелатного комплекса цинка с метионином были использованы две различные методики. Первый координационный комплекс вероятного состава $Zn(Met)_2$ был получен в результате взаимодействия цинка сульфата и щелочного раствора метионина в мольном соотношении 1:2 при температуре $60^\circ C$. Полученный осадок был отфильтрован, промыт, а затем высушен до постоянной массы при $105^\circ C$. Второй способ - кристаллизация хелатного соединения в условиях испарения растворителя при комнатной температуре ($20-25^\circ C$). Состав маточной среды - водный раствор $ZnSO_4$ и Met в мольном соотношении 1:2, $pH = pI = 5,74$. Вероятный состав полученных кристаллов - $Zn(Met)_2SO_4$. Синтезированный метионинат цинка $Zn(Met)_2$ представлял собой белый кристаллический порошок, практически нерастворимый в воде, кристаллизованный метионинат цинка $Zn(Met)_2SO_4$ – бесцветные или белые игольчатые кристаллы, мало растворимые в воде. Предполагаемые структурные формулы обоих соединений приведены на рисунке 5.

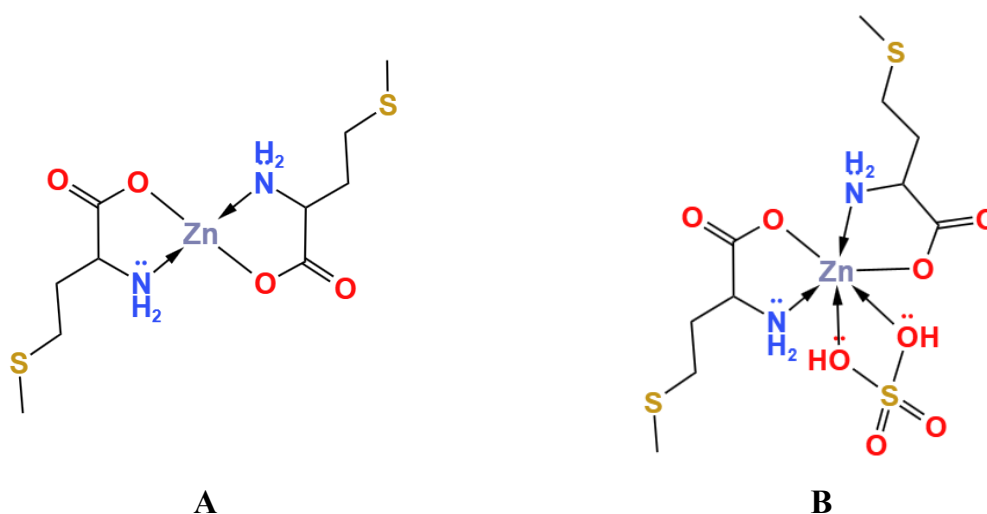


Рисунок 5. Гипотетические структурные формулы синтезированного метионината цинка $Zn(Met)_2$ (A) и кристаллизованного метионината цинка $Zn(Met)_2SO_4$ (B).

Источник: составлено автором

В нейтральном растворе синтезированного метионината цинка были детектированы частицы размером от 340 до 712 нм с максимумом при 460 нм. В то же время раствор кристаллизованного метионината цинка продемонстрировал бимодальное распределение частиц в диапазоне от 35 до 712 нм с максимумами при 79 и 396 нм. Полученные результаты оценки растворимости и дисперсного состава субстанций позволяют

предположить, что кристаллизованное соединение по сравнению с синтезированным $Zn(Met)_2$ может иметь фармакокинетические преимущества при пероральном приеме внутрь.

Образование координационной связи в полученных соединениях было подтверждено результатами спектрального анализа в ИК-области - оба образца характеризовались присутствием координированной аминогруппы в спектрах колебаний в виде дублета при 3339 и 3252 cm^{-1} и отсутствием полосы поглощения свободной карбоксильной группы при 1500 cm^{-1} . Отсутствие значимых полос поглощения в области частот выше 3450 cm^{-1} свидетельствовало об отсутствии связи О-Н, а, следовательно, молекул как кристаллизационной, так и адсорбированной воды в обеих структурах. Присутствие цинка в синтезированном и кристаллизованном комплексах подтверждено методом РФС по наличию характерного сигнала рентгеновской флуоресценции металла при его K_α и K_β линиях – 8,632 и 9,572 кэВ, соответственно. Количественная оценка содержания цинка в составе синтезированного метионината $Zn(Met)_2$, проведенная методами комплексонометрического титрования и термогравиметрического анализа, показала нарушение стехиометрии металл-лиганд 1:2 в синтезированном комплексе ($\omega(Zn)_{расч} = 18,07\%$; $\omega(Zn)_{титрование} = 18,23\%$; $\omega(Zn)_{TGA} = 19,23\%$). Полученные результаты позволяют подтвердить полимерную структуру полученного соединения, которую можно описать следующим образом: один атом цинка связан с более чем двумя молекулами метионина, но при этом каждая молекула метионина связана с более чем одним атомом цинка (*Wilson R.B., Meester P., Hodgson D.J., 1977*).

Кристаллизованный и синтезированный метионинат цинка были также исследованы методом ДСК. Известно, что для субстанций L- и DL-метионина характерно явление полиморфизма: термодинамическая точка перехода $\alpha \leftrightarrow \beta$ полиморфных форм детектирована в диапазоне температур от 274 до 323 К с максимумом около 309 К. (*Torii K., Iitaka Y., 1973; Smets M.M.H. et al., 2016; Yamanobe M., Takiyama H., Matsuoka M., 2002; Suresh M., Srinivasan K., 2021*). На ДСК термограммах обоих образцов метионината цинка максимум эндотермического пика зафиксирован при 320 К, что свидетельствует о смещении термодинамической точки полиморфного перехода ($\beta \rightarrow \alpha$), характерного для L-метионина (рис. 6). На ДСК термограмме кристаллизованного метионината цинка сохраняется также пик при 309 К, что позволяет сделать вывод о присутствии свободного L-Met в β -форме в кристаллах $Zn(Met)_2SO_4$. Полученные результаты не только подтверждают образование хелатного соединения в обоих случаях, но и указывают на возможное сохранение в их кристаллах присущей L-метионину двумерной структуры, стабилизированной

водородными связями и Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями. Обнаружено также, что дифрактограммы хелатных соединений метионина с цинком имеют ряд различий в положениях характеристических пиков относительно рентгенограммы кристаллов L-метионина. Однако в то же время, дифрактограмма кристаллизованного комплекса $Zn(Met)_2SO_4$ аналогична дифрактограмме синтезированного комплекса $Zn(Met)_2$ с некоторыми различиями ввиду присутствия сульфатов в структуре.

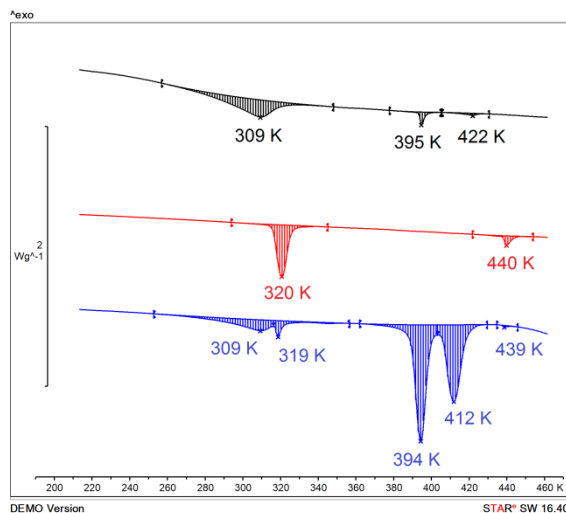


Рисунок 6. ДСК термограммы L-метионина (черный), синтезированного $Zn(Met)_2$ (красный) и кристаллизованного $Zn(Met)_2SO_4$ (голубой) комплексов при первом нагревании образцов.

Источник: составлено автором

Исследования оптической активности водных растворов $Zn(Met)_2SO_4$ проводили при $pH = pI(Met) = 5,74$. При смешивании растворов, содержащих Zn^{2+} и Met в мольных соотношениях 1:20, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1 было отмечено, что оптическая активность полученных растворов отличается от оптической активности раствора метионина (рис. 7А). При этом контрольный раствор $ZnSO_4$ с концентрацией 6,7 ммоль/л, как и следовало ожидать, не обладал оптической активностью ($\alpha=0,00 \pm 0,00$, $n = 5$), а влияние ионной силы, возрастающей от 0,1 до 0,64 моль/л, оказалось не значимо (рис. 7В). С ростом концентрации катиона металла изменения в дисперсном составе растворов, связанные с возможным образованием коллоидных частиц $Zn(OH)_2$, не установлены. Было обнаружено формирование обратной экспоненциальной зависимости между значениями оптической активности полученных растворов и концентрацией ионов цинка в них: с увеличением концентрации Zn^{2+} уменьшается угол вращения плоскости линейно поляризованного света.

В научной периодике описано явление формирования новой оси хиральности в хелатных соединениях аминокислот с ионами металлов (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Pt^{2+} и др.) за счет образования связей Me-O и Me-N: два аминокислотных остатка хелатируют металл-

комплексообразователь с формированием *цис*- и *транс*- изомеров плоско-квадратной структуры с двумя хелатными кольцами (Condrate R.A., Nakamoto K., 1965; Yasui T., 1965). Полученные нами в эксперименте значения оптической активности хелатного комплекса метионина с цинком подтверждают описанное в литературе явление: при увеличении концентрации катионов Zn^{2+} в растворе метионина возрастает доля координированных аминокислот и, соответственно, количество образованных новых осей хиральности. Однако, при смешивании растворов Zn^{2+} и Met в мольных соотношениях $> 1:1$ дальнейшего изменения оптического вращения не наблюдается. Данное явление можно объяснить формированием предельного количества координационных связей между свободной аминокислотой и катионами металла при их соотношении 1:1 с образованием максимально возможного количества новых осей хиральности. Последующее добавление избыточного количества Zn^{2+} (> 134 ммоль/л) не изменяет оптической активности раствора ввиду отсутствия в нем свободных лигандов.

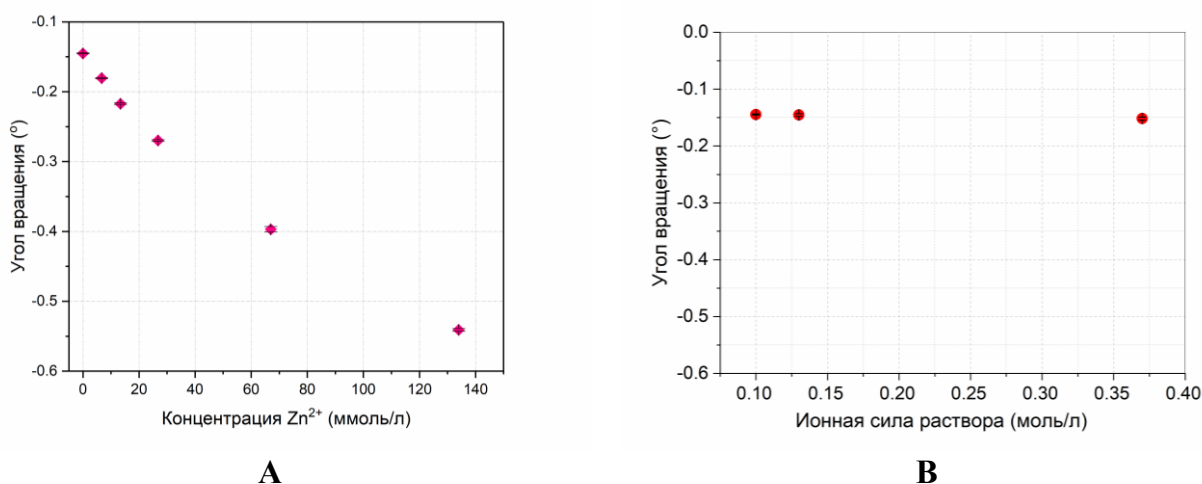


Рисунок 7. Оптическая активность растворов L-метионина (134 ммоль/л) и цинка сульфата при протекании реакции комплексообразования при pH 5,74 в условиях повышения концентрации комплексообразователя ($\bar{X} \pm SD$, n=5) (А), изменение угла оптического вращения раствора с увеличением ионной силы в нем ($\bar{X} \pm SD$, n=5) (В).

Источник: составлено автором

Синтезированный хелатный комплекс цинка с метионином $Zn(Met)_2$ практически нерастворим в воде, поэтому его оптическая активность была исследована в водных растворах при pH -1 и 12. В качестве контроля были использованы 2% растворы метионина, приготовленные в аналогичных условиях (Таблица 1).

Таблица 1. Удельное вращение водных растворов $Zn(Met)_2$ и *L-Met* при различных значениях pH.

pH	$[\alpha]_D^{20} \pm SD$	
	$Zn(Met)_2$	Met
-1	$+14,00 \pm 0,31$	$+23,24 \pm 0,06$
12	$-2,64 \pm 0,29$	$+2,19 \pm 0,03$

Полученные результаты демонстрируют различия в оптической активности растворов свободной аминокислоты и ее хелатного комплекса с цинком: значения удельного вращения растворов $Zn(Met)_2$ всегда ниже вне зависимости от pH среды. Интересно отметить, что методом динамического светорассеяния было обнаружено наличие сильного и стабильного сигнала, соответствующего присутствию в щелочном растворе $Zn(Met)_2$ фракции частиц размером около 51 нм. Таким образом, было показано, что растворение метионината цинка в щелочной среде не приводит к полному разрушению хелатной структуры, но позволяет получить цинксодержащие наночастицы.

5. Разработка и валидация методики количественного определения цинка в составе его хелатного комплекса с аминокислотой методом рентгенофлуоресцентной спектроскопии.

Несмотря на то, что метод рентгенофлуоресцентной спектрометрии регламентирован ГФ РФ для применения в целях количественного анализа металлсодержащих лекарственных субстанций, его практическое применение зачастую ограничено вследствие матричного эффекта органических лигандов (*Костыгина М.Н. и др., 2017*). Согласно представленным ранее результатам, в процессе хелатирования цинка аминокислотой происходит образование координационного соединения с нарушением стехиометрического соотношения металл-лиганд - 1:2. Наблюдаемый матричный эффект значительно снижает точность калибровочной модели, построенной с использованием стандартных образцов сухой смеси цинка сульфата моногидрата и метионина в разных мольных соотношениях. В соответствии с указаниями государственной фармакопеи, для уменьшения эффектов поглощения и возбуждения, нарушающих линейный вид калибровочных прямых, анализируемую пробу необходимо разбавлять прозрачным для рентгеновских лучей веществом, в том числе водой.

Разработанная РФА методика количественного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов (цинка сульфат и метионин в мольном соотношении 1:2), была оценена по следующим валидационным параметрам: *специфичность, аналитическая*

область, линейность, правильность и прецизионность (ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ 14).

Специфичность методики устанавливали по стабильности сигнала характерной рентгеновской флуоресценции цинка в присутствии других элементов – железа, серебра и меди. Линии характеристической флуоресценции примесных металлов (Ag – 22,105 кэВ, Fe – 6,400 кэВ, Cu – 8,042 кэВ) не перекрывали сигнала цинка (8,632 кэВ), интенсивность его флуоресценции сохранялась на том же уровне, как и в отсутствие добавленных солей. Аналитическую область оценивали для каждого из трех уровней концентраций (0,5–5; 5–25 и 25–100 ммоль/л Zn^{2+}) по результатам трех измерений: однородность дисперсий доказана при низкой и высокой концентрации элемента каждого из аналитических диапазонов. Установлена линейность методики для каждого из трех уровней концентрации (0,5–5; 5–25 и 25–100 ммоль/л Zn^{2+}), коэффициенты корреляции Пирсона (R) составили – 0,9999; 1; 0,9999, соответственно. Правильность разработанной методики оценивали, применяя арбитражный метод комплексонометрического титрования водных растворов цинка сульфата с метионином. Ошибка определения во всех трех аналитических областях не превысила трех процентов. Прецизионность методики, оцененная по величине относительного стандартного отклонения, не превысившего 2% для любого из уровней концентрации, соответствует требованиям НД. Функциональность созданной РФА методики количественного определения цинка проверили для водного раствора синтезированного комплекса $Zn(Met)_2$ с известной концентрацией металла, ошибка определения составила 1,02%. Таким образом, показано, что с применением разработанной РФА методики, возможно проводить количественный анализ цинксодержащих ЛС в водных растворах с получением правильных и воспроизводимых результатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе предложен комплексный подход для прогнозирования биологической активности и оценки физико-химических свойств координационных соединений цинка на основе взаимосвязи между показателями токсичности ($^{obs}E_a$), стерическими (J) и термодинамическими (logP) дескрипторами молекулы. Продемонстрирована взаимосвязь энергии активации, как интегрального параметра биологической активности, с таким физико-химическим параметром соединения как липофильность. Полученные в работе с клеточным биосенсором результаты указывают на корректность использования адаптированного индекса Балабана для описания и прогноза свойств хелатных структур. Успешность моделирования была продемонстрирована в скрининговом микробиологическом исследовании, позволившем окончательно установить молекулу-кандидата с максимальным фармакологическим эффектом и умеренной прогнозируемой токсичностью. Метионинат цинка, применяемый в качестве цинксодержашей биодобавки, безопасен для биома кишечника, при этом угнетает развитие полицеллюлярных агломератов патогенных штаммов. Предложены подходы к оценке показателей качества перспективной субстанции метионината цинка, полученной различными способами. Для практического использования субстанций-кандидатов надлежащего качества разработана и валидирована методика определения цинка в обоих хелатных соединениях методом рентгенофлуоресцентного анализа.

ВЫВОДЫ

1. Разработан комбинированный подход для прогнозирования биологической активности и оценки физико-химических свойств координационных соединений цинка на основе взаимосвязи между показателями токсичности ($^{obs}E_a$), стерическими (J) и термодинамическими (logP) дескрипторами молекулы.

2. На примере комплексов цинка с аминокислотами адаптирован существующий алгоритм расчета топологического индекса Балабана для координационных соединений (диагональный элемент матрицы расстояния для Zn – 0,8; недиагональные – 0,15 для Zn-O и 0,171 для Zn-N); оценена корректность его применения при описании структуры и прогнозировании физико-химических и биологических свойств хелатных соединений цинка с аминокислотами.

3. По результатам комбинированного подхода ККСА - прогнозирования и исследования ингибирующего действия хелатных соединений цинка на процесс образования биопленок в стандартной тест-культуре бактерий определена молекула-кандидат – метионинат цинка.

4. Продемонстрировано отсутствие антибактериальной активности метионината цинка в отношении стандартных тест-культур бактерий *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Escherichia coli* ATCC 25922, однако выявлено его влияние на формирование биопленок в культуре патогенных штаммов: *Staphylococcus aureus* 1449 (максимальная степень ингибирования 61 %), *Staphylococcus simulans* 5882 (70 %), *Escherichia coli* M17 (43 %), *Streptococcus agalactiae* 3984 (84 %), *Enterococcus cloacae* 6392 (43 %), *Acinetobacter baumannii* 5841 (86 %).

5. Получены два типа хелатных комплексов цинка с метионином – $Zn(Met)_2$ и $Zn(Met)_2SO_4$, методами ИК-спектроскопии и рентгеновской дифракции доказана их структурная схожесть, а также по данным эндотермических фазовых переходов при 320 К установлена их полимерная природа. Показано формирование оптически активных цинксодержащих наночастиц в водных растворах обеих субстанций.

6. Разработана и валидирована (специфичность, аналитическая область (0,5–5; 5–25; 25–100 ммоль/л), линейность (0,9999; 1; 0,9999), правильность ($\delta < 3\%$), прецизионность (RSD < 2%)) методика количественного определения цинка в составе его хелатного комплекса с метионином методом рентгенофлуоресцентной спектроскопии.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

МЦБ:

1. Morozova, M.A. Slow quasikinetik changes in water-lactose complexes during storage / Morozova M.A., Koldina A.M., Maksimova T.V., **Marukhlenko A.V.**, Zlatsky I.A., Syroeshkin A.V. // *International Journal of Applied Pharmaceutics*. – 2021. – V. 1 (13) – P. 232–237. DOI: 10.22159/ijap.2021v13i1.39837.
2. **Марухленко, А.В.** Разработка и валидация методики количественного определения цинка в его хелатных комплексах с использованием энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии / **Марухленко, А.В.**, Максимова, Т.В., Плетенева, Т.В., Морозова, М.А. // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. –2021. – Т. 10 (4). – С. 154–161. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-154-161.
3. **Marukhlenko, A.V.** Chelation of zinc with biogenic amino acids: description of properties using Balaban index, assessment of biological activity on *Spirostomum ambiguum* cellular biosensor, influence on biofilms and direct antibacterial action / **Marukhlenko, A.V.**, Morozova, M.A., Mbarga A.M.J., Antipova, N.V., Syroeshkin, A.V., Podoprigora, I.V., Maksimova, T.V. // *Pharmaceutics*. – 2022. – Т. 15 (8). – P. 979. DOI: 10.3390/ph15080979.
4. Mbarga, A.M.J. Optimization of ethanolic extraction of *Enantia chloranta* bark, phytochemical composition, green synthesis of silver nanoparticles, and antimicrobial activity / Mbarga A.M.J., Podoprigora, I.V., **Marukhlenko, A.V.**, Morozova, M.A., Goriainov, S.V., Esparza, C., Anyutoulou, D.K.L., Kezimana, P., Kamgang, N.W., Tuturov, N.S., Manar, R., Smolyakova, L.A., Souadkia, S., Senyagin, A.N., Khelifi, I., Khabadze, Z.S., Karnaeva, A.S., Todua, I.M., Pikina, A.P., Gabin, A.A., Ndandja, D.T.K., Kozhevnikova, L.A., Pilshchikova O.V. // *Fermentation*. – 2022. – Т. 8 (10). – P. 530. DOI: 10.3390/fermentation8100530.
5. **Marukhlenko, A.V.** Comparative Analysis of Physical and Chemical Properties of Differently Obtained Zn—Methionine Chelate with Proved Antibiofilm Properties (Part II) / **Marukhlenko, A.V.**, Tumasov, V.N., Butusov, L.A., Shandryuk, G.A., Morozova, M.A. // *Pharmaceutics*. – 2023. – Т. 15(2). – P. 590. DOI: 10.3390/pharmaceutics15020590.

Перечень РУДН:

1. Морозова, М.А. Многомерный анализ спектров рентгеновской флуоресценции как возможный подход для сравнительного изучения элементного состава плодов и семян *Mangifera Indica*, *Actinidia Deliciosa*, *Nigella* sp. / Морозова, М.А., **Марухленко, А.В.**, Максимова, Т.В., Ньямбосе, Дж. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2022. – Т. 25 (4). – С. 10–14. DOI: 10.29296/25877313-2022-04-02.

Марухленко Алла

(Украина)

**ТОКСИКОМЕТРИЧЕСКИЕ, СТЕРИЧЕСКИЕ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ
ДЕСКРИПТОРЫ КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЦИНКА В
ПРОГНОЗИРОВАНИИ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ**

Диссертационное исследование посвящено разработке комплексного подхода для прогнозирования биологической активности и оценки физико-химических свойств координационных соединений цинка на основе взаимосвязи показателей токсичности ($^{obs}E_a$), стерических (J) и термодинамических (logP) дескрипторов молекулы. Корректность использования адаптированного расчета индекса Балабана для описания и прогнозирования свойств хелатных соединений с последующим выделением молекулы-кандидата доказана при исследовании ингибирующего действия хелатных соединений цинка на процесс образования биопленок в стандартной тест-культуре бактерий. Изучена антибактериальная активность молекулы-кандидата в отношении стандартных тест-культур и патогенных штаммов. Предложены методы контроля качества субстанции метионината цинка (молекулы-кандидата), полученной различными способами, а также разработана и валидирована методика определения цинка в хелатных соединениях с применением рентгено-флуоресцентного анализа.

Marukhlenko Alla

(Ukraine)

**TOXICOMETRIC, STERIC AND THERMODYNAMIC DESCRIPTORS OF ZINC
COORDINATION COMPOUNDS IN PREDICTING THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY**

The dissertation work is devoted to the development of an integrated approach for predicting biological activity and evaluating the physicochemical properties of zinc coordination compounds based on the relationship between toxicity indicators ($^{obs}E_a$), steric (J) and thermodynamic (logP) descriptors of the molecule. The correctness of using the adapted calculation of the Balaban index to describe and predict the properties of chelated compounds with subsequent isolation of the candidate molecule was proved by studying the inhibitory effect of zinc chelated compounds on the formation of biofilms in a standard bacterial test culture. The antibacterial activity of the candidate molecule against standard test cultures and pathogenic strains of bacteria, has been studied. Methods of quality control of zinc methioninate substance (candidate molecule) are proposed. The method of quantitative zinc determination in chelated compounds using X-ray fluorescence analysis is developed and validated.