# Торшин И.Ю. <sup>1</sup>, Калачева А.Г.<sup>2</sup>, Громова О.А.<sup>2</sup>, Косенко И.М.<sup>3</sup>, Федотова Л.Э.<sup>2</sup>

## Хемоинформационный анализ цитрат-аниона в составе цитрата магния: антигиперлипидемические, антигликемические, противоопухолевые, седативные эффекты

#### сведения об авторах:

Торшин И.Ю<sup>2</sup>, **Торшин Иван Юрьевич,** к.ф-м.н., доцент кафедры интеллектуальные системы ГБАОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)». Адрес для переписки: 141700, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, д.9. Телефон: (499) 135-2489, (4932) 41-6525, Moscow, Dolgoprudnii, Institutskiy lane, 9.

Калачева А.Г.<sup>1</sup>, **Калачева Алла Геннадьевна** к.м.н., доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ИвГМА, Адрес: 153000, Иваново, пр. Шереметевский, 8, Телефон: (4932) 41-6525, Ivanovo, Sheremetevskyi pr. 8, Tel. (84932) 30-1766

Громова О.А.¹, **Громова Ольга Алексеевна,** д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ГБОУ ВПО ИвГМА Минсоцздравразвития РФ, Адрес для переписки: unesco.gromova@gmail.com, Адрес: 153000, Иваново, Шереметевский пр., 8, Телефон: (4932) 41-65-25. Ivanovo, Sheremetevskyi pr. 8, Tel. (84932) 30-1766

Косенко И.М., **Косенко Ирина Максимовна**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры офтальмологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургского государственного педиатрического университета, Адрес: 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская 2, SPb, Litovskaya, 2, Телефон: +7 (812) 416-5282. E-mail: Ikos2511@yandex.ru

Федотова Л.Э.<sup>1</sup>, **Федотова Любовь Эдуардовна**, к.м.н., доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии ГБОУ ВПО ИвГМА Минсоцздравразвития РФ, Адрес для переписки: <a href="mailto:unesco.gromova@gmail.com">unesco.gromova@gmail.com</a>, Адрес: 153000, Иваново, Шереметевский пр., 8, Телефон: (4932) 41-65-25. Ivanovo, Sheremetevskyi pr. 8, Tel. (84932) 30-1766

<sup>1</sup>ГБАОУ ВПО Московский физико-технический институт (государственный университет) <sup>2</sup>ГБОУ ВПО Ивановская Государственная Медицинская Академия МЗ РФ <sup>3</sup> ГБОУ ВПО Санкт-Петербургский Государственный Педиатрический Университет

#### Абстракт

Недостаточность магния является фактором риска многочисленных хронических патологий. Для компенсации дефицита магния перспективно использовать соли магния с анионами органических кислот, которые повышают биоусвояемость магния за счет транспорта Mg<sup>2+</sup> внутрь клеток. Важным эффектом цитрат-аниона является нормализация рН крови и мочи; проявляет выраженное уролитическое действие. В работе представлены результаты хемоинформационного анализа цитрат-аниона в составе цитрата магния. Впервые показано, что цитрат-анион может характеризоваться самостоятельными гиперлипидемии «целевыми» эффектами: снижением глюкозотолерантности, кроветворения, седативным действием, улучшением противоопухолевым антибактериальным действием в составе магниевой соли.

**Ключевые слова:** цитрат магния, фармакологическое действие, хемоинформатика, биоинформатика, интеллектуальный анализ данных.

#### Введение

Ионы магния жизненно необходимы для функционирования нервной, сердечнососудистой, мочевыделительной и других систем организма. Для компенсации повсеместно распространенной пищевой недостаточности магния используются различные неорганические и органические соединения магния, которые характеризуются значительными различиями в фармакокинетике и в фармакодинамике.

Перспективно использование препаратов на основе органических солей магния, которые характеризуются более высокой биоусвояемостью по сравнению с неорганическими солями [1]. Каждый препарат на основе той или иной органической соли магния характеризуется рядом особенностей в клиническом применении.

Использование цитрата магния в медицине ассоциировано с уролитическим эффектом. Практически, используют свежеприготовленный водный раствор цитрата магния (т.к. водная среда необходима не только для торможения кристаллообразования в мочевыделительной системе, но и для устранения разогрева цитрата магния при растворении сухой соли в воде [2]). В урологии, как правило, не используются сухие фармацевтические формы цитрата магния или цитрата калия (таблетки, порошки, капсулы) именно потому, что в желудке и кишечнике происходит реакция с выделение тепла. Поэтому, используются порошки цитратов магния/калия, из которых приготавливается раствор для питья непосредственно перед употреблением пациентом.

Оценить весь спектр возможных эффектов той или иной соли магния, в т.ч. цитрата магния, невозможно без учета метаболомных данных. Как известно, метаболомом называется совокупность всех низкомолекулярных веществ (т.е. веществ с низкими молекулярными массами — не более 1000 дальтон), найденных в клетках и тканях организма. Установление схожести молекулярной структуры действующего начала препарата с элементами метаболома принципиально важно для установления всех эффектов воздействия препарата на организм [3].

В настоящей работе, проводится анализ фармакологических «возможностей» химической структуры цитрат магния на основе *хемоинформационного подхода* - т.е. сравнения химической структуры молекулы цитрата (молекулярной структуры с недостаточно изученными молекулярно-фармакологическими свойствами) с десятками тысяч других молекул (для которых молекулярно-фармакологические свойства известны). Данное сравнение проведено с использованием современных методов анализа данных, которые разрабатываются в научной школе акад. РАН Ю.И. Журавлёва [4-7].

#### Материалы и методы

Хемоинформатика — область исследований на стыке структурной химии, фармакологии и биоинформатики, в которой взаимосвязи типа «химическая структура» - «свойство вещества» исследуются методами современной информатики. В настоящей работе, для проведения хемоинформационного анализа был разработан новый математический метод, основанный на комбинаторной теории разрешимости [4-6]. С практической точки зрения, имеющиеся в публичном доступе системы для поиска структур, схожих с заданной молекулой (PubChem, ChemSpider и др.) не позволяют получить практически интересные результаты.

Комбинаторная теория разрешимости, представляющая собой развитие алгебраического подхода к задачам распознавания, является современным инструментом для исследования признаковых описаний объектов. В случае задачи установления молекул, химическая структура которых схожих с заданной, объектами исследования являются хемографы. Хемограф (у-граф) – особая разновидность графа математического объекта, являющегося как совокупности множества вершин и множества ребер - связей между вершинами). Хемографом называется конечный, связный, неориентированный, размеченный граф без петель, с кликовым числом не превышающим 3.

В рамках комбинаторной теории разрешимости, χ-графы рассматриваются как объекты, а их инварианты (или кортежи инвариантов) - как признаковые описания объектов. В применении к хемографам, практически важны теорема о полноте кортежей инвариантов произвольного хемографа и теорема соответствия критерия полноты инварианта критерию разрешимости/регулярности, основной результат которых можно записать в следующей форме:

$$(1) \qquad \bigvee_{a,b \in \Pr} iso(a) \neq iso(b) \Rightarrow \underset{i=1,|\chi|}{\exists} i : \hat{\iota}[i]\chi(a) \neq \hat{\iota}[i]\chi(b) \,, \, \text{где}$$

Рг - множество прецедентов графов (полученный из заданного набора молекулярных структур), iso(G) - метка, указывающая на принадлежность графа G к некоторому классу изоморфных графов (очевидна из описаний молекулы в базе данных химических структур),  $\chi$  - множество элементарных  $\chi$ -инвариантов (фрагментов химической структуры),  $i\chi$  - кортеж-инвариант (список фрагментов структур, применимый к структуре любой молекулы). Если условие (1) выполнено для заданного множества  $\chi$ , то  $\chi$  обеспечивает разрешимость задачи над  $\Gamma$  и позволяет систематически исследовать все фрагменты углеродных скелетов органических молекул. Если множество  $\Gamma$ 0 грегулярно, т.е. не содержит двух идентичных хемографов (молекул), то множество  $\Gamma$ 1 устанавливается на основе стандартного подхода к вычислению характеристической функции множества информативных значений признаков  $\Gamma$ 1 [6] для множества  $\Gamma$ 3, так что  $\Gamma$ 4,  $\Gamma$ 5 определяется на основе выбора элемента кортеж-инварианта (т.е. типа фрагмента углеродного скелета) с наибольшим рангом информативности  $\Gamma$ 3.

фрагмента углеродного скелета) с наиоольшим рангом информативности 
$$\alpha$$
:

(2) 
$$T(\alpha) = \begin{cases} 1 & ecnu = \frac{1}{a,b \in Pr} : (\hat{\imath}[\alpha]\chi(a) \neq \hat{\imath}[\alpha]\chi(b)) \land (\forall k < \alpha \Rightarrow \hat{\imath}[k]\chi(a) = \hat{\imath}[k]\chi(b)) \\ 0 & s & npomuвном случае \end{cases}$$

Данная процедура позволяет найти такой кортеж-инвариант, который бы позволял отличать каждый хемограф (молекулу) в Pr от всех остальных. Тестирование (1, 2) проводилось на случайных выборках 50000 попарно различных структур молекул из базы данных PubChem [8] с использованием бинарных кортеж-инвариантов над множеством х-цепей (цепных фрагментов химической структуры) длины п (n=1..7). В результате вычислений было установлено, что при n=7 аккуратность различения одной молекулы от другой составила 99.4% и даже при более коротких длинах  $\chi$ -цепей (n=4,5) достигались довольны высокие показатели аккуратности (93..97%).

С использованием полученного множества  $\chi$  и *метрики Хэмминга*, функция расстояния между хемографами  $d_{\chi}$  над бинарными  $\chi$ -инвариантами определяется следующим образом:

(3) 
$$d_{\chi}(X_1, X_2) = \frac{1}{|\chi|} \sum_{i=1}^{|\chi|} \hat{\iota}[i] \hat{\boldsymbol{\beta}}[X_1] \chi \oplus \hat{\iota}[i] \hat{\boldsymbol{\beta}}[X_2] \chi.$$

Данное выражение, отражающее *«химическое расстояние»* между двумя произвольными молекулами, и было использовано для решения задачи поиска молекул, структурно схожих с цитрат-анионом.

Таким образом, на первом этапе хемоинформационного анализа с использованием расстояния dx устанавливается список наиболее близких к цитрат-аниону химических структур. На втором этапе, для каждой молекулы из этого списка из баз данных извлекаются все имеющиеся данные экспериментального измерения различных биологических свойств этой молекулы. Для каждого из свойств, для которого необходимо рассчитать значения соответствующей константы (константа связывания, константа ингибирования и др.) выбираются все схожие молекулы для которых это свойство было измерено и строится эмпирическая функция распределения значений константы.

Представленные далее в Таблицах оценки значений различных констант были получены как математическое ожидание и дисперсия соответствующей эмпирической функции распределения, которая использовалась после соответствующей фильтрации посредством і-спектров с образованием непрерывной повсюду дифференцируемой функции и анализа модальности (т.е. числа пиков).

### Результаты

Цитрат-анион является частью метаболома (эндогенной молекулой организма), которая формируется и используется в цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса). Уровень экскреции цитрата с мочой используется в дифференциальной диагностике уролитиаза, заболеваний почек и костей [9].

С использованием описанного выше метода хемоинформационного анализа были проведены сравнения химической структуры молекулы цитрат-аниона (далее просто «цитрат») с молекулами в базе данных метаболома человека и с молекулами в базах данных лекарственных средств. В качестве модели метаболома человека использовались более 40000 соединений, приведенных в базе данных HMDB (Human Metabolome Database, т.е. база данных метаболома человека) [10]. Данные соединения включают большинство соединений, измеряемых в плазме крови человека и, также, ряд лекарственных средств и их метаболитов.

В соответствии с описанными в разделе Материалы и методы способом оценки схожести молекул, были рассчитаны расстояния  $d\chi$  от структуры цитрата до структур всех известных молекул в метаболоме человека. Среди 40000 молекул метаболома, 445 молекул находились на расстоянии  $d\chi$ <0.7 от цитрата ( $d\chi$ =0.8 – максимально допустимое значение расстояния для анализа схожести). Гистограмма полученных расстояний  $d\chi$  показывает (Puc. 1), что 90% из 445 молекул находились на достаточно большом «расстоянии» от цитрата ( $d\chi$ >0.5) и менее 50 молекул находились на сколько-нибудь значимом для анализа сходства молекул расстоянии ( $d\chi$ <0.5).

500 450 число схожих соединений 400 350 300 **250** 200 150 100 50 0,00 0,10 0,20 0,30 0,40 0,50 0,60 0,70 0,80 0,901,00 Химическое расстояние (dx)

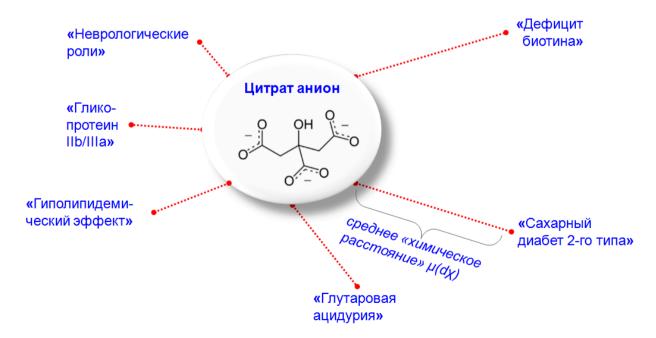
Рис. 1. Гистограмма чисел молекул на определенном расстоянии от молекулы цитрата.

Каждая из 445 молекул, наиболее близких к цитрату по своей химической структуре, была проанализирована с точки зрения ее биологических функций. Для этого, из баз данных HMDB и PubChem были извлечены ссылки на оригинальные исследовательские работы, описывающие свойства молекул. Затем, был проведен частотный анализ ключевых слов в этих текстовых описаниях молекул и установлены наиболее характерные термины, ассоциированные с фармакологическими свойствами молекул (Табл. 1, Рис. 2).

Таблица 1. Анализ частоты встречаемости ключевых слов в текстовых описаниях молекул, структурно, схожих с цитрат-анионом.  $v_1$  — частота встречаемости ключевого слова в описаниях исследуемой выборке молекул;  $v_2$  - частота встречаемости ключевого слова в описаниях случайно выборки молекул; О.Р. — отношение рисков (насколько чаще данное слово встречается в исследуемых описаниях). Приведена статистическая значимость ассоциаций ключевых слов с исследуемой выборкой молекул по сравнению со случайной выборкой молекул (по тесту  $\gamma$ 2).

Ключевое слово	<i>v</i> <sub>1</sub>	<i>v</i> <sub>2</sub>	O.P.	P(χ2)
Неврологические роли	3.24%	0.13%	7.48	0.008
Гликопротеин IIb/IIIa	7.14%	0.05%	5.77	0.012
Глутаровая ацидурия	5.95%	0.05%	5.21	0.015
Гиполипидемический эффект	5.02%	0.04%	5.12	0.016
Сахарный диабет 2-го типа	1.44%	0.03%	3.48	0.054
Дефицит биотина	5.95%	0.07%	2.21	0.062

Рис. 2. Ключевые слова в текстовых описаниях молекул, структурно схожих с цитратом. Длина ребер на диаграмме отражает среднее «химическое расстояние»  $\mu(d\chi)$  между молекулами, описываемыми соответствующей группой терминов и цитрат-анионом.



Анализ ключевых слов указывает на *неврологические*, антикоагулянтные (гликопротеин IIb/IIIa) и метаболические (гиполипидемический эффект, глутаровая ацидурия, сахарный диабет 2-го типа) эффекты цитрат-аниона. В частности, гликопротеин IIb/IIIa (интегрин 2b3a) - рецептор фибриногена на тромбоцитах, участвует в активации тромбоцитов. Активация тромбоцитов АДФ приводит к конформационным изменениям в

структуре гликопротеина, что вызывает связывание с фибриногеном. Ингибирование гликопротеина такими средствами как абциксимаб, эптифибатид, тирофибан и т.п. тормозит коагуляцию; цитрат-анион также может способствовать ингибированию этой молекулы-рецептора

Анализ текстовых описаний схожих с цитрат-анионом молекул позволил выделить несколько десятков соединений, характеризующихся известной фармакологической активностью и известными физиологическими ролями (Табл. 2). В Таблице 2, более низкие значения расстояния dx соответствуют большей структурной схожести между молекулой цитрата и соответствующей молекулой. Наиболее интересные результаты анализа сходства цитрата с фармакологически активными веществами представлены ниже.

Таблица 2. Соединения, структурно схожие с цитрат-анионом и характеризующиеся известной фармакологической активностью. Соединения упорядочены в соответствии со значением  $d\chi$ , «химического расстояния» от молекулы цитрата (см. Методы). Более низкие значения  $d\chi$  соответствуют бо́льшей структурной близости молекулы вещества к цитрат-аниону.

Молекула	dχ	Физиологические роли, фармакологическое действие
Лимонная к-та	0.00	Формируется и используется в цикле Кребса
Цитрамаловая к-та	0.07	Ингибирует синтез оксалатов
2-метил-лимонная к-та	0.18	Стимулирует развитие сосудистых нарушений
Гидроксилимонная к-та	0.18	Тормозит развитие ожирения
Гомолимонная к-та	0.22	Лечение мочекаменной болезни
Яблочная к-та	0.29	Снижает ингибирование гликолиза при гипоксии
Триэтилцитрат	0.33	Ингибитор липазы, антибактериальная активность, тормозит развитие акне
		Противовоспалительное действие, снижение толерантности к
Винная к-та	0.33	глюкозе
Гидроксиметилглутарат	0.36	Снижает гиперхолестеринемию
Деоксиэритроновая к-та	0.38	Повышена при сахарном диабете 1-го типа
3-гидроксивалерат	0.43	Повышен при ацидурии и дефиците биотинидазы
Метилянтарная к-та	0.43	Повышена при этилянтарной энцефалопатии, болезни Рефсума
•		Модулирует активность глюкозо-чувствительных нейронов
3-оксимасляная к-та	0.43	гипоталамуса как эндогенный "фактор сытости"
Эритроновая к-та	0.44	Компонент внутриглазной жидкости, метаболизм аскорбата
Гидроксиоксопентанат	0.47	Противовоспалительный эффект
Дигидроксивалерат	0.47	Гиполипидемический эффект
Эритрониловая к-та	0.50	бета-окисление жирных кислот
		Гидроксиглутаровая ацидурия - нейродегенерация с
Гидроксиглутаровая к-та	0.50	экстрапирамидными и мозжечковыми проявлениями
Галактаровая к-та	0.52	Антикоагулянтные свойства
Галактуроновая к-та	0.52	Антикоагулянтные свойства
Арабиноновая к-та	0.52	Метаболизм аскорбата
Гидроксиметилбутират	0.53	Фенилкетонурия, пропионовая ацидемия
		Повышена при первичной гипероксалурии 2-го типа,
Глицериновая к-та	0.53	неврологические нарушения, гипотония, судороги
Глюконовая к-та	0.55	Хелатирует кальций, магний, медь, цинк
Глутаровая к-та	0.57	Глутаровая тип ацидурия 1, задержка развития мозга
Мевалоновая к-та	0.58	Продукт HMG-CoA-редуктазы (ингибируется статинами)

Возможные **нейротропные** эффекты цитрат-аниона обусловлены сходством с рядом метаболитов, уровни которых повышены при врожденных нейрометаболических расстройствах. Например, уровень метил-янтарной кислоты ( $d\chi$ =0.43) повышен при

этилянтарной энцефалопатии (OMIM 602473) сопровождающейся нейромоторного развития [11, 12]. Повышенные уровни гидроксиглутаровой кислоты (dy=0.50) ассоциированы с гидроксиглутаровой ацидурией – врожденной формой прогрессирующей нейродегенерации с экстрапирамидной, мозжечковой симптоматикой, судорогами, на фоне губчатого поражения белого вещества мозга [13]. Повышенные уровни глицериновой кислоты (dχ=0.53) ассоциированы с гипероксалурией 2-го типа и с D-глицериновой ацидурией, симптомы которой включают проградиентную неврологическую симптоматику, гипотонию, судороги и метаболический ацидоз [14]. Цитрат-анион будет вытеснять перечисленные выше молекулы из соответствующих белков-рецепторов и, тем самым, будет тормозить развитие неврологических проявлений.

Помимо упомянутого выше ингибирования гликопротеина IIb/IIIa, антикоагулянтные свойства цитрат-аниона могут быть связаны со сходством с галактаровой кислотой ( $d\chi$ =0.52) и с галактуроновой кислотой ( $d\chi$ =0.52), которые проявляют антикоагулянтные свойства. В частности, галактуроновая кислота является основным компонентом пектина [15], входит в состав гликозаминогликанов гепарина и гепарансульфата [16], которые также проявляют антикоагулянтные свойства.

Анализ сходств с молекулами метаболома указывает на **гиполипидемический** эффект цитрат-аниона. В частности, *гидроксилимонная кислота* ( $d\chi$ =0.18) тормозит развитие ожирения [17] и была найдена в составе растений, экстракты которых используются для изготовления препаратов для снижения избыточного веса (гарцинии камбоджийской, гибискусе субдариффа). *Триэтилиштрат* ( $d\chi$ =0.33) - ингибитор липазы (гидролиз жиров), свободные жирные кислоты могут вызвать воспаление. Кроме того, по данным патентов данное вещество проявляет антибактериальную активность [18] и тормозит развитие акне [19]. Эритрониловая кислота ( $d\chi$ =0.50) участвует в бета-окислении жирных кислот [20].

Особо следует подчеркнуть сходство цитрат-аниона с молекулами, вовлеченными в метаболическую активность фермента гидроксиметилглутарат кофермент-А-редуктазы (НМG-СоА-редуктазы) — таргетного белка для статиновых препаратов. В частности, известно, что 3-гидроксиметилглутаровая кислота (dx=0.36) снижает гиперхолестеринемию US3629449A [21]. Молекула 2,3-дигидроксивалерьяновой кислоты (dx=0.47) является гиполипидемическим средством. Интересно отметить, что у всех статинов в кислотной форме существуют гидрофобные участки, идентичные по структуре 2,3-дигидроксивалерьяновой кислоте. Мевалоновая кислота (dx=0.58) является продуктом ферментативной активности НМG-СоА-редуктазы, осуществляющей лимитирующую стадию биосинтеза холестерина [22]. Сходство цитрат-аниона со всеми этими молекулами подтверждает наличие у цитрат-аниона гиполипидемического эффекта, установленного в ходе клинических исследований [23, 24].

На **гипогликемический эффект цитрата** указывает его структурное сходство с винной кислотой ( $d\chi$ =0.33) и с 3-оксимаслянной кислотой ( $d\chi$ =0.43). Винная кислота проявляет противовоспалительное действие и снижает толерантность к глюкозе. 3-оксимасляная кислота является продуктом распада аминокислоты валина и может быть использован в качестве источника энергии мозгом при низком уровне глюкозы в крови [25, 26]. 3-оксимасляная кислота модулирует активность нейронов-сенсоров глюкозы в гипоталамусе и является эндогенным "фактором сытости". Также, уровни этого соединения повышены у гериатрических пациентов в состоянии ремиссии, достигаемой при лечении депрессии [27].

Наконец, следует отметить сходство с молекулами, обладающими *«металло-лигандными свойствами»*. В частности, глюконовая кислота ( $d\chi$ =0.55) хелатирует ионы магния, кальция, железа, меди и цинка [28]. Арабиноновая кислота ( $d\chi$ =0.52) и эритроновая кислота ( $d\chi$ =0.44) участвуют в метаболизме аскорбиновой кислоты и стимулируют всасывание этих элементов в ЖКТ.

## Количественные оценки биологической активности цитрат-аниона на основании результатов хемоинформационного анализа

В ходе дальнейшего анализа было проведено сравнение химической структуры цитрат-аниона с базой данных всех известных малых молекул PUBCHEM. База данных PUBCHEM содержит структуры около 100 млн. молекул и, что крайне важно, для многих из этих молекул приведены результаты измерений различных биологических активностей этих молекул (сродство к тем или иным рецепторам, ферментативная активность и др.). Эта выборка данных использовалась для расчета представленных ниже количественных оценок биологической активности.

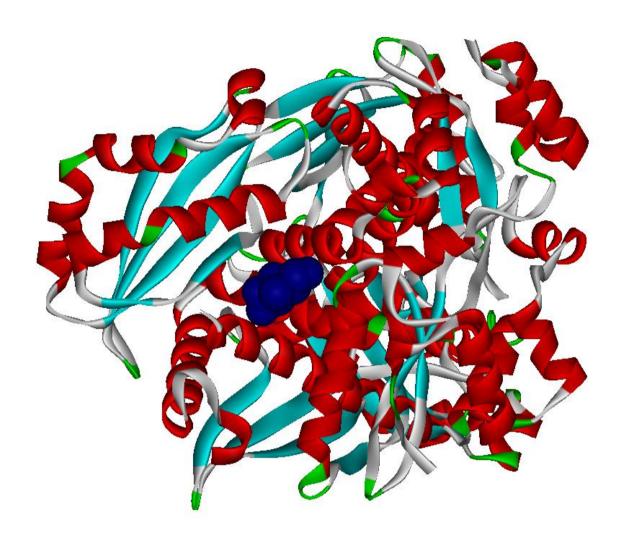
Полученные количественные оценки биологических свойств подтверждают, что цитрат-анион характеризуется упоминаемыми ранее антигиперлипидемическим и гипогликемическим эффектами. Кроме того, возможно проявление седативных, противоопухолевых и антибактериальных свойств (Таблицы 3-7).

В соответствии с полученными оценками, снижение гиперлипидемии под воздействием цитрат аниона может наблюдаться в диапазоне концентраций от 5 мкмоль/л до 1 ммоль/л (Табл. 3). При этом, возможно снижение активности фермента HMG-CoA-редуктазы почти в 2 раза при концентрации цитрата в 1 ммоль/л (Табл. 3, Рис. 3). Гипогликемическое действие цитрата может проявляться при концентрациях 2600±993 нМ за счет ингибирования фосфатазы 1 (PP1).

Таблица 3. Количественная оценка свойств цитрат-аниона в снижении гиперлипидемии и глюкозотолерантности. n - число схожих молекул, использованных для расчета константы; M - среднее значение оценки константы; m - стандартное отклонение значения константы. Значения констант менее 10000 нМ означают значимую биологическую активность.

		-	Ед.	
N	M	m	изм.	Биологическая активность
6	2458	2882	нМ	Модулирование уровней липидов
14	57	39	%	Ингибирование HMG-CoA-редуктазы (концентрация 1 ммоль/л)
3	4659	1539	нМ	IC50 ингибирования белка PLIN5-активатора липазы
4	26.17	20.45	%	Гипогликемическое действие (% изменения глюкозы плазмы)
				IC50 ингибирования фосфатазы 1 (PP1), регулирующей метаболизм
3	2600	993	нМ	гликогена и уровни глюкозы в крови.
7	7906	9415	нМ	Антагонист провоспалительного сигнального пути NFkB

Рис. 3. Пространственная структура 3-гидрокси-3-метил (ГМГ) коэнзим А-редуктазы (модель на основе PDB файла 4I6Y). Показано расположение цитрат-аниона в активном центре фермента (сферическая модель, синий цвет).

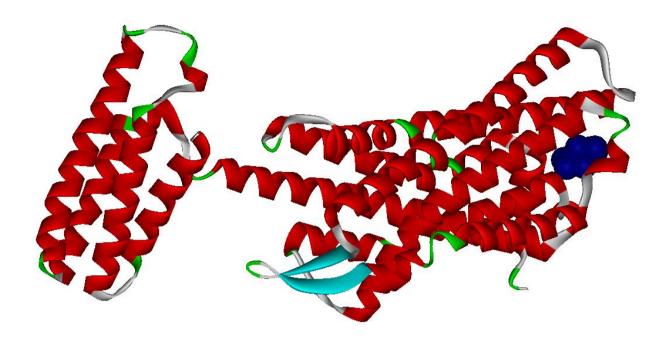


Седативные эффекты цитрат-аниона могут осуществляться в диапазоне концентраций 600...5000 нМ (таблица 4). Данные эффекты могут осуществляться за счет антагонизма рецептора нейропептида S, активация которого повышает дофаминергическую активность в мезолимбической системе, повышает тревожное поведение, вызывает гиперактивность и, также, повышает чувствительность к аллергенам при бронхиальной астме [29]. Анальгетический и седативный эффекты цитрат аниона могут также осуществляться за счет модуляции активности дельта-опиоидного рецептора, в структуре которого цитрат-анион может взаимодействовать с ионным каналом рецептора (Рис. 4).

Таблица 4. Количественная оценка седативных свойств цитрат-аниона.

			Конс-	Ед.	
N	M	m	танта	изм.	Биологическая активность
					Оценка седативных свойств с помощью индуцированных
11	623	531	ED50	нМ	подкожным введением уксусной кислоты судорог
					Оценка аналгезии посредством проведения болевого теста
					у крыс (по оценке амплитуды и частоты дергания
4	43.16	32.56	ED50	$M\Gamma/K\Gamma$	хвостом)
3	4677	4092	-	нМ	Антагонист рецептора нейропептида S

Рис. 4. Пространственная структура дельта-опиоидного рецептора (модель на основе PDB 4N6H). Показано предположительное расположение цитрат-аниона в ионном канале рецептора (сферическая модель, синий цвет).



Количественные оценки указали на потенциальное воздействие цитрат-аниона на процессы **кроветворения**. На эти эффекты указывает, прежде всего, возможность активации сигнального пути тромбопоэтина и, также, физиологическую реакцию организма на гипоксию (в частности, за счет активации рецептора тиреотропного гормона). Перечисленные эффекты могут осуществляться в диапазоне концентраций 3800...8800 нМ (Табл. 5). Как было отмечено выше, значения менее 10000 нМ означают значимую биологическую активность.

Таблица 5. Количественная оценка эффектов воздействия цитрат-аниона на кроветворение.

N	M	m	Ед. изм.	Биологическая активность
				Активация сигнального пути "Элемент реагирования на
10	5206	5708	нМ	гипоксию"
6	8892	3598	нМ	Активатор сигнального пути тромбопоэтина
7	6469	5570	нМ	Агонист рецептора тиреотропного гормона
				Агонист рецептора тиреотропного гормона: повышение
6	3852	3305	нМ	внутриклеточного цАМФ

Количественные оценки показывают, что противоопухолевые эффекты цитратаниона могут проявляться при концентрациях 800...9200 нМ (Табл. 6). В то же время, воздействие цитрат-аниона на соответствующие молекулярные механизмы может осуществляться и при более низких концентрациях — 120...2310 нМ. Цитрат, потенциально, будет ингибировать рост клеток и снижать объем опухолей рака яичка, толстого кишечника, а также снижать интенсивность абнормального деления промиелоцитов при лейкозе. Противоопухолевые эффекты ассоциированы с блокировкой взаимодействия белков СВГ-бета и runX1 и ингибированием сигнальных ферментов протеинфосфатаз РР5 и РР2А (Табл. 6).

Таблица 6. Количественная оценка противоопухолевых свойств цитрат-аниона.

			Конс-	Ед.	
n	M	m	танта	изм.	Биологическая активность
4	810	401	IC50	нМ	Ингибирование роста линии клеток рака яичка

					Отношение объема опухоли в опытной группе к
4	29	21	T/C	%	объему в контрольной группе (день 60, 100 мг/кг)
					Отношение объема опухоли в опытной группе к
4	51	6	T/C	%	объему опухоли в контроле (день 60, 50 мг/кг)
4	9165	3809	IC50	нМ	Цитотоксичность против линии клеток рака легких
4	6725	3381	IC50	нМ	Ингибирование роста линии клеток лейкемии
					Блокировка взаимодействия белков CBF-бета и runX1
4	2310	3260	-	нМ	при лечении острого миелоидного лейкоза
					Ингибирование протеинфосфатазы 5 (РР5), что
					подавляет выживание и рост клеток колоректального
3	1956	1230	IC50	нМ	рака
					Ингибирование фосфатазы 2А1 (РР2А1),
					локализованной на микротрубочках, концентрация
3	59	42	-	%	0.1 ммоль/л
					Концентрации экзогенной ингибирование
3	123	62	IC50	нМ	серин/треонин фосфатазы белка 2А (РР2А)
3	230	128	IC50	нМ	Ингибирование фосфатазы PP2A in vitro

Количественная оценка антибактериальных эффектов цитрат аниона указала, прежде всего, на потенциальную противомалярийную активность цитрат-аниона (Табл. 7). В диапазоне концентраций 5300...8200 нМ цитрат анион может ингибировать рост различных штаммов малярийного плазмодия (3D7, 7G8, D10, W2, 7G8). Ингибирование заражения эритроцитов малярийным плазмодием может осуществляться при более низких концентрациях 858±232 нМ.

Таблица 7. Количественная оценка антибактериального действия цитрат-аниона.

	·		Конс-	Ед.	
n	M	m	танта	изм.	Биологическая активность
					Снижение скорости роста малярийного плазмодия
					штамма DD2 в эритроцитах (концентрация - 2
64	61	22	-	%	мкмоль/л).
					Ингибирование заражения эритроцитов малярийным
65	858	232	IC50	нМ	плазмодием
5	6346	4171	IC50	нМ	Антиплазмодийная активность, штамм 3D7
5	5705	1529	IC50	нМ	Антиплазмодийная активность, штамм 7G8
7	7373	4238	IC50	нМ	Антиплазмодийная активность, штамм D10
8	5373	4607	IC50	нМ	Антиплазмодийная активность, штамм W2
7	8172	4495	-	нМ	Антиплазмодийная активность, штамм 7G8
					Ингибирование фруктоза бисфосфат альдолазы
4	9377	8525	-	нМ	лямблий
3	3854	2502	-	нМ	Ингибирование белка NS1 вируса гриппа

Анализ сходств с молекулами различных бактериальных метаболомов (структуры которых представлены в базе данных PUBCHEM) показал, что эффекты цитрата могут быть обусловлены взаимодействием с белками, специфичными для микроорганизмов. Такие белки (ферменты) не представлены в протеоме человека, поэтому ингибирование этих белков цитрат-анионом будет проявлять противомикробные свойства, без оказания побочных эффектов на активность белков протеома человека (Рис. 5 – Рис. 8).

Рис. 5. Пространственная структура 3-изопропилмалатдегидрогеназы, специфичной для лейцина биосинтеза у микроорганизмов (PDB 3VMK).

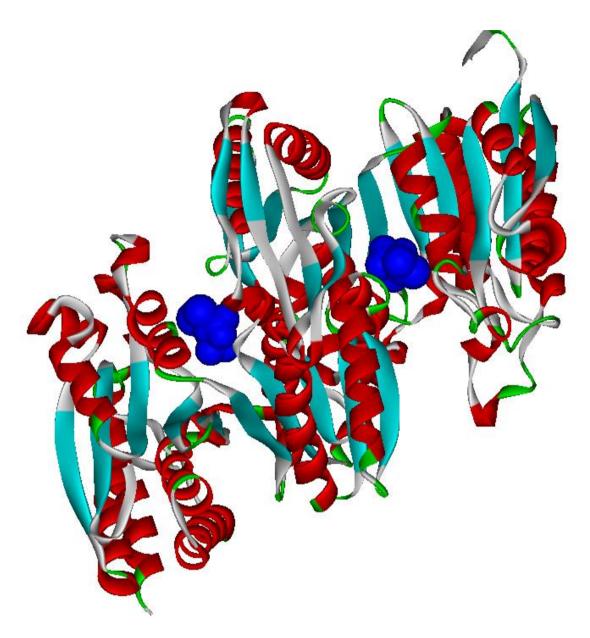


Рис. 6. Пространственная структура альфа-глюкуронидаза, специфичная для микроорганизмов (в частности, Aspergillus Niger). Показано предположительное расположение цитрат-анионов в активном центре и в аллостерическом сайте фермента (сферическая модель, синий цвет). Модель на основе PDB 4C91.

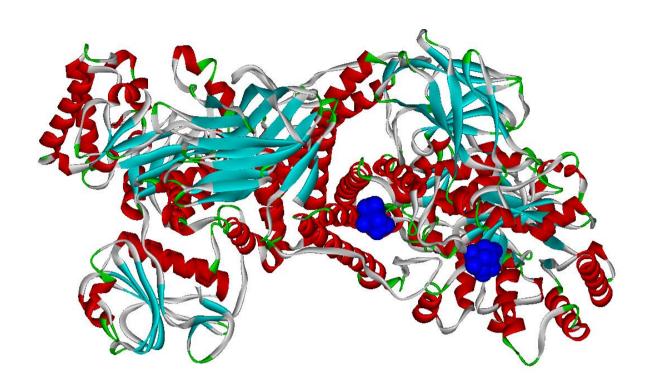


Рис. 7. Пространственная структура глюкарат-дегидратазы, специфичной для микроорганизмов (синегнойная палочка). Показано предположительное расположение цитрат-анионов в активном центре (сферическая модель, синий цвет). Модель на основе PDB 1JCT.

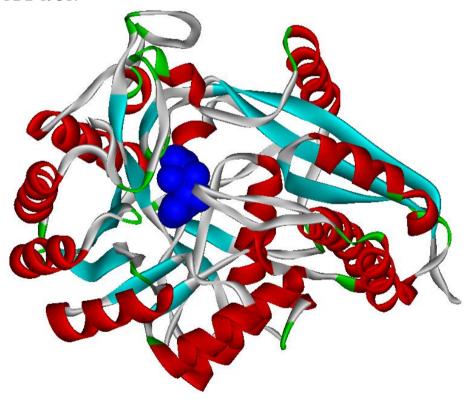
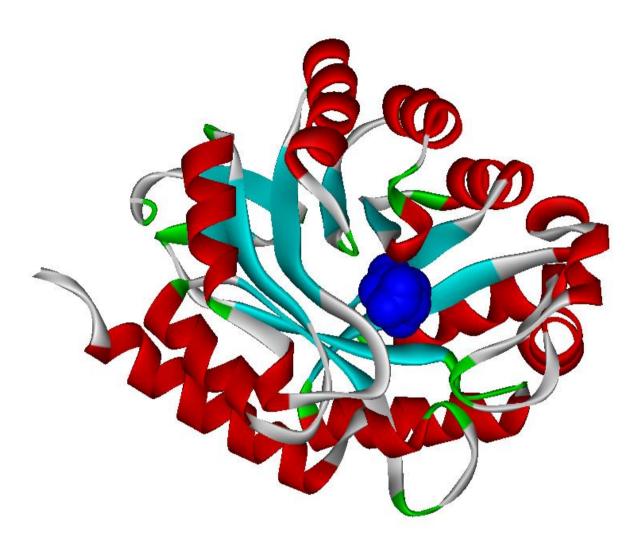


Рис. 8. Пространственная структура синтаза N-ацетилнейраминовой кислоты (Neiserria meningitis). Показано предположительное расположение цитрат-анионов в активном центре (сферическая модель, синий цвет). Модель на основе PDB 4IPI.



#### Заключение

Для компенсации дефицита магния перспективно использовать «органические» соли магния и, прежде всего, цитрат магния. В результате впервые проведенного хемоинформационного анализа установлены принципиально важные потенциальные эффекты цитрат-аниона: (1) противоопухолевое действие (опухоли яичка, толстого кишечника, лейкоз), (2) противопаразитарная активность (штаммов 3D7, 7G8, D10, W2, 7G8 малярийного плазмодия, лямблии), (3) противоинфекционная и противовирусная активность (подавление активности вируса гриппа, синегнойной палочки, торможение развития акне), (5) липидемическая активность (статиноподобное действие но без побочных эффектов, ингибирование бета-окисления свободных жирных кислот, торможение развития ожирения), (6) повышение чувствительности клеток к глюкозе, (7) антикоагулянтные свойства (ингибирование гликопротеина IIb/IIIa, гликозаминогликанов гепарина и гепарансульфата). Данный комплекс свойств цитратаниона в составе цитрата магния существенно расширяет круг терапевтической применимости препаратов на основе цитрата магния.

Следует учитывать практические аспекты применения препаратов на основе цитрата магния. *Цитраты - одни из наиболее высокоусвояемых солей магния, кальция и других эссенциальных биоэлементов*. В организме цитрат-анион практически полностью превращается в углекислый газ и воду; практически полная утилизация цитрата делает его «экологически чистой тарой» для транспорта магния внутрь клеток. Растворы цитрата магния применяются в терапии и профилактике образования почечных камней, для компенсации гипомагнеземии.

Практическое применение даже такой весьма «передовой» формы магния как цитрат магния имеют определенные особенности. Прежде всего, следует принимать во

внимание, что реакции образования кристаллогидратов из безводных солей (и, в частности, безводного цитрата магния) являются, как правило, экзотермическими, то есть происходят с выделением тепла. Экзотермический эффект при растворении в воде цитрата магния связан с тем, что при разрушении кристаллической решетки под воздействием молекул воды электростатическая энергия стабилизация решетки рассеивается и переходит в тепловую энергию [2].

Очевидно, что «разогрев» таблетки, спрессованной из безводного цитрата магния, может приводить к нежелательным органолептическим последствиям. Вопервых, ощущение «разогрева таблетки» во рту, при попадании слюны на безводный цитрат магния - это довольно неприятное ощущение. Во-вторых, попадание таблетки из безводного цитрата магния внутрь ЖКТ может приводить к ожогам пищевода и желудка или, по крайней мере, к ощущению тошноты (которое связано вовсе не с самим цитратом магния, а именно с выделением тепла при растворении безводного цитрата магния). В-третьих, даже если запить таблетку из безводного цитрата магния значительным количеством воды, это существенно не снизит тепловыделение которое будет происходить именнов организме пациента.

Учитывая экзотермический эффект формирования кристаллогидратов и образования водного раствора цитрата магния, растворение безводного цитрата не должно происходить внутри организма. Для этого идеально подходят такие формы цитрата магния, которые приготовляется непосредственно перед употреблением, в форме раствора для питья. Для этого вполне подходят саше для приготовления питьевого раствора цитрата магния («Магний диаспорал 300», 1830 мг магния цитрата, 295.7 мг элементного магния). Очевидно, что в данном случае реакция образования раствора цитрата магния происходит вне организма и пациент употребляет уже готовый раствор цитрата магния, без «отягощений», связанных с выделением тепла.

## Литература

- 1. Torshin I. Y., Gromova O. Magnesium and pyridoxine: fundamental studies and clinical practice. Nova Science Publishers, 2009.
- 2. Азиева Л.М., Архангельская О.В., Батаева Е.В., Гришина Т.М., Гузей Л.С., Жмурко Г.П., Загорский В.В., Кузнецов В.Н., Лебедева О.К., Серопегин Ю. Д., Татаркина А.Л., Штепа В.И. Практическое пособие по общей неорганической химии (под редакцией д.х.н., профессора С.Ф. Дунаева). Химический факультет МГУ, Москва, 2002.
- 3. Torshin I.Yu. Bioinformatics in the post-genomic era: physiology and medicine. Nova Biomedical Books, NY, USA (2007), ISBN 1-60021-752-4.
- 4. Журавлёв Ю.И., Рудаков К.В., Торшин И.Ю. Алгебраические критерии локальной разрешимости и регулярности как инструмент исследования морфологии аминокислотных последовательностей. Труды МФТИ. − 2011 − Т.3. № 4, с.67-76.
- 5. I. Yu. Torshin, K. V. Rudakov. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs: Part 2. Local completeness of invariants of chemographs in view of the combinatorial theory of solvability. Pattern Recognition and Image Analysis 06/2014; 24(2):196-208. DOI:10.1134/S1054661814020151
- 6. I. Yu. Torshin, K. V. Rudakov. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs. Part 1: Fundamentals of modern chemical bonding theory and the concept of the chemograph. Pattern Recognition and Image Analysis 03/2014; 24(1). DOI:10.1134/S1054661814010209
- 7. Торшин И.Ю., Громова О.А. Экспертный анализ данных в молекулярной фармакологии. М., Изд. МЦНМО, 2012, 768 с.
- 8. Bolton E, Wang Y, Thiessen PA, Bryant SH. PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. Chapter 12 IN Annual Reports in Computational Chemistry, Volume 4, American Chemical Society, Washington, DC, 2008 Apr. (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

- 9. Caudarella R, Vescini F, Buffa A, Stefoni S. Citrate and mineral metabolism: kidney stones and bone disease. Front Biosci. 2003;8:s1084-s1106.
- 10. Wishart DS, Tzur D, Knox C, Eisner R, Guo AC, Young N, Cheng D, Jewell K, Arndt D, Sawhney S, Fung C, Nikolai L, Lewis M, Coutouly MA, Forsythe I, Tang P, Shrivastava S, Jeroncic K, Stothard P, Amegbey G, Block D, Hau DD, Wagner J, Miniaci J, Clements M, Gebremedhin M, Guo N, Zhang Y, Duggan GE, Macinnis GD, Weljie AM, Dowlatabadi R, Bamforth F, Clive D, Greiner R, Li L, Marrie T, Sykes BD, Vogel HJ, Querengesser L. HMDB: the Human Metabolome Database. Nucleic Acids Res. 2007;35(Databas:D521-D526.
- 11. Nowaczyk MJ, Lehotay DC, Platt BA, Fisher L, Tan R, Phillips H, Clarke JT. Ethylmalonic and methylsuccinic aciduria in ethylmalonic encephalopathy arise from abnormal isoleucine metabolism. Metabolism. 1998;47(7):836-839.
- 12. Miller JD. Actions taken by the Federal Trade Commission involving dentistry. J Calif Dent Assoc. 1977;5(5):70-71.
- 13. Clarke NF, Andrews I, Carpenter K, Jakobs C, van der Knaap MS, Kirk EP. D-2-hydroxyglutaric aciduria: a case with an intermediate phenotype and prenatal diagnosis of two affected fetuses. Am J Med Genet A. 2003;120A(4):523-527.
- 14. Boulat O, Gradwohl M, Matos V, Guignard JP, Bachmann C. Organic acids in the second morning urine in a healthy Swiss paediatric population. Clin Chem Lab Med. 2003;41(12):1642-1658.
- 15. Wu AM, Song SC, Chen YY, Gilboa-Garber N. Defining the carbohydrate specificities of aplysia gonad lectin exhibiting a peculiar D-galacturonic acid affinity. J Biol Chem. 2000;275(19):14017-14024.
- 16. Mulloy B, Forster MJ. Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. Glycobiology. 2000;10(11):1147-1156.
- 17. Shara M, Ohia SE, Yasmin T, Zardetto-Smith A, Kincaid A, Bagchi M, Chatterjee A, Bagchi D, Stohs SJ. Dose- and time-dependent effects of a novel (-)-hydroxycitric acid extract on body weight, hepatic and testicular lipid peroxidation, DNA fragmentation and histopathological data over a period of 90 days. Mol Cell Biochem. 2003;254(1-2):339-346.
- 18. Европейский патент № WO2004019929, 2004.
- 19. Европейский патент № WO2008056391A2, 2008.
- 20. Heil M, Podebrad F, Prado E, Beck T, Mosand A, Sewell AC, Böhles H, Lehnert W. Enantioselective analysis of ketone bodies in patients with beta-ketothiolase deficiency, medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency and ketonemic vomiting. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2000 Mar 10;739(2):313-24.
- 21. Koling S, Kalhoff H, Schauerte P, Lehnert W, Diekmann L. [3-hydroxy-3-methylglutaraciduria (case report of a female Turkish sisters with 3-hydroxy-3- methylglutaryl-Coenzyme A lyase deficiency]. Klin Padiatr. 2000;212(3):113-116.
- 22. Jemal M, Schuster A, Whigan DB. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable Rapid Commun Mass Spectrom. 2003;17(15):1723-1734.
- 23. Geissler CA, Powers HJ (eds). Human Nutrition, 12th edition, 2010, Elsevier, UK
- 24. Dolle RE, McNair D, Hughes MJ, Kruse LI, Eggelston D, Saxty BA, Wells TN, Groot PH. ATP-citrate lyase as a target for hypolipidemic intervention. Sulfoximine and 3-hydroxy-beta-lactam containing analogues of citric acid as potential tight-binding inhibitors. J Med Chem. 1992 Dec 25;35(26):4875-84.
- 25. Pan JW, Telang FW, Lee JH, de Graaf RA, Rothman DL, Stein DT, Hetherington HP. Measurement of beta-hydroxybutyrate in acute hyperketonemia in human brain. J Neurochem. 2001;79(3):539-544.
- 26. Plecko B, Stoeckler-Ipsiroglu S, Schober E, Harrer G, Mlynarik V, Gruber S, Moser E, Moeslinger D, Silgoner H, Ipsiroglu O. Oral beta-hydroxybutyrate supplementation in two

- patients with hyperinsulinemic hypoglycemia: monitoring of beta-hydroxybutyrate levels in blood and cerebrospinal fluid, and in the brain by in vivo magnetic resonance spectroscopy. Pediatr Res. 2002;52(2):301-306.
- 27. Paige LA, Mitchell MW, Krishnan KR, Kaddurah-Daouk R, Steffens DC. A preliminary metabolomic analysis of older adults with and without depression. Int J Geriatr Psychiatry. 2007;22(5):418-423.
- 28. Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, Laxman B, Mehra R, Lonigro RJ, Li Y, Nyati MK, Ahsan A, Kalyana-Sundaram S, Han B, Cao X, Byun J, Omenn GS, Ghosh D, Pennathur S, Alexander DC, Berger A, Shuster JR, Wei JT, Varambally S, Beech er C, Chinnaiyan AM. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. Nature. 2009;457(7231):910-4 doi.
- 29. Okamura N, Reinscheid RK. Neuropeptide S: a novel modulator of stress and arousal. Stress. 2007;10(3):221-226.