

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛИЦИРРИЗИНОВАЯ КИСЛОТА: НОВЫЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ БЕЛКОВЫЕ МИШЕНИ

П.В. Еришов, Е.О. Яблоков, Л.А. Калужский, Ю.В. Мезенцев,
О.В. Гнеденко*, М.А. Константинов, И.Ю. Торопыгин, А.С. Иванов

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; *эл. почта: gnedenko.oksana@gmail.com

К настоящему времени накоплен большой объём данных о биологической активности малотоксичного природного гликозида — глицирризиновой кислоты (ГК), однако механизм действия данного соединения на молекулярном уровне до конца не изучен. Расширение знаний о спектре клеточных белковых мишеней ГК способствует пониманию новых особенностей фармакодинамики. Целью работы была экспериментальная идентификация тканеспецифического спектра белковых молекул, взаимодействующих с глицирризиновой кислотой в модельной системе. Образцы интактного лизата ткани печени крысы инкубировали с ковалентно иммобилизованной ГК на EAH-сефарозе 4В с последующей элюцией аффинно выделенных белковых молекул и их трипсинолизом. С помощью масс-спектрометрического анализа были идентифицированы 88 потенциальных белковых мишеней ГК. Дополнительно, по результатам гель-хроматографического разделения лизата ГК влияла на полуколичественное распределение белков Aldh6a1, Decr1 и Sod1 во фракциях. Молекулярный докинг в программе Flare™ использовали для моделирования комплексов ГК и белков, по результатам которого выбрали 5 белков (Acox2, Acr1c9, Maoa, Mat1a, Nalcn) образующих с ГК комплексы с наиболее благоприятными параметрами ΔG и Rank score. Больше половины (57%) аффинно выделенных белков участвуют в процессах базового клеточного метаболизма и биотрансформации эндогенных и экзогенных соединений. Систематизированы и сопоставлены данные об ассоциациях потенциальных белковых мишеней ГК с заболеваниями и разными типами биологической активности ГК.

Ключевые слова: глицирризиновая кислота; цитохром P450; белок, связывающий глицирризиновую кислоту; масс-спектрометрия; лизат ткани печени; аффинная очистка

DOI: 10.18097/PBMCR1595

ВВЕДЕНИЕ

Глицирризиновая кислота (ГК) — тритерпеновый гликозид природного происхождения с молекулярной массой 822,9 г/моль (glycyrrhizinic acid, PubChem CID14982), выделенный из корней солодки (*Glycyrrhiza glabra*). ГК обладает противоопухолевой [1], противовоспалительной, антивирусной, гепатопротекторной активностями [2] и относительно малотоксичен: вызывает умеренные и слабые побочные эффекты [3–5]. ГК включают в лекарственные препараты в качестве фармацевтической субстанции. Так, в России препарат Фосфоглив® использовали при лечении пациентов с жировой дегенерацией печени неалкогольной этиологии [6]. По данным EU Clinical Trials Register [7] другие препараты на основе ГК — SNMC® (EudraCT No. 2004-000773-60) и Glycyron® (EudraCT No. 2008-008512-51) были исследованы по их эффективности и безопасности в лечении пациентов с хроническим гепатитом С [8] и гингивитом (EudraCT No. 2008-008512-51), соответственно.

За последние годы в экспериментах *in vitro* и *in vivo* получены новые данные о спектре биологической активности ГК, в основе которой лежат прямые взаимодействия ГК с клеточными белками. Известно, что воздействие ГК на сигнальные пути

JAK2/STAT3 [9] и Hippo/YAP модулирует различные процессы на молекулярном уровне [10]. Zhang и соавт. установили, что ГК связывается с N-терминальным доменом синаптического белка альфа-синуклеина (SNCA), предотвращая его агрегацию и оказывая тем самым нейропротекторное действие [11]. По данным Wang и соавт., ГК взаимодействует с альдегидредуктазой 2 афлатоксина В1 (AKR7A2), проявляя антиоксидантную активность в звёздчатых клетках печени [12]. Ni и соавт. обобщили данные о существовании не менее чем десяти белковых мишеней ГК (CD274, CCR2, STAT3, ICAM1, TLR9, MAPK1, MPO, NOS2, PLAG2G1B и mTOR) [13]. Мы предполагаем, что спектр белковых мишеней ГК может быть гораздо шире, включая как отдельные белки, так и белковые комплексы, поскольку для ГК, как и для сходных с ней по структуре соединений, характерны множественные типы фармакологической активности [13].

Целью данной работы была экспериментальная идентификация тканеспецифического спектра белковых молекул, взаимодействующих с глицирризиновой кислотой в модельной системе.

Для достижения цели мы использовали аффинное выделение белков, образующих стабильные комплексы с иммобилизованной на инертном носителе ГК, из интактного общего лизата ткани печени крысы.



МЕТОДИКА

Материалы

В работе был использован водорастворимый препарат динатриевой соли глицирризиновой кислоты $C_{42}H_{60}Na_2O_{16}$ (“Mafco Worldwide Corporation”, США).

Для получения тканевых образцов были использованы крысы (*Rattus norvegicus*) самцы линии Wistar (n=3) возрастом 5 мес. Животные содержались при естественном освещении и имели свободный доступ к стандартному корму и воде. Вес животных на момент забоя составлял 200–240 г. После декапитации под эфирным наркозом образцы печени промывали 0,9% NaCl и замораживали в жидком азоте.

Получение интактного лизата ткани печени

Приблизительно равные по массе фрагменты ткани печени от каждой из трёх особей объединяли в смешанный образец в целях нивелирования индивидуальных особенностей. Фрагменты ткани измельчали в стеклянной ступке с пестиком в фосфатно-солевом буфере (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,4), содержащем коктейль ингибиторов протеаз (“GE Healthcare”, США). Далее, лизат дополнительно суспендировали при помощи роторного гомогенизатора Silent Crusher S (“Heidolph”, Германия).

Аффинное выделение белков из лизата ткани печени

Ковалентную иммобилизацию ГК за карбоксильные группы выполняли на предварительно активированной ЕАН-сефарозе 4В (“Cytiva”, США), содержащей на своей поверхности специальные линкеры, на концах которых находятся свободные аминокгруппы. Все процедуры выполняли согласно протоколу производителя. Подготовленную суспензию сорбента с иммобилизованной ГК (аффинный сорбент) объёмом 300 мкл помещали в специальную фильтровальную колонку диаметром 10 мм и промывали сорбент фосфатно-солевым буфером (5 аликвот буфера по 500 мкл каждая). После этого пропускали 4 мл интактного лизата ткани печени крысы, разбавленного фосфатно-солевым буфером в пять раз. Затем суспензию сорбента промывали фосфатно-солевым буфером (5 аликвот буфера по 500 мкл каждая) для удаления лабильно связанного с сорбентом белкового материала лизата, после чего элюировали белки, которые образовали стабильные комплексы с иммобилизованной ГК путём пропускания 1 мл 2% муравьиной кислоты (4 аликвоты по 250 мкл каждая). Аналогичные процедуры выполняли с контрольным сорбентом (без иммобилизованной ГК). Оптическую плотность образцов, содержащих белковый материал, измеряли на спектрофотометре QE65000 с источником света DH-2000 (“Ocean Optics”, США) при длине волны 595 нм, используя реактив Брэдфорда. Определение концентрации общего белка в пробах проводили по калибровочному графику. Образцы с белковым материалом,

элюированным с контрольного и аффинного сорбентов, были далее отобраны для последующей масс-спектрометрической (МС) идентификации.

Гель-хроматографическое фракционирование белков лизата ткани печени

Гель-хроматографическое фракционирование белкового материала лизата ткани печени крысы по молекулярной массе выполняли на хроматографе АКТА Purifier 10 (“Cytiva”) под управлением программы UNICORN v5.31. К 2 мл лизата (~40 мг общего белка) добавляли раствор ГК в рабочем буфере, содержащем 10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 1 mM дитиотреитол, 0,5% NaN_3 и 0,05% Tween-20, до финальной концентрации ГК 50 мкМ (опыт) и инкубировали образец лизата в течение 1 ч при 4°C. Аналогичную процедуру выполняли и в случае контрольного образца лизата (без добавления раствора ГК). Выбранная для инкубации лизата конечная концентрация ГК примерно в 2,5 раза превышает таковую в плазме крови *in vivo*, установленную при фармакокинетических исследованиях на животных [14], но не менее чем на порядок ниже концентраций мицелло- и агрегатообразования ГК в кислой или слабокислой среде *in vitro* [15, 16]. Далее образцы лизатов центрифугировали в течение 10 мин при 12000 g и температуре 4°C. Супернатант фракционировали на колонке HiLoad 16/600 с Superdex 200 prep grade (“Cytiva”), предварительно уравновешенной рабочим буфером при скорости потока 800 мкл/мин и температуре 15°C. Были собраны 10 фракций лизата (30 кДа, 45 кДа, 60 кДа, 75 кДа, 105 кДа, 200 кДа, 265 кДа, 360 кДа и 490 кДа) для дальнейшей МС идентификации белков. Концентрацию общего белка в собранных фракциях определяли по калибровочной кривой при длине волны 280 нм на спектрофотометре QE65000 с источником света DH-2000 (“Ocean Optics”); измеренные концентрации общего белка составили от 0,2 мг/мл до 1 мг/мл.

Масс-спектрометрическая идентификация белков

Анализ методом ЖХ-МС/МС проводили на масс-спектрометре micrOTOF-QII (“Bruker Daltonik”, Германия), оснащённом источником ионизации CaptiveSpray (“Bruker Daltonik”) и сопряжённом с системой нано-ВЭЖХ nanoElute (“Bruker Daltonik”). Общее количество белка 30 мкг подвергали триптическому гидролизу по модифицированному протоколу FASP [17] для последующей МС идентификации. Все образцы обессоливали с использованием C18 SPE дисков (“Merck”, США) в наконечниках StageTip согласно протоколу [18]. Затем каждый образец ресуспендировали и в объёме от 1 до 6 мкл (в зависимости от наблюдаемого сигнала пептидов) вводили в ловушечную колонку Acclaim™ PepMap™ C18 для обращённо-фазовой ВЭЖХ (5 мкм, 0,3 мм × 5 мм, “Thermo Fisher Scientific”, США) с использованием фазы А (0,1% муравьиной кислоты (“Merck Millipore”, США) в воде) при давлении 400 бар. Разделение пептидов проводили на аналитической

колонке Aurora Ultimate CSI C18 для ВЭЖХ (1,7 мкм, 120 Å, 75 мкм × 250 мм, “IonOpticks”, Австралия) при скорости потока 300 нл/мин и температуре 50°C. Элюцию осуществляли с использованием подвижной фазы А [вода:муравьиная кислота (100:0,1, об/об)] и подвижной фазы Б [ацетонитрил:муравьиная кислота (100:0,1, об/об)]. Градиент элюирования был следующим: 2–3% Б за 0–1 мин, до 17% Б за 57 мин, до 25% Б за 78 мин, до 34% Б за 92 мин, до 85% Б за 93 мин. Концентрация фазы Б затем поддерживалась на уровне 85% в течение последующих 7 мин, после чего снижалась до исходных 2% для следующей хроматограммы.

МС-анализ проводили в режиме положительной ионизации со следующими параметрами: сухой газ нагрет до 150°C со скоростью потока 3 л/мин, напряжение на капилляре 1500 В. Полный сканирующий масс-спектр регистрировали в диапазоне от 150 *m/z* до 2200 *m/z* со скоростью сбора данных 2 Гц. МС/МС-анализ выполняли в автоматическом режиме с фиксированным временем цикла 3 с для прекурсорных ионов, динамическим сбором МС/МС-спектров с разрешением от 8 Гц до 32 Гц и для ионов с зарядовыми состояниями от 2+ до 4+. Необработанные данные анализировали с использованием программного обеспечения Bruker compass DataAnalysis 5.1 (“Bruker Daltonik”) с настройками по умолчанию для протеомного анализа. Объединенный пик-лист экспортировали в формате Mascot Generic Format (*.mgf). Идентификацию проводили с использованием поисковой системы Mascot версии 2.3.0 (“Matrix Science”, Великобритания) против базы данных SwissProt (версия от 20 мая 2020 г.) с ограничением по таксономии *Rattus* (крыса). Параметры поиска были следующими: фермент — трипсин, допустимое число пропущенных точек расщепления — 1, переменные модификации — деамидирование (Asn, Gln) и окисление (Met), допустимое отклонение массы пептида — 40 млн.д. (ppm), допустимое отклонение массы для МС/МС — 0,2 Да, предпочтительный заряд пептидов — от 2+ до 4+ (в соответствии с параметрами прибора).

Молекулярный докинг

Молекулярный докинг ГК в структуру белков был выполнен в программе Flare™ 8.0.0 (“Cresset Group”, Великобритания). 3D-структуры белков для молекулярного моделирования взяли из Protein Data Bank (PDB): моноаминоксидаза А (PDB ID: 1O5W, разрешение 3,20 Å) [19], 3-альфа гироксистеролдегидрогеназа (PDB ID: 1AFS, разрешение 2,50 Å) [20], S-аденозилметионинсинтаза изоформа 1 (PDB ID: 1QM4, разрешение 2,66 Å) [21] и неселективный натриевый канал NALCN (PDB ID: 7CU3, разрешение 2,65 Å) [22]. Для остальных белков с неизвестной 3D-структурой были использованы предсказанные AlphaFold2 пространственные 3D-модели (AlphaFold Protein Structure Database, developed by Google DeepMind and EMBL-EBI, <https://alphafold.ebi.ac.uk/>). 3D-модели

белков выбирали по показателю очень высокой достоверности (pLDDT score >90). В программе Flare™ была выполнена экстракция лиганда и других малых молекул из 3D-структур и моделей белков, а также проведена минимизация по энергии (300 шагов). Далее в программе Flare™ построили пространственную структуру ГК по SMILES коду (PubChem CID14982). Молекулярный докинг ГК в 3D-структуры белков был выполнен в режиме Normal. Предсказание сайтов связывания ГК проводили по всей поверхности 3D-структуры белка, в том числе и в зоне контакта субъединиц для олигомерных белков. Модели комплексов “белок/ГК” ранжировали по показателю “Rank score” < -7 и ΔG < -10. Аминокислотные остатки, формирующие связи между разными субъединицами белка определяли при помощи онлайн сервера PDBePIS v1.52 (Protein interfaces, surfaces and assemblies' service PISA at the European Bioinformatics Institute) [23]. Для анализа зоны контакта субъединиц А и В моноаминоксидазы А использовали 3D-структуру (PDB ID: 1O5W) [19].

Анализ функционального обогащения

Веб-платформа WebGestalt [24] была использована для анализа представленности белков в метаболических и сигнальных путях KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) и Reactome (<https://reactome.org>) при установках по умолчанию (организм *Rattus norvegicus*). Выделенные белки из лизата ткани печени крысы аннотировали по известным ассоциациям с заболеваниями ортологов организма человека при помощи онлайн сервера “Diseases” [25]. Термины заболеваний выбирали по показателю достоверности 3 и выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация потенциальных белковых мишеней глицирризиновой кислоты

Применение подхода, основанного на выделении взаимодействующих с ГК белков, нацелено на выяснение всего потенциального спектра белков, образующих стабильные связи с ГК, что важно для характеристики значимых мишеней в контексте изучения молекулярного базиса множественной биологической активности ГК. В таблице 1 приведены данные о МС идентификации 88 потенциальных белковых мишеней, выделенных из интактного лизата ткани печени крысы на сорбенте с ковалентно иммобилизованной ГК после вычета белков, которые неспецифически связались с контрольным сорбентом (без иммобилизации ГК). Термин “интактный” здесь указывает на то, что образцы лизата не обрабатывали мягкими детергентами и слабой кислотой для предварительной диссоциации белковых комплексов “дикого типа”. Медианное значение молекулярной массы (ММ) белка составило 56,6 кДа при минимальном и максимальном значениях — 7,5 кДа и 303,2 кДа соответственно. Согласно данным Uniprot [26] для 29 из 88 белков известна информация

Таблица 1. Потенциальные белки-мишени глицерризиновой кислоты, выделенные из лизата печени крысы

Обозначение белка	Имя белка	Mascot score	Uniprot ID	ММ*, Да	Олигомерное состояние**
Ywhab	14-3-3 protein beta/alpha	50	P35213	28037	Гомодимер
Ywhaq	14-3-3 protein theta	50	P68255	27761	Гомодимер
Htr6	5-hydroxytryptamine receptor 6	40	P31388	46892	н/д***
Acox2	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 2	68	P97562	76750	н/д
Acsf6	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 6	36	P33124	78130	н/д
Actr1a	Alpha-centractin	30	P85515	42587	н/д
Aldh3a2	Aldehyde dehydrogenase family 3 member A2	58	P30839	54047	н/д
Aldh2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	165	P11884	56453	Гомотетрамер
Maoa	Amine oxidase [flavin-containing] A	36	P21396	59470	Гомодимер
Aox2	Aldehyde oxidase 2	33	A0A096P6M6	147777	Гомодимер
Actr2	Actin-related protein 2	30	Q5M7U6	44705	н/д
Arsb	Arylsulfatase B	31	P50430	58922	Гомодимер
Asgr1	Asialoglycoprotein receptor 1	44	P02706	32828	н/д
Chd6	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 6	33	D3ZA12	303258	н/д
Cyp1a1	Cytochrome P450 1A1	40	P22443	59356	н/д
Cyp1a2	Cytochrome P450 1A2	40	P04799	58222	н/д
Cyp2c55	Cytochrome P450 2C55	33	P33273	55954	н/д
Cyp27a1	Sterol 26-hydroxylase, mitochondrial	45	P17178	60695	н/д
Cyp2a1	Cytochrome P450 2A1	73	P11711	55959	н/д
Cyp2a3	Cytochrome P450 2A3	31	P20812	56474	н/д
Cyp2b3	Cytochrome P450 2B3	51	P13107	56348	н/д
Cyp2c13	Cytochrome P450 2C13, male-specific	43	P20814	55824	н/д
Cyp2c23	Cytochrome P450 2C23	44	P24470	56397	н/д
Cyp2d3	Cytochrome P450 2D3	44	P12938	56605	н/д
Cyp2d10	Cytochrome P450 2D10	128	P12939	57039	н/д
Cyp2d26	Cytochrome P450 2D26	99	P10634	56648	н/д
Cyp3a1	Cytochrome P450 3A1	32	P04800	57880	н/д
Cyp3a2	Cytochrome P450 3A2	32	P05183	57694	н/д
Cyp4a14	Cytochrome P450 4A14	91	P20817	58195	н/д
Ddb1	DNA damage-binding protein 1	51	Q9ESW0	126781	н/д
Decr1	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	38	Q64591	36110	Гомотетрамер
Hsd17b12	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	33	Q6P7R8	34819	н/д
Hsd17b2	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 2	48	Q62730	41939	Гомодимер
Hsd17b8	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 8	32	Q6MGB5	26774	Гетеротетрамер
Hsd11b1	Corticosteroid 11-beta-dehydrogenase isozyme 1	90	P16232	31863	Гомодимер
Dhrs4	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4	51	Q8VID1	29803	Гомотетрамер
Akr1c9	3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	35	P23457	37004	Мономер
Ecsit	Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway, mitochondrial	40	Q5XIC2	49588	н/д
Ftcd	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase	64	O88618	58877	Гомооктамер
Gng7	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-7	34	P43425	7519	Тример
Slc25a18	Mitochondrial glutamate carrier 2	54	Q505J6	34148	н/д
Gna13	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13	42	Q6Q7Y5	43984	н/д
Gnas	Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms XLas	42	Q792G6	122810	н/д
Gorab	RAB6-interacting golgin	30	B1H222	41606	н/д
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2	38	P62994	25190	Гомодимер

ГЛИЦИРРИЗИНОВАЯ КИСЛОТА: НОВЫЕ БЕЛКОВЫЕ МИШЕНИ

Таблица 1. Потенциальные белки-мишени глицирризиновой кислоты, выделенные из лизата печени крысы (продолжение)

Обозначение белка	Имя белка	Mascot score	Uniprot ID	ММ*, Да	Олигомерное состояние**
Hsp90ab1	Heat shock protein HSP 90-beta	550	P34058	83229	Мономер
Hspa2	Heat shock-related 70 kDa protein 2	54	P14659	69599	н/д
Ephx1	Epoxide hydrolase 1	157	P07687	52548	н/д
Prodh2	Hydroxyproline dehydrogenase	30	Q2V057	50970	н/д
Lgals3bp	Galectin-3-binding protein	34	O70513	63701	Гомодимер
Lima1	LIM domain and actin-binding protein 1	40	F1LR10	83746	н/д
L3mbtl2	Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 2	40	Q3MIF2	78916	н/д
Lonp1	Lon protease homolog, mitochondrial	42	Q924S5	105726	Гомогексамер
Aspg	60 kDa lysophospholipase	35	P30919	60756	Гомотетрамер
Lrif1	Ligand-dependent nuclear receptor-interacting factor 1	30	Q499M7	82618	н/д
Mccc1	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha, mitochondrial	40	Q510C3	79279	Додекамер
Mettl7b	Methyltransferase-like protein 7B	30	Q562C4	27886	н/д
Mat1a	S-adenosylmethionine synthase isoform type-1	30	P13444	43670	Гомотетрамер
Aldh6a1	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [acylating], mitochondrial	33	Q02253	57771	Гомотетрамер
Mogs	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase	33	O88941	91814	н/д
Pmpcb	Mitochondrial-processing peptidase subunit beta	33	Q03346	54230	Гомодимер
Mvp	Major vault protein	54	Q62667	95739	н/д
Myl6	Myosin light polypeptide 6	66	Q64119	16964	н/д
Nalcn	Sodium leak channel non-selective protein	32	Q6Q760	200360	н/д
Nde1	Nuclear distribution protein nudE homolog 1	32	Q9ES39	38504	н/д
Nsdhl	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	43	Q5PPL3	40386	Гомодимер
Phyh	Phytanoyl-CoA dioxygenase, peroxisomal	38	P57093	38563	н/д
Pigr	Polymeric immunoglobulin receptor	54	P15083	84745	н/д
Rack1	Receptor of activated protein C kinase 1	35	P63245	35055	Мономер
Rdh7	Retinol dehydrogenase 7	43	P55006	35713	н/д
Reep6	Receptor expression-enhancing protein 6	43	Q5XI60	23298	н/д
Rpn1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1	33	P07153	68262	н/д
Slc27a5	Bile acyl-CoA synthetase	69	Q9ES38	76217	н/д
Sfxn1	Sideroflexin-1	37	Q63965	35523	н/д
Sod1	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	31	P07632	15902	Гомодимер
Ssr1	Translocon-associated protein subunit alpha	32	Q7TPJ0	35607	Гетеротетрамер
Sts	Steryl-sulfatase	40	P15589	62638	Гомодимер
Stxbp5	Syntaxin-binding protein 5	30	Q9WU70	127579	н/д
Tkt	Transketolase	74	P50137	67601	Гомодимер
Trip12	E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12	40	F1LP64	223788	н/д
Ugt1a1	UDP-glucuronosyltransferase 1-1	43	Q64550	59624	Гомодимер
Ugt1a3	UDP-glucuronosyltransferase 1-3	43	Q64637	60101	Гомодимер
Ugt2b	UDP-glucuronosyltransferase 2B2	118	Q62789	60946	н/д
Ugt2b7	UDP-glucuronosyltransferase 2B7	90	Q62789	60050	н/д
Ugt2b15	UDP-glucuronosyltransferase 2B15	47	P36511	61020	н/д
Ugt2b37	UDP-glucuronosyltransferase 2B37	61	P19488	60553	н/д
Hdlbp	Vigilin	34	Q9Z1A6	141496	н/д
Eci2	Enoyl-CoA delta isomerase 2, mitochondrial	36	Q5XIC0	42994	н/д

Примечание: * – ММ, молекулярная масса; ** – согласно базе данных Uniprot; *** – н/д, нет данных.

о их олигомерном состоянии и главным образом это гомодимеры. Анализ известных физических взаимодействий между выделенными белками (после исключения из анализа цитохромов P450 и UDP-глюкурозилтрансфераз), используя онлайн серверы STRINGdb [27] и GeneMania [28], показал отрицательный результат, кроме взаимодействий между Actr1a и Actr2, а также Ssr1 и Rpn1. Таким образом, потенциальные белковые мишени ГК отличаются по ММ, треть из которых способна к гомодимеризации; однако, исходя из существующих данных о белок-белковых взаимодействиях (ББВ), они не формируют единую сеть.

Гель-хроматография белкового материала лизата

С помощью гель-хроматографии пробу с белковым материалом тканевого лизата можно разделить на множество фракций, каждая из которых содержит отдельные белки и белковые комплексы с близкими значениями ММ. Анализ белкового состава фракций логично дополняет данные аффинного выделения белковых мишеней ГК с точки зрения участия в белковом комплексообразовании последних (мономерные белки, гомо-/гетеродимеры, белковые комплексы более высокого порядка). Преинкубация образцов лизата ткани печени в присутствии фармакологически активной концентрации ГК перед гель-хроматографией позволяет оценить влияние ГК на распределение белковых мишеней ГК во фракциях тканевого лизата.

В таблице 2 приведены примеры 12 белков, обнаруженных во фракциях лизата на контроле (инкубация пробы лизата без ГК) и в опытном

варианте (инкубация пробы лизата с ГК). Из таблицы 2 следует, что относительная представленность идентифицированных во фракциях лизата белков по показателю emPAI между контролем и опытом изменяется слабо (≤ 2 раз), за исключением белков Aldh6a1, Decr1 и Sod1, для которых эти изменения более выражены (>2 раз). Хотя Aldh6a1 является гомотетрамером (ММ 232 кДа), однако в опыте с ГК его относительная представленность увеличивается во фракции 60 кДа, что соответствует ММ его мономера, и может быть связано с влиянием ГК на олигомерное состояние Aldh6a1. Белок 2,4 диенол-СоА редуктаза (Decr1) является гомотетрамером и в присутствии ГК может сдвигаться равновесие в системе мономер-димер Decr1 в сторону увеличения димера. Снижение относительной представленности гомодимера супероксиддисмутазы [Cu-Zn] (Sod1, ММ ~32 кДа) во фракции с ММ 30 кДа в присутствии ГК. Таким образом, анализ данных гель-хроматографии позволил выявить по крайней мере три белка, профиль комплексообразования которых может изменяться в присутствии ГК.

Верификация in silico взаимодействия потенциальных белковых мишеней с глицирризиновой кислотой

Основное ограничение примененного экспериментального подхода по выделению белковых мишеней ГК из интактного тканевого лизата заключается в том, что и одиночные белки, и белковые комплексы могут образовывать стабильные комплексы с ГК иммобилизованной на инертном сорбенте. Идентифицированные в исследовании

Таблица 2. Потенциальные белки-мишени глицирризиновой кислоты, определённые во фракциях лизата печени крысы различной молекулярной массы

Обозначение белка	ММ, Да*	Олигомерное состояние**	Фракция лизата, кДа	emPAI*** (К)	emPAI*** (Э)
Ywhab	28037	Гомодимер	75	0,12	0,25
Acox2	76750	Гомодимер	105	0,09	0,04
Aldh2	56453	Гомотетрамер	105	0,66	0,57
Decr	36110	Гомотетрамер	75	0,19	0,55
Dhrs4	29803	Гомотетрамер	490	0,11	0,11
Akr1c9	37004	Мономер	30	0,41	0,29
Gng7	7519	Тример	490	0,47	0,47
Lgals3bp	63701	Гомодимер	490	0,11	0,05
Aldh6a1	57771	Гомотетрамер	60	0,25	0,74
Phyh	38563	н/д	30	0,18	0,18
Sod1	15902	Гомодимер	30	2,88	0,79
Tkt	67601	Гомодимер	75	0,05	0,10

Примечание: * – ММ, молекулярная масса; ** – олигомерное состояние согласно базе данных Uniprot; *** – emPAI, экспоненциально модифицированный индекс распространённости белка; н/д, нет данных; (К), контроль (инкубация лизата ткани без глицирризиновой кислоты); (Э), эксперимент (инкубация лизата ткани с глицирризиновой кислотой).

88 белковых мишеней (табл. 1) правильнее будет назвать потенциальными белковыми мишенями ГК. Спектр выделенных из лизата белков представлен белками, которые напрямую взаимодействуют с ГК (прямые партнёры), так и непрямыми партнёрами, которые были выделены из тканевого лизата в составе белковых комплексов более высокого порядка, меченных прямым партнёром. Экспериментальная верификация парных взаимодействий ГК с каждым из выделенных белков была бы крайне интересным будущим дополнением результатов поисковой стадии исследования. Ввиду технического ограничения по экспериментальной верификации сложно однозначно классифицировать идентифицированные белковые мишени на прямые и не прямые партнёры ГК. По этой причине, мы выполнили теоретическую верификацию взаимодействий ГК с белками с помощью молекулярного докинга в программе Flare™, используя данные о 3D-структурах белков из PDB и предсказанных 3D-моделях из AlphaFold Protein Structure Database.

Параметры смоделированных комплексов белок/ГК, соответствующие условиям селекции по наименьшим значениям ΔG и Rank score, представлены в таблице 3. Визуализация взаимодействующих с ГК аминокислотных остатков белков Acox2, Akr1c9, Maoa, Mat1a и Nalcn приведена в таблице S1 Дополнительных материалов. При моделировании комплексов белок/ГК также проверяли возможность связывания ГК с белками, которые могут находиться в разном олигомерном состоянии. Так, ГК взаимодействовала с обоими мономерами А и В белка Mat1a, и с поверхностью мономера В в димере А–В белка Маоа. На примере последнего белка проверили гипотезу о возможном связывании ГК в области взаимодействия (интерфейс) мономеров А и В. Модели комплексов ГК с каждым из мономеров Маоа были отобраны по параметрам ΔG и Rank score: -7,97448 и -5,33572 (мономер А) и -8,97199 и -5,73738 (мономер В) соответственно. Поскольку параметры ΔG и Rank score, характеризующие взаимодействие ГК в интерфейсе мономеров Маоа, значительно уступали параметрам взаимодействия ГК с поверхностью димера А–В, то гипотеза не была подтверждена *in silico*. Таким образом, по результатам молекулярного докинга приоритизировали 5 белков (Acox2, Akr1c9,

Maoa, Mat1a и Nalcn) — потенциальных прямых партнёров ГК, которая может теоретически выступать модулятором активности белков-ферментов. Например, ГК ингибирует моноаминоксидазу А и В (Маоа и Маоб), что было показано в работе Bhattacharjee и соавт. [29].

Функциональная аннотация спектра потенциальных белковых мишеней глицирризиновой кислоты

Более одной пятой части (~22%) от всех выявленных в работе потенциальных белковых мишеней ГК участвует в реакциях окисления и биотрансформации ксенобиотиков и лекарств. К таким белкам следует отнести изоферменты мультигенного семейства цитохромов P450 (Cyp1a1, 1a2, 2c55, 27a1, 2a1, 2a3, 2b3, 2c13, 2c23, 2d3, 2d10, 2d26, 3a1, 3a2, 4a14) и семейства UDP-глюкоуранозилтрансфераз (Ugt1a1, 1a3, 2b, 2b7, 2b15, 2b37), которые предположительно вовлечены в биотрансформацию ГК. В этом контексте ГК вероятно может выступать в качестве субстрата цитохромов P450 в гепатоцитах. Однако в ряде работ отмечалась ингибиторная активность ГК в отношении некоторых цитохромов P450. Например, возможность ГК конкурентно ингибировать активность Cyp3a1 крысы, один из белков-мишеней ГК, установленных в данной работе (табл. 1), была продемонстрирована Wang и соавт. [30]. В другой работе была показана ингибиторная активность ГК в отношении Cyp3a4 человека [31].

Другая группа потенциальных белковых мишеней ГК (~12%) представлена оксидоредуктазами (Aldh2, Aldh3a2, Aldh6a1, Aox2, Dhfr4, Hsd11bx, Nsdhl и Rdh7), которые катализируют окислительные и восстановительные реакции — переносят электроны или атомы водорода с одного субстрата на другой. Анализ результатов функционального обогащения сокращённого набора белков (без включения в него цитохромов P450 и UDP-глюкоуранозилтрансфераз) показал, что 24 из 88 потенциальных белковых мишеней ГК (23%) участвуют в метаболизме аминокислот (гистидина, аланина, триптофана, аргинина и пролина); деградации валина, лейцина и изолейцина; деградации жирных кислот; биосинтезу стероидных гормонов. Таким образом, 57% (22%+23%+12%) аффинно выделенных из лизата ткани печени

Таблица 3. Основные характеристики комплексов белок/глицирризиновая кислота по данным молекулярного докинга

Обозначение белка	№ модели докинга	Изменение свободной энергии, ΔG , ккал/моль	Значение Rank score	Олигомерное состояние белка
Acox2, peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 2	0	-11,35	-7,83	Мономер
Akr1c9, Akr1c9, 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase	1	-12,35	-9,31	Мономер
Maoa, monoamine oxidase A [flavin-containing]	0	-10,68	-7,51	Гомодимер
Mat1a, S-adenosylmethionine synthase isoform type-1	0	-12,13	-8,69	Гомотетрамер
Nalcn, sodium leak channel non-selective protein	0	-13,76	-8,72	Мономер

белков, взаимодействующих с иммобилизованной на сорбенте ГК, участвуют в процессах клеточного метаболизма и биотрансформации эндогенных и экзогенных соединений.

По данным портала ChEMBL [32] ГК (ChEMBL441687) проявляет ингибиторную активность (показатель концентрации полумаксимального ингибирования — IC_{50} от 0,4 нМ до 822 мкМ) и связывается с некоторыми белками (показатель равновесной константы диссоциации — K_D от 87 мкМ до 150 мкМ). Значения этих показателей приведены, по крайней мере, в отношении 11 белков (Abcc2, Amy2, Gusb, Hmgbl, Hsd11b1, Hsd11b2, Ptpn, Pygm, Slc21a1, Slc21a4 и Slc21a7), из которых 11-бета-гидроксистероиддегидрогеназа 1 (Hsd11b1) была обнаружена в наших экспериментах как потенциальная мишень ГК. Из лизата ткани печени крысы были выделены белки группы мембранных транспортеров (Slc25a18 и Slc27a5) в качестве потенциальных мишеней ГК. Как указано выше три других представителя семейства Slc21 (Slc21a1, Slc21a4 и Slc21a7) также являются потенциальными мишенями ГК. По данным портала DrugBank [33] (<https://go.drugbank.com/>), среди белковых мишеней ГК описаны Hsd11b1, Tnf, Casp3, Lpl, Akr1c4, Akr1c3, Akr1c2 и Abcb11. Интересно, что из лизата ткани печени был выделен белок Akr1c9 (3-альфа-гидроксистероиддегидрогеназа), который также, как и ряд других представителей альдо-кеторедуктаз семейства 1 (Akr1c4, Akr1c3 и Akr1c2) участвует в метаболизме соединений стероидной природы. Таким образом, полученные нами экспериментальные данные о спектре потенциальных мишеней ГК частично согласуются с уже известными данными о мишенях ГК и имеют элемент новизны. Поскольку в экспериментах использовали модельную систему на основе интактного лизата ткани печени крысы, установленный спектр потенциальных белковых мишеней ГК пока не может быть экстраполирован на другие ткани.

В таблице 4 приведены результаты систематизации данных об ассоциациях между выявленными белковыми мишенями ГК с заболеваниями, а также с разными типами биологической активности ГК. Как видно из таблицы 4, на данный момент известно 12 типов активности ГК [34–67], каждый из которых хорошо сопоставляется с соответствующей группой заболеваний, ассоциированной с одной или несколькими белковыми мишенями ГК (табл. 1). В числе последних есть белки-хабы, такие как Aldh2, Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp27a1, Hsd11b1, Grb2, Maa, Slc27a5, Sod1 и Ywhaq, которые ассоциированы с несколькими разными группами заболеваний и занимают центральные позиции в метаболических и сигнальных путях. Поэтому фармакологическое воздействие на данные белки-хабы, в частности воздействие ГК, могло бы быть полезной опцией для коррекции аномальных молекулярных процессов при патологиях. Подтвердить или опровергнуть активность ГК в отношении конкретных белков ещё предстоит в будущих исследованиях.

В целом ГК характеризуется благоприятным профилем безопасности, но вместе с тем, известно, что долгосрочный приём препаратов, содержащих ГК, может приводить к развитию гипертензии [5, 68] и гипокалиемии [5] в качестве побочных эффектов. Интересно, что некоторые обнаруженные нами потенциальные белковые мишени ГК (Aldh2, Cyp1a1, Cyp1a2, Grb2, Hsd11b1, Maa и Sod1), согласно данным онлайн сервера “Diseases” [25], ассоциированы с гипертензией.

Результаты функциональной аннотации спектра потенциальных белковых мишеней ГК и данные молекулярного моделирования свидетельствуют в пользу того, что аффинно выделенные белки из тканевого лизата могут быть вовлечены в реализацию биологических эффектов ГК. Дальнейшая экспериментальная верификация бинарных взаимодействий ГК с обнаруженными белковыми мишенями будет способствовать более детальному пониманию феномена множественной биологической активности ГК *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе поискового исследования были идентифицированы 88 потенциальных белковых мишеней ГК. Результаты исследования расширяют существующие знания о возможном действии данного соединения на молекулярном уровне через экспериментальное выявление тканеспецифических белков. ГК включена в состав некоторых лекарственных средств в качестве фармацевтической субстанции и является перспективным малотоксичным соединением природного происхождения с набором полезной биологической активности. Продолжение исследований фармакодинамики ГК поможет предсказать терапевтические эффекты и создать лекарственные средства с более избирательным действием.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100168-2).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили с соблюдением общепринятых норм гуманного отношения к лабораторным животным и в соответствии с Приказом Минздрава РФ №199н от 1 апреля 2016 г. “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ГЛИЦИРРИЗИНОВАЯ КИСЛОТА: НОВЫЕ БЕЛКОВЫЕ МИШЕНИ

Таблица 4. Сравнение ассоциаций между заболеваниями человека и потенциальными белками-мишенями глицирризиновой кислоты, а также её биологической активностью

Потенциальные белки-мишени глицирризиновой кислоты	Заболевания, связанные с белками-мишенями	Биологическая активность глицирризиновой кислоты	Ссылки
Actr2, Aldh2, Asgr1, Aspg, Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp27a1, Cyp2a3, Ddb1, Ephx1, Gnas, Grb2, Hsd17b2, Hsp90ab1, Lgals3bp, Lonp1, Maoa, Mat1a, Mvp, Phyh, Pigr, Rack1, Sod1, Tkt, Ugt1a1, Ugt2b7	Рак	Противоопухолевая	[34]
Sts	Рак лёгкого		[35]
Ugt2b15	Рак предстательной железы (простаты)		[36, 37]
Gna13	Лимфома Беркитта		н/д
Aldh2, Asgr1, Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp27a1, Cyp2a3, Ddb1, Grb2, Mat1a, Rack1, Sod1, Ugt1a1	Болезни печени	Гепатопротекторная	[38, 39]
Cyp1a2, Cyp27a1, Grb2, Lgals3bp, Mat1a, Slc27a5	Неалкогольная жировая болезнь печени		[40]
Lgals3bp, Slc27a5	Цирроз печени		[41]
Ugt1a1, Ugt1a3, Ugt2b7	Нарушение метаболизма билирубина		н/д
Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp27a1, Grb2, Lgals3bp, Pigr, Sod1	Аутоиммунные заболевания	Иммуномодулирующая	[42]
Asgr1, Ftd	Аутоиммунный гепатит		
Cyp1a2, Cyp27a1, Grb2, Hsd11b1, Slc27a5, Sod1	Сахарный диабет 2-го типа	Антидиабетическая	[43, 44]
Cyp1a1, Cyp1a2, Cyp27a1, Grb2 Sod1	Болезни почек	Нефропротекторная	[45, 46]
Aldh2, Cyp1a2, Myl6, Sod1	Ишемическая болезнь сердца	Кардиопротекторная	[47, 48]
Cyp1a2, Cyp27a1, Maoa, Sod1	Нейродегенеративное заболевание	Нейропротекторная	[49–52]
Htr6, Ywhaq	Болезнь Альцгеймера		[53]
Sod1, Ywhaq	Когнитивные нарушения		н/д
Maoa, Sod1, Ywhaq	Деменция		н/д
Cyp27a1, Hsd11b1, Phyh	Нарушение липидного обмена	Коррекция липидного обмена	[54–56]
Maoa, Sod1	Паркинсонизм	Антипаркинсоническая	[57, 58]
Cyp1a1, Cyp27a1, Sod1	Атеросклероз	Атеропротекторная	[59, 60]
Aldh2, Cyp1a2, Maoa, Sod1	Цереброваскулярные заболевания	Атеропротекторная	н/д
Aspg, Grb2, Phyh	Болезни лимфатической системы	Противовоспалительная	[42, 61]
Cyp27a1, Hsd11b1	Остеопороз		[62, 63]
Aspg	Остеонекроз		[64]
Pigr	Воспалительное заболевание кишечника		н/д
Aspg, Grb2	Тромбоз	Антитромботическая	[65–67]
Maoa, Nde1, Sod1, Ugt2b7	Эпилепсия	н/д	н/д

Примечание: н/д, нет данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bravo V, Serrano M, Duque A, Ferragud J, Coronado P.J. (2023) Glycyrrhizinic acid as an antiviral and anticancer agent in the treatment of human papillomavirus. *J. Pers. Med.*, **13**(12), 1639. DOI: 10.3390/jpm13121639
2. Graebin C.S. (2016) The Pharmacological Activities of Glycyrrhizinic Acid (“Glycyrrhizin”) and Glycyrrhetic Acid. In: Sweeteners (Merrilon J.-M., Ramawat K.G., eds), Springer International Publishing AG, Cham, pp. 1–17. DOI: 10.1007/978-3-319-26478-3_15-1
3. Palawisuth S, Triwatcharikorn J, Hu T, Jaruchanapongtorn S, Cheyasak N. (2023) Efficacy and safety of cream containing dipotassium glycyrrhizinate, *Vaccinium myrtillus*, epigallocatechin gallate glucoside, and *Tamarindus indica* compared with triamcinolone acetonide cream in eczema and psoriasis. *J. Med. Assoc. Thai.*, **106**(2), 115–121. DOI: 10.35755/jmedassocthai.2023.02.13745
4. Liu X, Tian X, Ma Z, Chen J, Huang Q, Gao P, Zhang C. (2022) Efficacy and safety of glycyrrhizic acid preparation treating comorbid liver injury in COVID-19: a systematic review. *Front. Pharmacol.*, **13**, 1003697. DOI: 10.3389/fphar.2022.1003697
5. Nazari S, Rameshrad M, Hosseinzadeh H. (2017) Toxicological effects of *Glycyrrhiza glabra* (licorice): a review. *Phytother. Res.*, **31**(11), 1635–1650. DOI: 10.1002/ptr.5893
6. Ивашкин В.Т., Бакулин И.Г., Богомолов П.О., Мацеевич М.В., Гейвандова Н.И., Корой П.В., Недогода С.В., Саблин О.А., Ленская Л.Г., Белобородова Е.В., Базрецова А.А., Абдулхаков Р.А., Осипенко М.Ф., Осипова И.В., Почепцов Д.А., Чумачек Е.В., Хромцова О.М., Кузьмичева Е.В. (2017) Результаты многоцентрового двойного слепого рандомизированного плацебоконтролируемого пострегистрционного (IV фаза) клинического исследования “Гепард” (PHG-M2/P02-12), проведенного с целью оценки эффективности и безопасности комбинированного препарата глицирризиновой кислоты и эссенциальных фосфолипидов (Фосфоглив) при неалкогольной жировой болезни печени. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, **27**(2), 34–43. [Ivashkin V.T., Bakulin I.G., Bogomolov P.O., Matsiyevich M.V., Geyvandova N.I., Koroy P.V., Nedogoda S.V., Sablin O.A., Lenskaya L.G., Beloborodova Ye.V., Bagretsova A.A., Abdulkhakov R.A., Osipenko M.F., Osipova I.V., Pocheptsov D.A., Chumachek Ye.V., Khromtsova O.M., Kuzmicheva Ye.V. (2017) Efficacy and safety of glycyrrhizic acid combined to essential phospholipids (Phosphogliv) at non-alcoholic fatty liver disease: results of multicenter double blind randomized placebo-controlled post-registration clinical study (IV phase) “Gepard” (PHG-M2/P02-12). *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, **27**(2), 34–43.] DOI: 10.22416/1382-4376-2017-27-2-34-43
7. EU Clinical Trials Register goes live | European Medicines Agency. Retrieved June 12, 2025, from: <https://www.ema.europa.eu/en/news/eu-clinical-trials-register-goes-live>
8. Manns M.P., Wedemeyer H., Singer A., Khomutjanskaja N., Dienes H.P., Roskams T., Goldin R., Hehnke U., Inoue H.; European SNMC Study Group (2012) Glycyrrhizin in patients who failed previous interferon alpha-based therapies: biochemical and histological effects after 52 weeks. *J. Viral Hepat.*, **19**(8), 537–546. DOI: 10.1111/j.1365-2893.2011.01579.x
9. Liang J.-F., Qin X.-D., Huang X.-H., Fan Z.-P., Zhi Y.-Y., Xu J.-W., Chen F., Pan Z.-L., Chen Y.-F., Zheng C.-B., Lu J. (2024) Glycyrrhetic acid triggers a protective autophagy by inhibiting the JAK2/STAT3 pathway in cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neuroscience*, **554**, 96–106. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2024.06.026
10. Cheng X, Liu Y, Qi B, Wang Y, Zheng Y, Liang X, Chang Y, Ning M, Gao W, Li T. (2024) Glycyrrhizic acid alleviated MI/R-induced injuries by inhibiting Hippo/YAP signaling pathways. *Cell. Signal.*, **115**, 111036. DOI: 10.1016/j.cellsig.2024.111036
11. Zhang L, Zhang N, Pang C. (2024) The mechanistic interaction, aggregation and neurotoxicity of α -synuclein after interaction with glycyrrhizic acid: modulation of synucleinopathies. *Int. J. Biol. Macromol.*, **267**(Pt 2), 131423. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2024.131423
12. Wang Q, Lu T, Song P, Dong Y, Dai C, Zhang W, Jia X, Guo Z, Zhao M, Zhang J, Wang P, Wang J, Guo Q. (2024) Glycyrrhizic acid ameliorates hepatic fibrosis by inhibiting oxidative stress via AKR7A2. *Phytomedicine*, **133**, 155878. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.155878
13. Ni Q, Gao Y, Yang X, Zhang Q, Guo B, Han J, Chen S. (2022) Analysis of the network pharmacology and the structure-activity relationship of glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid. *Front. Pharmacol.*, **13**, 1001018. DOI: 10.3389/fphar.2022.1001018
14. Zhou N, Zou C, Qin M, Li Y, Huang J. (2019) A simple method for evaluation pharmacokinetics of glycyrrhetic acid and potential drug-drug interaction between herbal ingredients. *Sci. Rep.*, **9**, 11308. DOI: 10.1038/s41598-019-47880-4
15. Matsuoka K., Miyajima R., Ishida Y., Karasawa S., Yoshimura T. (2016) Aggregate formation of glycyrrhizic acid. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **500**, 112–117. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2016.04.032
16. Поляков Н.Э., Лешина Т.В. (2023) Физико-химические подходы к изучению антиоксидантной активности глицирризина. *Журнал физической химии*, **97**(5), 624–633. DOI: 10.31857/S0044453723050229 [Polyakov N.E., Leshina T.V. (2023) Physicochemical approaches to the study of the antioxidant activity of glycyrrhizin. *Russ. J. Phys. Chem. A*, **97**(5), 828–835.] DOI: 10.1134/S0036024423050229
17. Wiśniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods*, **6**(5), 359–362. DOI: 10.1038/nmeth.1322
18. Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.*, **2**(8), 1896–1906. DOI: 10.1038/nprot.2007.261
19. Ma J., Yoshimura M., Yamashita E., Nakagawa A., Ito A., Tsukihara T. (2004) Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrates and inhibitors. *J. Mol. Biol.*, **338**(1), 103–114. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.02.032
20. Bennett M.J., Albert R.H., Jez J.M., Ma H., Penning T.M., Lewis M. (1997) Steroid recognition and regulation of hormone action: crystal structure of testosterone and NADP+ bound to 3α -hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase. *Structure*, **5**(6), 799–812. DOI: 10.1016/S0969-2126(97)00234-7
21. González B., Pajares M.A., Hermoso J.A., Alvarez L., Garrido F., Sufriñ J.R., Sanz-Aparicio J. (2000) The crystal structure of tetrameric methionine adenosyltransferase from rat liver reveals the methionine-binding site. *J. Mol. Biol.*, **300**(2), 363–375. DOI: 10.1006/jmbi.2000.3858

22. Kang Y., Wu J.-X., Chen L. (2020) Structure of voltage-modulated sodium-selective NALCN-FAM155A channel complex. *Nat. Commun.*, **11**, 6199. DOI: 10.1038/s41467-020-20002-9
23. Krissinel E., Henrick K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.*, **372**(3), 774–797. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.05.022
24. Elizarraras J.M., Liao Y., Shi Z., Zhu Q., Pico A.R., Zhang B. (2024) WebGestalt 2024: faster gene set analysis and new support for metabolomics and multi-omics. *Nucleic Acids Res.*, **52**(W1), W415–W421. DOI: 10.1093/nar/gkac456
25. Pletscher-Frankild S., Pallegà A., Tsafou K., Binder J.X., Jensen L.J. (2015) DISEASES: text mining and data integration of disease-gene associations. *Methods*, **74**, 83–89. DOI: 10.1016/j.ymeth.2014.11.020
26. UniProt Consortium (2023) UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.*, **51**(D1), D523–D531. DOI: 10.1093/nar/gkac1052
27. Szklarczyk D., Kirsch R., Koutrouli M., Nastou K., Mehryary F., Hachilif R., Gable A.L., Fang T., Doncheva N.T., Pyysalo S., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. (2023) The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res.*, **51**(D1), D638–D646. DOI: 10.1093/nar/gkac1000
28. Franz M., Rodriguez H., Lopes C., Zuberi K., Montojo J., Bader G.D., Morris Q. (2018) GeneMANIA update 2018. *Nucleic Acids Res.*, **46**(W1), W60–W64. DOI: 10.1093/nar/gky311
29. Bhattacharjee M., Manoharan S., Sathisaran U., Tamatam A., Perumal E. (2024) MAO inhibiting phytochemicals from the roots of *Glycyrrhiza glabra* L. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **42**(8), 3887–3905. DOI: 10.1080/07391102.2023.2216298
30. Wang Z., Ma J., Yao S., He Y., Miu K.-K., Xia Q., Fu P.P., Ye Y., Lin G. (2022) Licorice extract and 18 β -glycyrrhetic acid protect against experimental pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity in rats through inhibiting cytochrome P450-mediated metabolic activation. *Front. Pharmacol.*, **13**, 850859. DOI: 10.3389/fphar.2022.850859
31. Lv Q.-L., Wang G.-H., Chen S.-H., Hu L., Zhang X., Ying G., Qin C.-Z., Zhou H.-H. (2015) *In vitro* and *in vivo* inhibitory effects of glycyrrhetic acid in mice and human cytochrome P450 3A4. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **13**(1), 84. DOI: 10.3390/ijerph13010084
32. Zdrzil B., Felix E., Hunter F., Manners E.J., Blackshaw J., Corbett S., de Veij M., Ioannidis H., Lopez D.M., Mosquera J.F., Magarinos M.P., Bosc N., Arcila R., Kizilören T., Gaulton A., Bento A.P., Adasme M.F., Monecke P., Landrum G.A., Leach A.R. (2024) The ChEMBL database in 2023: a drug discovery platform spanning multiple bioactivity data types and time periods. *Nucleic Acids Res.*, **52**(D1), D1180–D1192. DOI: 10.1093/nar/gkad1004
33. Knox C., Wilson M., Klinger C.M., Franklin M., Oler E., Wilson A., Pon A., Cox J., Chin N.E.L., Strawbridge S.A., Garcia-Patino M., Kruger R., Sivakumaran A., Sanford S., Doshi R., Khetarpal N., Fatokun O., Doucet D., Zubkowsky A., Rayat D.Y., Jackson H., Harford K., Anjum A., Zakir M., Wang F., Tian S., Lee B., Liigand J., Peters H., Wang R.Q.R., Nguyen T., So D., Sharp M., da Silva R., Gabriel C., Scantlebury J., Jasinski M., Ackerman D., Jewison T., Sajed T., Gautam V., Wishart D.S. (2024) DrugBank 6.0: the DrugBank knowledgebase for 2024. *Nucleic Acids Res.*, **52**(D1), D1265–D1275. DOI: 10.1093/nar/gkad976
34. Zhang Y., Sheng Z., Xiao J., Li Y., Huang J., Jia J., Zeng X., Li L. (2023) Advances in the roles of glycyrrhizic acid in cancer therapy. *Front. Pharmacol.*, **14**, 1265172. DOI: 10.3389/fphar.2023.1265172
35. Shi J., Li J., Li R., Wu X., Gao F., Zou L., Mak W.W.S., Fu C., Zhang J., Leung G.P.-H. (2021) Synergistic breast cancer suppression efficacy of doxorubicin by combination with glycyrrhetic acid as an angiogenesis inhibitor. *Phytomedicine*, **81**, 153408. DOI: 10.1016/j.phymed.2020.153408
36. Hawthorne S., Gallagher S. (2008) Effects of glycyrrhetic acid and licorice extract on cell proliferation and prostate-specific antigen secretion in LNCaP prostate cancer cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, **60**(5), 661–666. DOI: 10.1211/jpp.60.5.0013
37. Shetty A.V., Thirugnanam S., Dakshinamoorthy G., Samyuktty A., Zheng G., Chen A., Bosland M.C., Kajdacsy-Balla A., Gnanasekar M. (2011) 18 β -Glycyrrhetic acid targets prostate cancer cells by down-regulating inflammation-related genes. *Int. J. Oncol.*, **39**(3), 635–640. DOI: 10.3892/ijo.2011.1061
38. Li J.-Y., Cao H.-Y., Liu P., Cheng G.-H., Sun M.-Y. (2014) Glycyrrhizic acid in the treatment of liver diseases: literature review. *BioMed Res. Int.*, **2014**, 872139. DOI: 10.1155/2014/872139
39. Wang Q., Huang Y., Li Y., Zhang L., Tang H., Zhang J., Cheng G., Zhao M., Lu T., Zhang Q., Luo P., Zhu Y., Xia F., Zhang Y., Liu D., Wang C., Li H., Qiu C., Wang J., Guo Q. (2022) Glycyrrhizic acid mitigates tripterygium-glycoside-tablet-induced acute liver injury via PKM2 regulated oxidative stress. *Metabolites*, **12**(11), 1128. DOI: 10.3390/metabo12111128
40. Sun X., Duan X., Wang C., Liu Z., Sun P., Huo X., Ma X., Sun H., Liu K., Meng Q. (2017) Protective effects of glycyrrhizic acid against non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **806**, 75–82. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.04.021
41. Chen S.-R., Chen X.-P., Lu J.-J., Wang Y., Wang Y.-T. (2015) Potent natural products and herbal medicines for treating liver fibrosis. *Chin. Med.*, **10**, 7. DOI: 10.1186/s13020-015-0036-y
42. Richard S.A. (2021) Exploring the pivotal immunomodulatory and anti-inflammatory potentials of glycyrrhizic and glycyrrhetic acids. *Mediators Inflamm.*, **2021**, 6699560. DOI: 10.1155/2021/6699560
43. Alqahtani A., Hamid K., Kam A., Wong K.H., Abdelhak Z., Razmovski-Naumovski V., Chan K., Li K.M., Groundwater P.W., Li G.Q. (2013) The pentacyclic triterpenoids in herbal medicines and their pharmacological activities in diabetes and diabetic complications. *Curr. Med. Chem.*, **20**(7), 908–931. DOI: 10.2174/092986713805219082
44. Akutagawa K., Fujita T., Ouhara K., Takemura T., Tari M., Kajiya M., Matsuda S., Kuramitsu S., Mizuno N., Shiba H., Kurihara H. (2019) Glycyrrhizic acid suppresses inflammation and reduces the increased glucose levels induced by the combination of *Porphyromonas gulae* and ligature placement in diabetic model mice. *Int. Immunopharmacol.*, **68**, 30–38. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.12.045
45. Sohn E.-J., Kang D.-G., Lee H.-S. (2003) Protective effects of glycyrrhizin on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Pharmacol. Toxicol.*, **93**(3), 116–122. DOI: 10.1034/j.1600-0773.2003.930302.x
46. Wu C.-H., Chen A.-Z., Yen G.-C. (2015) Protective effects of glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in BALB/c mice. *J. Agric. Food Chem.*, **63**(4), 1200–1209. DOI: 10.1021/jf505471a

47. Haleagrahara N., Varkkey J., Chakravarthi S. (2011) Cardioprotective effects of glycyrrhizic acid against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *Int. J. Mol. Sci.*, **12**(10), 7100–7113. DOI: 10.3390/ijms12107100
48. Li M., Wen Z., Xue Y., Han X., Ma D., Ma Z., Wu Z., Guan S., Sun S., Chu L. (2020) Cardioprotective effects of glycyrrhizic acid involve inhibition of calcium influx via L-type calcium channels and myocardial contraction in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **393**(6), 979–989. DOI: 10.1007/s00210-019-01767-3
49. Shi M., Zhang X., Zhang R., Zhang H., Zhu D., Han X. (2022) Glycyrrhizic acid promotes sciatic nerves recovery in type 1 diabetic rats and protects Schwann cells from high glucose-induced cytotoxicity. *J. Biomed. Res.*, **36**(3), 181. DOI: 10.7555/JBR.36.20210198
50. Klein I., Isensee J., Wiesen M.H.J., Imhof T., Wassermann M.K., Müller C., Hucho T., Koch M., Lehmann H.C. (2023) Glycyrrhizic acid prevents paclitaxel-induced neuropathy via inhibition of OATP-mediated neuronal uptake. *Cells*, **12**(9), 1249. DOI: 10.3390/cells12091249
51. Gendy A.M., El-Sadek H.M., Amin M.M., Ahmed K.A., El-Sayed M.K., El-Haddad A.E., Soubh A. (2023) Glycyrrhizin prevents 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity by downregulating HMGB1/TLR4/NF- κ B p65 signaling, and attenuating oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *Life Sci.*, **314**, 121317. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.121317
52. Paudel Y.N., Angelopoulou E., Semple B., Piperi C., Othman I., Shaikh M.F. (2020) Potential neuroprotective effect of the HMGB1 inhibitor glycyrrhizin in neurological disorders. *ACS Chem. Neurosci.*, **11**(4), 485–500. DOI: 10.1021/acscemneuro.9b00640
53. Zhao H., Wang S.-L., Qian L., Jin J.-L., Li H., Xu Y., Zhu X.-L. (2013) Diammonium glycyrrhizinate attenuates $A\beta_{1-42}$ -induced neuroinflammation and regulates MAPK and NF- κ B pathways *in vitro* and *in vivo*. *CNS Neurosci. Ther.*, **19**(2), 117–124. DOI: 10.1111/cns.12043
54. Chandramouli C., Ting Y.S., Lyn L.Y., Ha T.S., Kadir K.A. (2011) Glycyrrhizic acid improves lipid and glucose metabolism in high-sucrose-fed rats. *J. Endocrinol. Metab.*, **1**(3), 125–141. DOI: 10.4021/jem39w
55. Eu C.H.A., Lim W.Y.A., Ton S.H., Kadir K.A. (2010) Glycyrrhizic acid improved lipoprotein lipase expression, insulin sensitivity, serum lipid and lipid deposition in high-fat diet-induced obese rats. *Lipids Health Dis.*, **9**, 81. DOI: 10.1186/1476-511X-9-81
56. Lim W.Y.A., Chia Y.Y., Liong S.Y., Ton S.H., Kadir K.A., Husain S.N.A.S. (2009) Lipoprotein lipase expression, serum lipid and tissue lipid deposition in orally-administered glycyrrhizic acid-treated rats. *Lipids Health Dis.*, **8**, 31. DOI: 10.1186/1476-511X-8-31
57. Ojha S., Javed H., Azimullah S., Abul Khair S.B., Haque M.E. (2016) Glycyrrhizic acid attenuates neuroinflammation and oxidative stress in rotenone model of Parkinson's disease. *Neurotox. Res.*, **29**(2), 275–287. DOI: 10.1007/s12640-015-9579-z
58. Ren Q., Jiang X., Paudel Y.N., Gao X., Gao D., Zhang P., Sheng W., Shang X., Liu K., Zhang X., Jin M. (2022) Co-treatment with natural HMGB1 inhibitor glycyrrhizin exerts neuroprotection and reverses Parkinson's disease like pathology in zebrafish. *J. Ethnopharmacol.*, **292**, 115234. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115234
59. Markina Y.V., Kirichenko T.V., Markin A.M., Yudina I.Y., Starodubova A.V., Sobenin I.A., Orekhov A.N. (2022) Atheroprotective effects of *Glycyrrhiza glabra* L. *Molecules*, **27**(15), 4697. DOI: 10.3390/molecules27154697
60. Zhu Z., Guo Y., Li X., Teng S., Peng X., Zou P., Zhou S. (2020) Glycyrrhizic acid attenuates balloon-induced vascular injury through inactivation of RAGE signaling pathways. *Cardiovasc. Innov. Appl.*, **4**(4), 239–249. DOI: 10.15212/CVIA.2019.0577
61. Wang C.-Y., Kao T.-C., Lo W.-H., Yen G.-C. (2011) Glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhetic acid modulate lipopolysaccharide-induced inflammatory response by suppression of NF- κ B through PI3K p110 δ and p110 γ inhibitions. *J. Agric. Food Chem.*, **59**(14), 7726–7733. DOI: 10.1021/jf2013265
62. Yin Z., Zhu W., Wu Q., Zhang Q., Guo S., Liu T., Li S., Chen X., Peng D., Ouyang Z. (2019) Glycyrrhizic acid suppresses osteoclast differentiation and postmenopausal osteoporosis by modulating the NF- κ B, ERK, and JNK signaling pathways. *Eur. J. Pharmacol.*, **859**, 172550. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172550
63. Ramli E.S.M., Suhaimi F., Asri S.F.M., Ahmad F., Soelaiman I.N. (2013) Glycyrrhizic acid (GCA) as 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor exerts protective effect against glucocorticoid-induced osteoporosis. *J. Bone Miner. Metab.*, **31**(3), 262–273. DOI: 10.1007/s00774-012-0413-x
64. Xu H., Fang L., Zeng Q., Chen J., Ling H., Xia H., Ge Q., Wu C., Zou K., Wang X., Wang P., Yuan W., Dong R., Hu S., Xiao L., He B., Tong P., Jin H. (2023) Glycyrrhizic acid alters the hyperoxidative stress-induced differentiation commitment of MSCs by activating the Wnt/ β -catenin pathway to prevent SONFH. *Food Funct.*, **14**(2), 946–960. DOI: 10.1039/D2FO02337G
65. Liang X., Hu C., Wang Y. (2023) Biomimetic-modified bioprosthetic heart valves with controlled release of glycyrrhizic acid mediated by the inflammatory microenvironment for anti-thrombotic, anti-inflammatory, and anti-calcification. *Chem. Eng. J.*, **472**, 145044. DOI: 10.1016/j.cej.2023.145044
66. Jiang L., Wang Q., Shen S., Xiao T., Li Y. (2014) Discovery of glycyrrhetic acid as an orally active, direct inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Thromb. Res.*, **133**(3), 501–506. DOI: 10.1016/j.thromres.2013.12.025
67. Mendes-Silva W., Assafim M., Ruta B., Monteiro R.Q., Guimarães J.A., Zingali R.B. (2003) Antithrombotic effect of glycyrrhizin, a plant-derived thrombin inhibitor. *Thromb. Res.*, **112**(1–2), 93–98. DOI: 10.1016/j.thromres.2003.10.014
68. Penninkilampi R., Eslick E.M., Eslick G.D. (2017) The association between consistent licorice ingestion, hypertension and hypokalaemia: a systematic review and meta-analysis. *J. Hum. Hypertens.*, **31**(11), 699–707. DOI: 10.1038/jhh.2017.45

Поступила в редакцию: 20.06.2025.
 После доработки: 06.07.2025.
 Принята к печати: 09.07.2025.

GLYCYRRHIZIC ACID: NOVEL POTENTIAL PROTEIN TARGETS

*P.V. Ershov, E.O. Yablokov, L.A. Kaluzhskiy, Yu.V. Mezentsev,
O.V. Gnedenko*, M.A. Konstantinov, I.Yu. Toropygin, A.S. Ivanov*

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: gnedenko.oksana@gmail.com

To date, a large body of data has been accumulated on the biological activity of a low-toxic natural glycoside, glycyrrhizic acid (GA), but the mechanism of its action at the molecular level has not been fully studied. Expanding knowledge about the spectrum of cellular protein targets of GA contributes to understanding new features of pharmacodynamics. The aim of the work was the experimental identification of a tissue-specific spectrum of protein molecules interacting with GA in a model system. Samples of an intact rat liver tissue lysate were incubated with GA covalently immobilized on EAH-Sepharose 4B, followed by elution of affinity-isolated protein molecules and their trypsinolysis. Using mass spectrometric analysis, 88 potential protein targets of GA were identified. According to the results of gel chromatographic separation of the rat liver lysate and semi-quantitative analysis of proteins, GA influenced Aldh6a1, Decr1, and Sod1 in fractions. Molecular docking in the Flare™ program used to model protein complexes with GA, resulted in selection of 5 proteins (Acox2, Acr1c9, Maoa, Mat1a, Nalc1), which formed complexes with GA with the most favorable ΔG and Rank score parameters. More than half (57%) of the affinity-isolated proteins are involved in the processes of basic cellular metabolism and biotransformation of endogenous and exogenous compounds. Data on the associations of potential protein targets of GA with diseases and different types of biological activity of GA have been systematized and compared.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Keywords: glycyrrhizic acid; cytochrome P450; glycyrrhizic acid binding protein; mass spectrometry; liver tissue lysate; affinity purification

Funding. The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100168-2).

Received: 20.06.2025; revised: 06.07.2025; accepted: 09.07.2025.