

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 616.379-003

©Коллектив авторов

СИНТЕЗ И ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БИС(L-МАЛАТО)ОКСОВАНАДИЯ(IV)

В.К. Городецкий, А.И. Точилкин, Н.Ф. Беляева, И.Р. Ковельман,
Б.Ф. Коровкин*

Учреждение РАМН Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
им. В.Н.Ореховича РАМН, Погодинская ул.,10, 119121, Москва;
тел.: (499) 246-36-31; эл.почта: natalia.belyaeva@ibmc.msk.ru.

С целью создания новых пероральных антидиабетических лекарственных средств на основе комплексов ванадила с органическими лигандами нами впервые синтезирован билигандный ванадильный комплекс L-яблочной кислоты - бис(L-малато)оксованадий(IV) и изучены его гипогликемические свойства на модели крыс с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом. Показано, что прием бис(L-малато)оксованадия(IV) с питьевой водой существенно снижает содержание глюкозы в крови и моче, а также уровень гликированных белков у крыс со стрептозотоциновым диабетом.

Ключевые слова: бис(L-малато)оксованадий(IV), комплексы оксованадия(IV), L-яблочная кислота, гипогликемическая активность.

ВВЕДЕНИЕ. Исследования последних лет показали, что соединения ванадия обладают выраженной гипогликемической активностью и представляют большой интерес в качестве потенциальных антидиабетических средств [1-3]. Инсулиноподобный эффект ванадийсодержащих соединений привлекает внимание большого числа исследователей и рассматривается в целом ряде обзоров [см., например, 4, 5].

Известно, что неорганические соединения ванадия (ванадилсульфат и ванадат) плохо всасываются в желудочно-кишечном тракте [6].

При этом соединения четырехвалентного ванадия обладают более низкой токсичностью, по сравнению с соединениями пентавалентного ванадия, и поэтому более предпочтительны. С целью улучшения абсорбции, терапевтической безопасности и эффективности в ряде лабораторий были синтезированы различные органические соединения ванадия. Из них наиболее хорошо изученными являются бис(L-малато)оксованадий(IV) [7], бис(N-октилцистеинамидо)оксованадий(IV) [8], бис(ацетилацетонато)оксованадий(IV) [9]. Поскольку природа органического лиганда во многом определяет фармакологические особенности ванадильного комплекса (токсичность, фармакокинетика), представляют безусловный интерес поиски новых, более эффективных и безопасных комплексов оксованадия(IV).

В настоящей работе описан синтез и изучена гипогликемическая активность бис(L-малато)оксованадия(IV).

Идея создания комплекса ванадила с яблочной кислотой принадлежит Б.Ф. Коровкину.

* - адресат для переписки

СИНТЕЗ И ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БИС(L-МАЛАТО)ОКСОВАНАДИЯ(IV)

МЕТОДИКА. В работе были использованы следующие реактивы: L-яблочная кислота ("Fluka", Швейцария); ванадилацетат (синтезирован из уксусного ангидрида и пентооксида ванадия (V_2O_5 , "Aldrich", США) по методу [10]); стрептозотоцин ("Sigma", США); тест полоски для определения глюкозы и кетонových тел в моче Uritest-1 ("Cormay", Польша) и Gluco Phan ("Lachema", Чехия); тест полоски для определения глюкозы в крови Melli Phan ("Lachema").

Синтез бис(L-малато)оксованадия(IV) представлен на схеме. Как видно из этой схемы взаимодействие двух молей L-яблочной кислоты с ванадилирующим реагентом (гидроксидом или ацетатом оксованадия (IV)) в воде при 100-150°C приводит к образованию преимущественно монолигандного ванадильного комплекса 1. Синтез бис(L-малато)оксованадия(IV) проводят путем нагревания смеси мономалатного комплекса 1 и L-яблочной кислоты при пониженном давлении при 105-115°C в вакууме водоструйного насоса. Реакция проходит довольно быстро (в течение 1-2 часов) с образованием воды и приводит к полному связыванию яблочной кислоты в комплекс 2 с выходом свыше 90% [11].

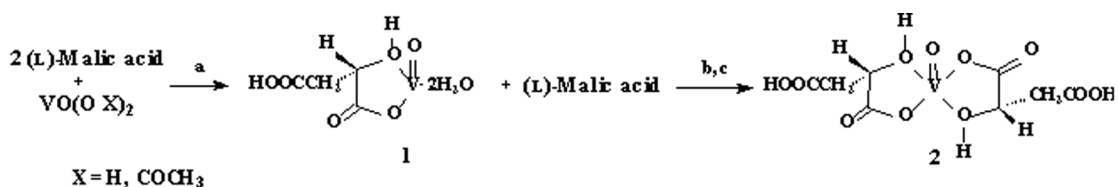


Схема.

Реагенты и условия: (a) H_2O , 40-60°C, 24 ч; (b) упаривание в вакууме досуха; (c) реакция в твердой фазе, -2 H_2O , 20-30 мм рт.ст., 105-115°C, 1-2 ч.

Гипогликемическое действие бис(L-малато)оксованадия(IV) изучалось на 32 белых крысах-самцах линии Вистар, весом 230-250 г (возраст 15-16 недель). Экспериментальный диабет вызывали одноразовой внутрибрюшинной инъекцией водного раствора стрептозотоцина (60 мг на 1 кг веса животного). В опыт отбирали крыс с развившимся диабетом (уровень глюкозы в крови > 20,0 мМ). Животные были разделены на 4 группы: I – здоровые (контрольные крысы) (n=7), II – здоровые крысы, получавшие бис(L-малато)оксованадий(IV) (БМОВ); III – крысы с диабетом не леченные (n = 8), IV – крысы, больные диабетом, и получавшие (БМОВ) (n = 9). Лечение начинали через 4 дня после введения стрептозотоцина и продолжали в течение 4 недель. Крысы получали ежедневно ванадиевый комплекс в виде 0,04% свежеприготовленного водного раствора БМОВ. Расчетная доза ванадиевого комплекса составляла в среднем $0,33 \pm 0,05$ ммоль/кг в сутки. Расчет проводили по количеству потребленного в сутки каждой крысой раствора БМОВ. Взвешивание животных и измерение уровня глюкозы в крови и моче производилось еженедельно. Уровень глюкозы в плазме определялся с использованием глюкозооксидазного метода [12]. Гликированные белки определяли после кислотного гидролиза кетоаминных связей с последующим колориметрическим определением отщепленной фруктозы с тиобарбитуровой кислотой [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Синтез бис(L-малато)оксованадия(IV). Образование ванадилмалатных комплексов в водной среде при различных pH было изучено и описано ранее [14, 15]. Большинство этих исследований проведено исключительно в водных растворах, при этом был выделен и охарактеризован только мономалатооксованадий (см. схему). Нами разработан твердофазный метод синтеза билигандного ванадильного комплекса яблочной кислоты и подтверждено его строение.

Соединение 2 (схема) легко растворимо в воде, растворимо в диметилформамиде, слабо растворимо в метаноле и диметилсульфоксиде и нерастворимо в других органических растворителях. Билигандная структура комплекса (брутто-формула $C_8H_{10}O_{11}V$) подтверждается элементным анализом и результатами потенциометрического титрования, указывающими на наличие в молекуле двух карбоксильных групп (pK_a 3,60 и 4,85). Характер спектра поглощения в видимой области и результаты спектров ЭПР и КД согласуются с соответствующими данными для системы VO^{2+} - L-яблочная кислота в области H 2-4 [15]. Эти данные свидетельствуют в пользу строения соединения 2 как бисмалатного комплекса типа ML_2H_2 (где M - VO^{2+} , L_2H_2 – остатки яблочной кислоты).

Билигандный оксованадиевый комплекс яблочной кислоты не имеет определенной температуры плавления, разлагается при температуре выше $150^\circ C$ и имеет, по рентгенографическим данным, аморфную природу. Вещество 2, по данным масс-спектрометрического анализа, имеет теоретический молекулярный вес (m/z 333). Транс-строение комплекса 2 вытекает из общих свойств билигандных комплексов α -гидроксикарбоновых кислот [16]. Величина оптического вращения составляет $[\alpha]_D^{20} -207 \pm 1^\circ$ (вода, с 3,33).

Следует отметить, что комплекс 2 медленно (в течение 3-4 суток при комнатной температуре) гидролизуется в водном растворе постепенно превращаясь в мономалатный комплекс. Однако небольшая скорость гидролиза не препятствует применению этого комплекса для биологических испытаний.

Гипогликемическая активность бис(L-малато)оксованадия(IV). Результаты четырехнедельного исследования гипогликемического действия бис(L-малато)оксованадия(IV) на крысах со стрептозотоциновым диабетом приведены в таблице. Как видно из таблицы, максимальный эффект воздействия БМОВ был достигнут после 1-2 недель лечения. В процессе эксперимента вес не леченных крыс с диабетом (группа III) постепенно снижался с 225 ± 3 г до 182 ± 3 г. В то же время у контрольных (здоровых) (группа I), и у больных животных, получавших БМОВ (группа IV), потери веса не наблюдалось, и была заметна даже некоторая прибавка веса (от 245 ± 2 г до 270 ± 3 г и от 230 ± 5 г до 268 ± 2 г, соответственно). После четырех недель перорального приема бис(L-малато)оксованадия(IV) уровень глюкозы в плазме крови снижался вдвое, а в моче в 4-5 раз по сравнению с контрольной группой. Следует также отметить, что при лечении БМОВ животных с менее выраженным диабетом (содержание глюкозы в плазме $<15,0$ мМ), уровень глюкозы в крови после приёма БМОВ практически нормализовался (данные не приведены). Концентрация гликированного гемоглобина (HbA_{1c}) после лечения ванадиевым соединением снизилась примерно на 35%. Кроме того, уровень глюкозы в плазме у здоровых контрольных крыс, получавших ванадиевый комплекс, не изменялся.

При внутрибрюшинном введении беспородным крысам таких соединений как бис(L-малато)оксованадий(IV), ортованадат натрия и ванадилсульфат получены следующие значения для LD_{50} – 392; 25 и 81 мг/кг, соответственно [17]. Как видно из этих данных, при наличии органического лиганда, в данном случае, яблочной кислоты, токсичность ванадийсодержащих соединений резко снижается. Более того, бис(L-малато)оксованадий(IV) не проявляет мутагенных, эмбриотоксических, тератогенных, аллергизирующих и иммунотоксических свойств [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Новый билигандный оксованадиевый комплекс, органическим лигандом которого является L-яблочная кислота – естественный метаболит животных и человека, обладает выраженной гипогликемической активностью на модели крыс с экспериментальным диабетом, и его можно рассматривать как перспективное соединение для орального лечения сахарного диабета.

СИНТЕЗ И ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БИС(L-МАЛАТО)ОКСОВАНАДИЯ(IV)

Таблица. Гипогликемические эффекты бис(L-малато)оксованадия(IV).

Исследуемые параметры	Группы животных			
	I (n=7)	II (n=8)	III(n=8)	IV (n=9)
Вес (г)	270 ± 3	280 ± 4	182 ± 5 ^b	268 ± 2 ^a
Концентрация глюкозы в крови (мМ)	5,2 ± 0,2	5,8 ± 0,4	25,8 ± 0,2 ^b	11,5 ± 0,6 ^{ac}
Концентрация глюкозы в моче (%)	0	0	2,1 ± 0,3 ^b	0,5 ± 0,2 ^a
Гликированный гемоглобин HbA _{1c} (%)	4,5 ± 0,4	4,8 ± 0,3	7,9 ± 0,5 ^b	5,4 ± 0,6 ^a
Гликированный альбумин (%)	10,4 ± 0,5	11,2 ± 0,5	23,8 ± 0,5 ^b	15,7 ± 0,6 ^a

Примечание. Группы животных: I -контрольные (здоровые); II - контрольные, получавшие БМОВ; III -крысы с диабетом; IV - диабетические крысы, леченые БМОВ. В скобках указано число животных в каждой группе. Приведены средние арифметические ± S.E. Достоверность различий тестировалась по t критерию Стьюдента. ^ap < 0,01, различие с III; ^bp < 0,01, различие с I; ^cp < 0,01, различие с II.

ЛИТЕРАТУРА

1. Thompson K.H., Lichter J., LeBel C., Scaife M.C., McNeil J.H., Orvid C. (2009) J. Inorg. Biochem., **103**, 554-558.
2. Thompson K.H., Orvid C. (2006) J. Inorg. Biochem., **100**, 1925-1935.
3. Srivastava A.K., Mehdi M.Z. (2005) Diabet. Med., **22**, 2-13.
4. Shechter Y. (1990) Diabetes, **39**, 1-5.
5. Badmaev V., Prakash S., Majeed M. (1999) J. Alternat. Complement. Med., **5**, 273-291.
6. McNeil J.H., Yuen V.G., Hoveyda H.R., Orvid C. (1992) J. Med. Chem., **35**, 1489-1491.
7. Cam M.C., Cros G.H., Serrano J.J., Lazaro R., McNeil J.H. (1993) Diabetes Res. Clin. Pract., **20**, 111.
8. Yuen V.G., Vera E., Battell M.L., Li W.M., McNeill J.H. (1999) Diabetes Res. Clin. Pract., **43**, 9-19.
9. Reul B.A., Amin S.S., Buchet J.-P., Ongemba L.N., Crans D.C., Brichard S.M. (1999) Br. J. Pharmacol. **126**, 467.
10. Paul R.C., Bhatia S., Kumar A. (1971) Inorg. Syn., **13**, 181-183.
11. Коровкин Б.Ф., Арчаков А.И., Сергеев П.Б., Шимановский Н.Л., Городецкий В.К., Точилкин А.И., Ковельман И.Р., Балаболкин М.И., Голубев М.А., Викторова Л.Н. (1998) Патент РФ № 2 101 287; Chem. Abstr., (1998) **133**, 129-220.
12. Лукомская И.С., Городецкий В.К. (1961) Биохимия, **26**, 477-482.
13. Percheron F. (1962) Compt. Rend. Acad. Sci (France), **255**, 2521-2523.

14. *Vilas Boas L.F., Costa Pessoa J.* (1987) in: *Comprehensive Coordination Chemistry* (G. Wilkinson, R.D Gillard and J.A. McLverty, eds) Pergamon: Oxford, v. **3**, pp. 520-522.
15. *Teixeira M.H.S.F., Costa Pessoa J., Vilas Boas L.F.* (1992) *Polyhedron*, **11**, 697-708.
16. *Pedrosa de Jesus J.D.* (1987) in *Comprehensive Coordination Chemistry* (G. Wilkinson, R.D Gillard and J.A. McLverty, eds) Pergamon: Oxford, v. **2**, pp. 471-479.
17. *Aniskina A.P., Victorova L.N., Golubev M.A. et al.* (1995) *Scan. J. Clin. Lab. Investig*, **55**, Suppl. 223, 431.
18. *Коровкин Б.Ф., Точилкин А.И., Городецкий В.К., Беляева Н.Ф., Голубев М.А., Васильев А.В., Тутельян В.А., Княжесев В.А., Балаболкин М.И., Гусева М.К., Добротворский А.Е., Семенова Н.В., Арчаков А.И., Ковельман И.Р.* (2002) Патент РФ № 2191018.

Поступила: 18. 02. 2010.

SYNTHESIS AND HYPOGLYCEMIC ACTIVITY OF BIS(L-MALATO)OXOVANADIUM(IV)

*V.K. Gorodetskii, A.I. Tochilkin, N.F. Belayeva, I.R. Kovelman, **B.F. Korovkin***

Institute of Biomedical Chemistry, ul. Pogodinskaya 10, Moscow, 119121 Russia;
tel.: (499) 246-43-56; e-mail: natalia.belyaeva@ibmc.msk.ru

In order to create new oral vanadyl organic complexes-based drugs for the treatment of diabetes mellitus biligand vanadyl derivative of L-malic acid (bis(L-malato)oxovanadium(IV) was prepared and its potential as a novel hypoglycemic agent was studied in the streptozotocin-diabetic rats. We show that the oral administration of bis(L-malato)oxovanadium(IV) with drink water significantly reduced glucose concentration in blood and urine, as well as the level of glycated proteins in the streptozotocin-diabetic rats.

Key words: bis(L-malato)oxovanadium(IV), oxovanadium(IV) complexes, L-malic acid, hypoglycemic activity.