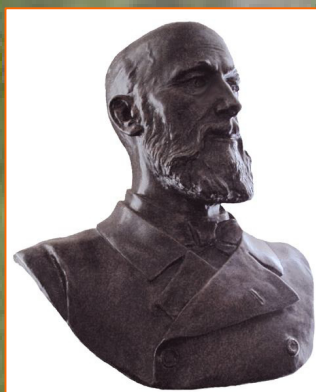
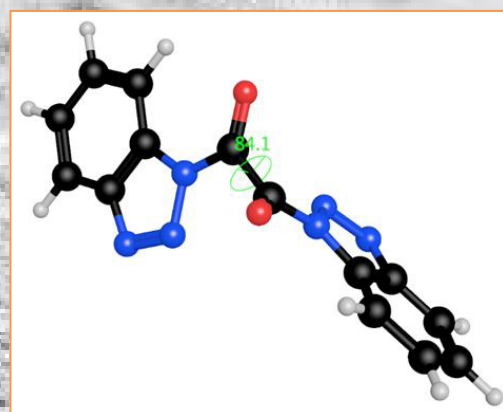


Бутлеровские сообщения

№7, том 59. 2019



ISSN 2074-0212



International Edition in English:
Butlerov Communications

ISSN 2074-0948



Тематическое направление: Инсулиномиметически активные макромолекулярные металлокомплексы ванадия на основе поли-*N*-винилпирролидона. Часть 1.

Синтез макромолекулярного металлокомплекса ванадия и оценка его острой пероральной токсичности

© Иванов^{1,3*} Алексей Геннадьевич, Приходько¹ Вероника Александровна, Мухина¹ Вероника Алексеевна, Анисимова² Наталья Аскольдовна и Кириллова¹ Надежда Васильевна

¹Кафедра биохимии. Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет. ул. проф. Попова, 14. г. Санкт-Петербург, 197376. Россия.
Тел.: (812) 499-39-00, доб. 2452. E-mail: alexey.ivanov@bk.ru

²Кафедра фармакологии и клинической фармакологии. Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет. ул. проф. Попова, 14. г. Санкт-Петербург, 197376. Россия.
Тел.: (812) 499-39-00, доб. 4090.

³Аналитическая лаборатория. Институт высокомолекулярных соединений РАН. Большой пр., 31, В.О. г. Санкт-Петербург, 199004. Россия. Тел.: (812) 328-68-95.

*Ведущий направление; ⁺Поддерживающий переписку

Ключевые слова: сахарный диабет, противодиабетические средства, инсулиномиметическая активность, металлополимерные комплексы ванадия, острая пероральная токсичность.

Аннотация

Сахарный диабет – тяжелое хроническое заболевание, затрагивающее практически все типы обменных процессов в организме. Сахарный диабет распространен во всех странах; по данным ВОЗ, в мире насчитывается до 500 млн. больных, количество которых с каждым годом неуклонно растет. Развитие серьезных осложнений, таких как нефропатия, ретинопатия, нейропатия и различные виды ангиопатий, делает поиск новых лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета одной из наиболее актуальных проблем современной медицины.

К настоящему времени проведено большое количество исследований по изучению инсулиномиметической активности соединений ванадия. Так, в *in vivo* экспериментах на животных было показано, что соединения ванадия, обладая инсулиноподобным действием, участвуют, главным образом, в регуляции углеводного и липидного обмена. В частности, они стимулируют транспорт глюкозы в клетки различных тканей и последующий ее метаболизм, усиливают интенсивность гликогеногенеза и липогенеза, ингибируют процессы глюконеогенеза и гликогенолиза, а также липолиза. Известно, что органические комплексы ванадия менее токсичны, чем его неорганические соли, обладающие рядом побочных эффектов (в том числе за счет воздействия на центральную нервную систему и почки), а также, в сравнении с последними, обладают большей биодоступностью. Это открывает перспективы для поиска противодиабетических препаратов нового класса.

Целью данной работы является получение новых полимерных производных ванадила (VO^{2+}) на основе поли-*N*-винилпирролидона (ПВП), обладающих гипогликемическим эффектом, и изучение возможности применения данных соединений или композиций на их основе для профилактики или лечения диабета 2-го типа. В работе описан способ получения и выделения полимерного производного оксованадия (IV), экспериментально доказаны состав и строение ванадилсодержащего полимерного комплекса. Изучение острой пероральной токсичности полимерного производного ванадила с ПВП показало, что полученный комплекс обладает относительно низкой токсичностью, и его полуметаллическая доза (LD_{50}) на порядок выше, чем у неорганических соединений ванадия.

Введение

Сахарный диабет (СД) является распространенным заболеванием, характеризующимся множественными метаболическими нарушениями и серьезными осложнениями [1, 2]. Заболеваемость СД и смертность от него в последние несколько десятков лет неизменно растут. Существующие синтетические противодиабетические средства имеют немало побочных эффектов и

зачастую не позволяют установить контроль над заболеванием, что часто связано с развитием резистентности к тому или иному препарату [3, 4]. Этим объясняется необходимость поиска новых эффективных и безопасных противодиабетических средств. В качестве таковых могут быть рассмотрены соединения ванадия, проявляющие инсулиноподобную активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [5-7]. Показано, что они стимулируют захват и утилизацию глюкозы клетками, повышают интенсивность гликогеногенеза и липогенеза; ингибируют глюконеогенез и гликогенолиз, а также липолиз [8].

Известно, что органические комплексы ванадия отличаются от его неорганических солей меньшей токсичностью и большей биодоступностью [9]. Это позволило предположить, что дальнейшего улучшения фармакологических свойств можно ожидать от комплексов ванадия с водорастворимыми, нетоксичными, биосовместимыми полимерными носителями, позволяющими регулировать высвобождение ванадия в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и пролонгировать его действие. В качестве такого полимера нами был выбран поли-*N*-винилпирролидон (ПВП), давно зарекомендовавший себя в медицине в качестве носителя лекарственных средств.

Экспериментальная часть

Материалы. Поли-*N*-винилпирролидон ($M_w = 30000$, *Sigma-Aldrich, Munich, Germany*), ванадил сульфат гидрат ($\text{VO}_2\text{SO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, где $n = 3-5$, *Sigma-Aldrich, Munich, Germany*).

Получение металлополимерного комплекса ванадия. Навеску ПВП массой 5.5 г растворяли в 100 мл дистиллированной воды в двугорлой колбе при перемешивании с использованием механической мешалки и нагревании до 40 °С. В 15 мл дистиллированной воды растворяли 2.6 г VO_2SO_4 при перемешивании и нагревании до 50 °С. Водный раствор VO_2SO_4 приливали с использованием капельной воронки. Реакционную смесь нагревали до 70-80 °С в течении 4 ч при перемешивании на механической мешалке. Полученный комплекс ванадия с ПВП (VO-ПВП) очищали от непрореагировавшего VO_2SO_4 путем диализа (диализный мешок, диаметр пор: 1 кДа, *Orange Scientific, Бельгия*) против дистиллированной воды до исчезновения в электронных спектрах промывных вод полосы поглощения VO_2SO_4 при $\lambda = 680$ нм. Выделение VO-ПВП осуществляли путем лиофильной сушки. Выход целевого продукта составлял 87%.

Методы исследования структуры. Полученный комплекс VO-ПВП был охарактеризован методами электронной спектроскопии (СФ-2000, РФ, 200-1100 нм, водный раствор), колебательной спектроскопии (*Shimadzu IRAffinity-1S, Япония*, 4000-400 cm^{-1} , таблетки KBr) и спектроскопии ядерного магнитного резонанса (*Bruker AVANCE II-500 WB, Германия*, 500 МГц, растворитель D_2O). Содержание металла в комплексе определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (*Shimadzu ICPE-9820, Япония*).

Острая пероральная токсичность. Острую пероральную токсичность изучали на 16-ти белых мышах-самках массой от 18 до 29 г, распределенных в группы по 4 особи случайно. Каждая группа животных получала одну из 4-х доз VO-ПВП: 1000, 1260, 1580 или 2000 мг/кг. Комплекс VO-ПВП в виде свежеприготовленного водного раствора вводили однократно натошак внутрижелудочно с использованием зонда. Значения медианной летальной дозы (LD_{50}) и абсолютной погрешности измерения определялись по методу В. Б. Прозоровского [10].

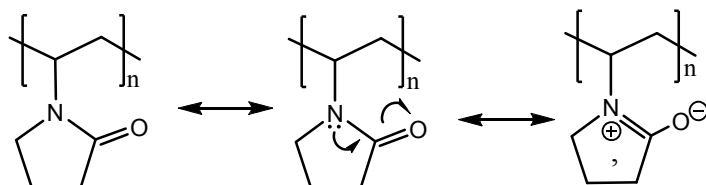
Результаты и их обсуждение

Поли(*N*-винил-2-пирролидон) (ПВП) – синтетический гомополимер, сочетающий в себе такие важные свойства, как биосовместимость и химическая инертность. Известно, что он неиммуногенен и практически нетоксичен; будучи гидрофильным, он прекрасно растворяется в воде и буферных растворах, благодаря чему в настоящее время широко применяется в различных областях медицины и фармации. С другой стороны, известно, что данный полимер обладает способностью связывать тяжелые металлы с образованием металлополимерных комплексов [9], отличающихся относительно невысокими значениями констант устойчивости, однако препятствующих переходу иона металла в иную редокс-форму. Биологически активной формой ванадия, наделяющей его соединения инсулиномиметической активностью, является ион ванадила (VO^{2+}), в то время как ванадат-ион (VO_3^-) не только обладает меньшей активностью, но и проявляет заметную токсичность. Учитывая, что при низких значениях pH ванадий существует главным образом в форме ванадата и/или поливанадатов (VO_3^- , H_2VO_4^- , $\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$, $\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$), задачей, поставленной в настоящей работе, было получение ванадил-содержащих макромолекулярных комплексов, устойчивых в кислой среде, поскольку связанный таким

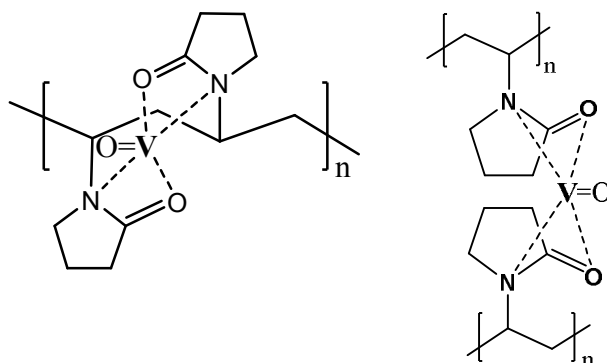
образом ванадий должен отличаться существенно большей стабильностью в условиях кислой среды желудка. С другой стороны, ванадилсодержащие металлополимерные комплексы на основе ПВП должны обладать относительно невысокими константами устойчивости, что является необходимым условием для дозированного высвобождения иона ванадила в ЖКТ.

Исследованию взаимодействия ПВП с переходными и, в частности, биогенными металлами в литературе уделено относительно небольшое внимание [11, 12]. Показано, что данный полимер образует стабильные макромолекулярные металлокомплексы с такими металлами как железо, кобальт, марганец, хром и медь.

Наличие в мономерном звене ПВП полярного лактамного кольца, которое можно представить в виде резонансных структур:



позволяет предположить, что взаимодействие металла с полимером может происходить за счет неподеленных пар атомов азота и кислорода кольца; в свою очередь, такого рода взаимодействие может происходить путем либо внутримолекулярной, либо межмолекулярной координации:



Синтез ванадийсодержащего МПК на основе ПВП (VO-ПВП) осуществляли путем хелатирования сульфата ванадила VOSO_4 в растворе полимера. Путем варьирования температуры и времени реакции было установлено, что оптимальными для получения МПК с максимальным содержанием ванадия являются температура 75-80 °C (рис. 2) и время проведения реакции 4 ч (рис. 2).

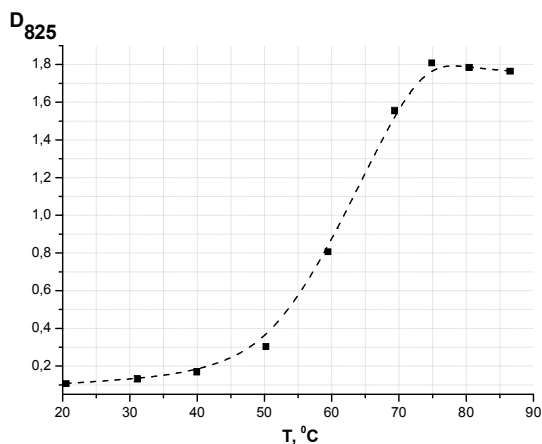


Рис. 1. Зависимость интенсивности поглощения МПК (D_{825}) от температуры синтеза

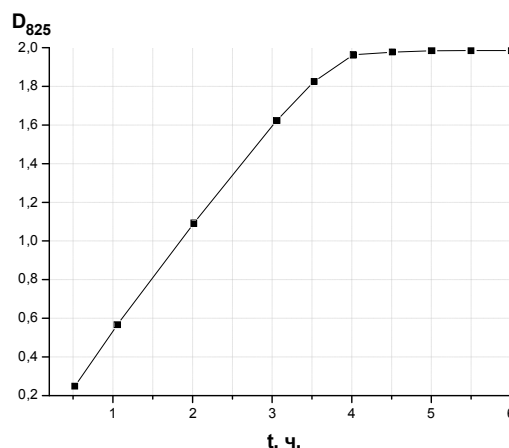


Рис. 2. Кинетика образования МПК

Из рис. 1 следует, что при варьировании температуры в диапазоне 20-50 °С наблюдается постепенное медленное нарастание концентрации МПК в растворе, а при увеличении температуры выше 50 °С наблюдается резкий подъем интенсивности поглощения комплекса вплоть до 74-75 °С. На кинетической кривой, изображенной на рис. 2, в интервале времени 0.5-4.0 ч наблюдается постепенное возрастание концентрации комплекса; дальнейшее увеличение времени синтеза практически не сказывается на его концентрации.

Полученный комплекс VO-ПВП был охарактеризован методами электронной спектроскопии (в УФ- и видимом диапазонах длин волн), инфракрасной спектроскопии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР ^1H).

В видимой области электронного спектра продукта (рис. 3) наблюдается ряд длинноволновых полос поглощения с $\lambda_{\text{max}} = 745$ нм (плечо), 825 нм, 903 нм (плечо), которые можно отнести к полосам переноса заряда «лиганд-металл», наличие нескольких полос может свидетельствовать о сосуществовании в растворе нескольких равновесных форм ванадила, отличающихся лигандным окружением.

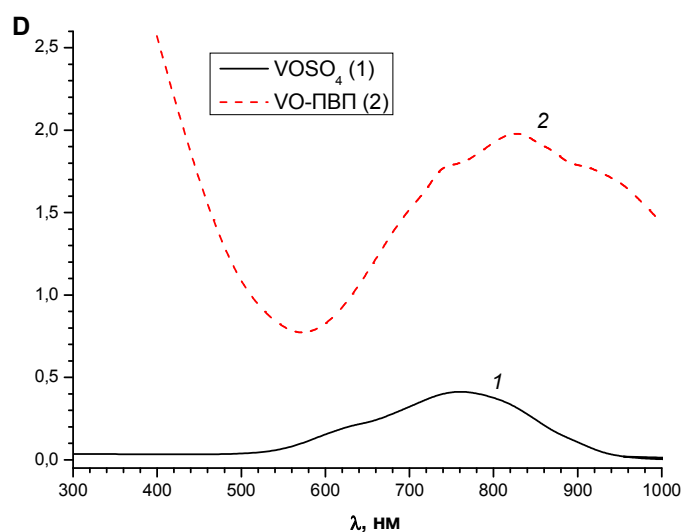


Рис. 3. Электронные спектры сульфата ванадила (1) и ванадийсодержащего МПК (2): зависимость оптической плотности (D) от длины волны (λ)

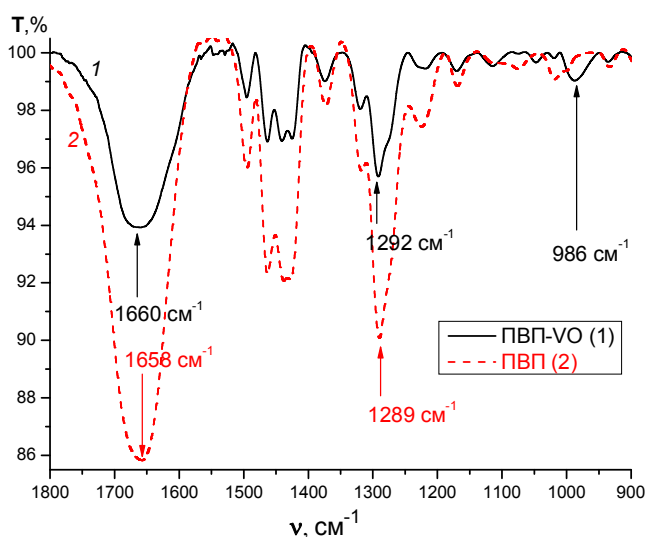


Рис. 4. ИК-спектры ванадийсодержащего МПК (1) и исходного ПВП (2): зависимость пропускания (T) от волнового числа (ν)

Обращает на себя внимание тот факт, что при переходе от спектров поглощения исходного сульфата ванадила к спектрам МПК наблюдается общий bathochromic сдвиг полос поглощения на 50-80 нм, сопровождаемый hyperchromic эффектом. Такое изменение в спектральной картине можно объяснить изменением лигандного окружения иона ванадила с заменой аква-лиганда в случае водного раствора сульфата ванадила на лактамный лиганд полимера в случае раствора МПК.

Изучение спектров поглощения в ИК области позволяет получить ценную информацию о структуре образующихся МПК.

Как следует из рис. 4, в ИК-спектре МПК наблюдается появление новой полосы, отсутствующей в исходном полимере, в области 986 см⁻¹, которая может быть отнесена к валентным колебаниям V=O связи. Наличие координационно связанного иона ванадила в МПК должно приводить к закономерному изменению положения полос колебаний связей тех функциональных групп лактамного кольца ПВП, которые принимают непосредственное участие в координационном взаимодействии. В первую очередь, такого рода изменения должны наблюдаться для полос колебаний C=O и C-N связей. Действительно, в спектре МПК полосы колебаний этих связей смещены в более высокочастотную область по сравнению с аналогичным спектром исходного полимера, а именно, полоса валентного колебания C=O связи смещена на 2 см⁻¹ и находится в области 1660 см⁻¹, а полоса деформационных колебаний C-N связи на 3 см⁻¹, располагаясь в районе 1689 см⁻¹.

Однако наибольшего смещения следовало ожидать для полосы валентных колебаний V=O связи. Действительно, в ИК-спектре МПК данная полоса наблюдается, как было отмечено ранее, в области 986 см⁻¹, в то время как аналогичная полоса колебаний в спектре

исходного сульфата ванадила расположена в районе 1004 см^{-1} , что соответствует смещению полосы на 18 см^{-1} .

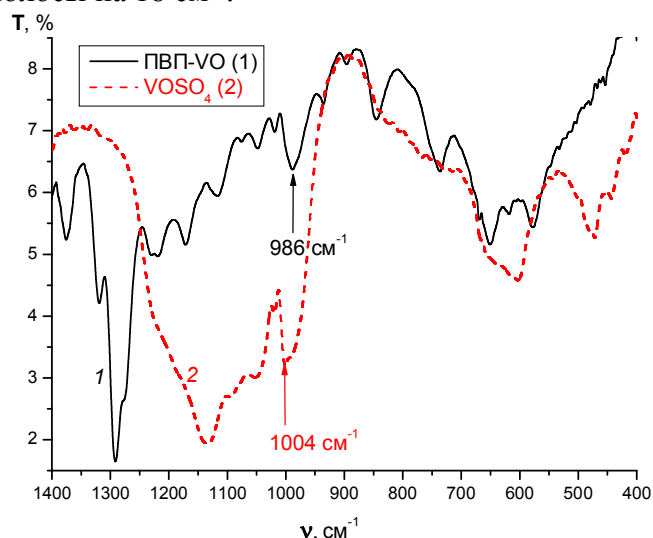


Рис. 5. ИК-спектры ванадийсодержащего МПК (1) и исходного сульфата ванадила (2): зависимость пропускания (Т) от волнового числа (ν)

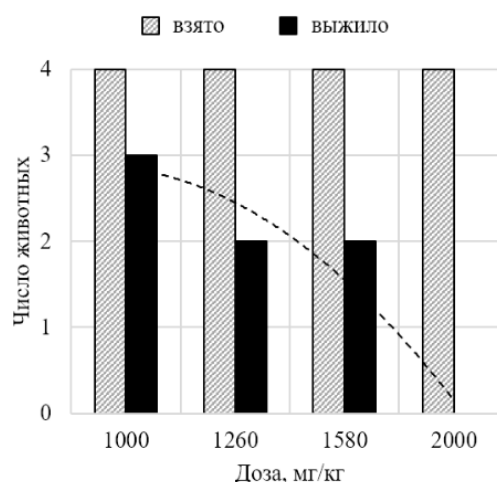


Рис. 6. Зависимость числа выживших особей от введенной дозы VO-ПВП

Такого рода изменения волновых чисел (частот) основных характеристичных колебаний связей в МПК могут свидетельствовать об изменении силовых постоянных данных связей, а следовательно, об участии металла в координационном взаимодействии с лактамным кольцом полимера за счет неподеленных электронных пар атомов азота и кислорода лактамного кольца.

Как и в случае большинства неорганических комплексов ванадила, полученный в данной работе МПК обладал парамагнитными свойствами, что затрудняло его анализ методом ЯМР-спектроскопии.

Содержание металла в комплексе определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (АЭС ИСП). Изменение условий синтеза позволяет получить комплексы с содержанием металла от 2.5 до 11 % (по массе).

С использованием экспресс-метода оценки острой пероральной токсичности В.Б. Прозоровского [10] было определено значение полулетальной дозы LD_{50} ; для комплекса VO-ПВП оно составило $1350 \pm 160\text{ мг/кг}$. Зависимость выживаемости мышей от введенной дозы исследуемого металлополимерного комплекса отражена на рис. 6.

Полученное значение LD_{50} позволяет отнести данный МПК к классу малотоксичных веществ по классификации Hodge и Sterner [13]. Многие ванадийсодержащие низкомолекулярные соединения, а также лекарственные препараты, широко используемые в настоящее время, являются намного более токсичными по сравнению с полученным МПК (таблица).

Таблица. Значения полулетальных доз LD_{50} комплекса VO-ПВП, некоторых биологически активных соединений ванадия и некоторых лекарственных веществ

Вещество	LD_{50}^* (мг/кг)	Источник
Гликлазид	3 000	[14]
Метформин	1 450	[14]
VO-ПВП	1350	—
Ванадила N-(гидроксифенилкарбамоилметил)иминодиацетат	1045	[15]
Ванадил-трегалоза	1000	[16]
Бис(мальтолато)оксованадий(IV)	902	[17]
Ванадила сульфат, $VOSO_4$	467	[18]
Натрия метаванадат, $NaVO_3$	74	[18]

*Значения приведены для мышей при пероральном введении веществ.

В свою очередь, меньшая токсичность при сохранении фармакологической активности позволяет предположить большую широту терапевтического действия, что является безусловным преимуществом для любого лекарственного средства.

Выводы

Получен новый водорастворимый полимерный комплекс ванадия на основе поли-*N*-винилпирролидона. Доказано его строение спектральными методами. Исследование острой пероральной токсичности на животных позволяет отнести данный комплекс к малотоксичным.

Литература

- [1] S.E. Kahn, M.E. Cooper, S. Del Prato. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. *The Lancet*. **2014**. Vol.383. No. 9922. P.1068-1083.
- [2] N.V. Kirillova, M.G. Mescheryakova, O.M. Spasenkova, I.A. Orekhova, V.I. Laryonova, and A.N. Voytovych. The state of the enzymatic antioxidant defense system in patients with diabetes mellitus type II. *Butlerov Communications*. **2015**. Vol.43. No.8. P.42-46.
- [3] A.J. Krentz, C.J. Bailey. Oral Antidiabetic Agents. *Drugs*. **2005**. Vol.65. No.3. P.385-411.
- [4] A. Chaudhury et al. Clinical review of antidiabetic drugs: Implications for type 2 diabetes mellitus management. *Frontiers in endocrinology*. **2017**. No.8. P.1-12.
- [5] K.H. Thompson, J.H. McNeill, C. Orvig. Vanadium Compounds as Insulin Mimics. *Chem. Rev.* **1999**. Vol.99. No.9. P.2561-2572.
- [6] N.F. Belayeva, V.K. Gorodetskii, A.I. Tochilkin, M.A. Golubev, N.V. Semenova, I.R. Kovelman. Vanadium compounds as a new class of therapeutical agents for treatment of diabetes mellitus. *Voprosy meditsinskoi khimii*. **2000**. Vol.46. No.4. P.344-360.
- [7] A.B. Goldfine, M.E. Patti, L. Zuberi, B.J. Goldstein, R. LeBlanc, E.J. Landaker, Z.Y. Jiang, G.R. Willsky, C.R. Kahn. Metabolic effects of vanadyl sulfate in humans with non-insulin-dependent diabetes mellitus: in vivo and in vitro studies. *Metabolism*. **2000**. Vol.49. P.400-10.
- [8] M.W. Makinen, M. Salehitazangi. The structural basis of action of vanadyl (VO²⁺) chelates in cells. *Coordination chemistry reviews*. **2014**. Vol.279. P.1-22.
- [9] D.C. Crans et al. Developing Vanadium as an Antidiabetic or Anticancer Drug: A Clinical and Historical Perspective. *Essential Metals in Medicine: Therapeutic Use and Toxicity of Metal Ions in the Clinic*. **2019**. Vol.19. P.203-230.
- [10] V.B. Prozorovsky et al. Express-method of determining median effective dose and its errors. *Farmakologiya i toksikologiya*. **1978**. Vol.41. No. 4. P. 497-502.
- [11] M. Liu, X. Yan, H. Liu, W. Yu. An investigation of the interaction between polyvinylpyrrolidone and metal cations. *Reactive and Functional Polymers*. **2000**. Vol.44. P.55-64.
- [12] K.V. Anasuya, M.K. Veeraiah, P. Hemalatha. Synthesis and characterisation of poly (vinylpyrrolidone)–Copper (II). *Research Journal of Chemical Sciences*. **2015**. Vol.5. P.64-69.
- [13] H.C. Hodge, J.H. Sterner. Tabulation of toxicity classes. *American Industrial Hygiene Association Quarterly*. **1949**. Vol.10. No.4. P.93-96.
- [14] DrugBank [Электронный ресурс]. URL: <https://www.drugbank.ca>
- [15] Wang N. et al. Synthesis, characterization and anti-diabetic therapeutic potential of novel aminophenol-derivatized nitrilotriacetic acid vanadyl complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*. **2015**. Vol.152. P.104-113.
- [16] Jiang P. et al. Acute toxicity, twenty-eight days repeated dose toxicity and genotoxicity of vanadyl trehalose in kunming mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **2017**. Vol.85. P.86-97.
- [17] Y.B. Wei, X.D. Yang. Synthesis, characterization and anti-diabetic therapeutic potential of a new benzyl acid-derivatized kojic acid vanadyl complex. *Biometals*. **2012**. Vol.25. No.6. P.1261-1268.
- [18] V.K. Gorodetskii, A.I. Tochilkin, N.F. Belayeva, I.R. Kovelman, B.F. Korovkin. Synthesis and hypoglycemic activity of bis(L-malato)oxovanadium(IV). *Biomeditsinskaya khimiya*. **2011**. Vol.57. No.1. P.133-137.

In the English version of this article, the Reference Object Identifier – ROI: jbc-02/19-59-7-24

Thematic direction: Insulin-mimetic macromolecular poly-*N*-vinylpyrrolidone-based vanadium metallocomplexes. Part 1.

Synthesis of macromolecular vanadium metallocomplex and its acute oral toxicity evaluation

© Alexey G. Ivanov,^{1,3*+} Veronika A. Prikhodko,¹ Veronika A. Mukhina,¹
Natalia A. Anisimova,² and Nadezhda V. Kirillova¹

¹ Department of Biochemistry. Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University.
Prof. Popov St., 14. Saint Petersburg, 197376. Russia. Phone: +7 (812) 499-39-00, ext. 2452.

E-mail: alexey.ivanov@bk.ru

² Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology. Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University. Prof. Popov St., 14. Saint Petersburg, 197376. Russia. Phone: +7 (812) 499-39-00, ext. 4090.

³ Analytical Laboratory. Institute of Macromolecular Compounds of Russian Academy of Sciences.
Bolshoy Prospekt, 31. Vasilievsky Island. Saint Petersburg, 199004. Russia. Phone: +7 (812) 328-68-95.

*Supervising author; +Corresponding author

Keywords: diabetes mellitus, antidiabetic drugs, vanadium metal-polymer complexes, acute oral toxicity.

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a severe chronic disease affecting virtually all kinds of metabolic processes in the human body. As incidence and prevalence of DM are increasing worldwide, WHO estimates the number of people living with diabetes to be as high as half a billion and still rising. Long-term health complications of DM, such as diabetic nephropathy, retinopathy, neuropathy, and cardiovascular pathology, although preventable in most cases, are known to be severe, potentially life-threatening and often irreversible, which makes the search for new effective antidiabetic drugs a research priority and one of the most pressing issues in health care today.

To date, the insulin-mimetic properties of vanadium compounds have been the subject of quite a significant number of studies. *In vivo* experiments have shown that vanadium, acting in an insulin-like fashion, takes part in the regulation of glucose and lipid metabolism. In particular, vanadium stimulates glucose uptake and metabolism in insulin target tissues, increases the intensity of glycogen and lipid biosynthesis, and inhibits that of gluconeogenesis, glycogenolysis, and lipolysis. Organic vanadium complexes are known to be less toxic than its inorganic salts, which are characterized by a number of potentially serious adverse effects, mainly but not exclusively on the central nervous system and the kidneys; in addition to lower toxicity, organic vanadium compounds have been found to have higher bioavailability when compared to those of inorganic nature. Such observations clearly hold promise for the development of an entirely novel therapeutic class of antidiabetic drugs.

The aims of this study are to obtain new polymeric vanadyl(VO^{2+}) derivatives based on poly-*N*-vinylpyrrolidone (PVP) that would exert hypoglycemic effect *in vivo*, and to explore the possibilities of using such compounds or formulations derived thereof for type 2 DM prophylaxis and/or treatment. This work gives a method of obtaining and isolation of an oxovanadium(IV)-polymer metallocomplex, and describes the structural features of said compound, confirmed experimentally. The results of the acute oral toxicity study revealed that the newly synthesized compound is of low toxicity, having a median lethal dose (LD_{50}) that is at a level well above those typical of inorganic vanadium salts.