



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Фармацевтический факультет

Кафедра фармакологии и клинической фармакологии
Кафедра биохимии

ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ РАБОТА
по специальности 33.05.01 Фармация
на тему:

СИНТЕЗ И ОЦЕНКА ПРОТИВОДИАБЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ МЕТАЛЛОПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ВАНАДИЯ

Руководители работы:

доцент кафедры фармакологии
и клинической фармакологии, к. б. н., доцент **Анисимова Н. А.**,
доцент кафедры биохимии, к. х. н. **Иванов А. Г.**

Автор исследовательской работы:

студент 5 курса 343 группы **Приходько В. А.**

Санкт-Петербург

2019

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ ВАНАДИЯ

Наблюдаемый эффект	<i>in vitro</i>	<i>ex vivo</i>	<i>in vivo</i>	Источники
Гипогликемический	+	+	+	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
Гиполипидемический		+	+	9, 10, 11, 12, 13
Панкреатопротективный			+	4
Кардиопротективный			+	16
Антиоксидантный	+			11, 14, 24
Гипотензивный			+	12
Противоопухолевый	+		+	15, 17, 18, 21, 22
Иммуномодулирующий		+		19
Лейшманицидный	+			19, 20
Антитрипаносомный	+			23
Антибактериальный	+			15, 24
Противогрибковый	+			15

ВЛИЯНИЕ ВАНАДИЯ НА УГЛЕВОДНЫЙ И ЛИПИДНЫЙ ОБМЕН

Механизмы действия <i>in vitro</i>	Биологические эффекты <i>in vivo</i>	Источники
✓ Ингибирование фосфатаз, инактивирующих β-субъединицу инсулинового рецептора: • протеинтирозинфосфатаза 1B • Т-клеточная протеинтирозинфосфатаза • Src-гомологичная фосфатаза-1 • гемопоэтическая протеинтирозинфосфатаза • протеинтирозинфосфатаза MEG2 • щелочная фосфатаза	Гипогликемический эффект: • стимуляция захвата глюкозы клетками • активация гликолиза и гликогеногенеза • ингибирование глюконеогенеза* и гликогенолиза Гиполипидемический эффект: • угнетение гидролиза ТАГ и высвобождения свободных ВЖК • угнетение гидролиза эфиров холестерина и его высвобождения	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8
		1, 2, 3
		1, 2, 3
		2
		3
		8
✓ Ингибирование участников адреналинового и глюкагонового сигнальных путей: • протеинкиназа А		5
▲ Активация участников инозитолфосфатного сигнального пути: • протеинкиназа В		5

* ингибирование глюконеогенеза происходит вследствие фосфорилирования и инактивации фактора транскрипции **FoxO1**, что приводит к снижению экспрессии генов, кодирующих некоторые ферменты, участвующие в этом процессе (фосфоенолпируваткарбоксикиназы, глюкозо-6-фосфатазы)

ЦЕЛЬ РАБОТЫ:

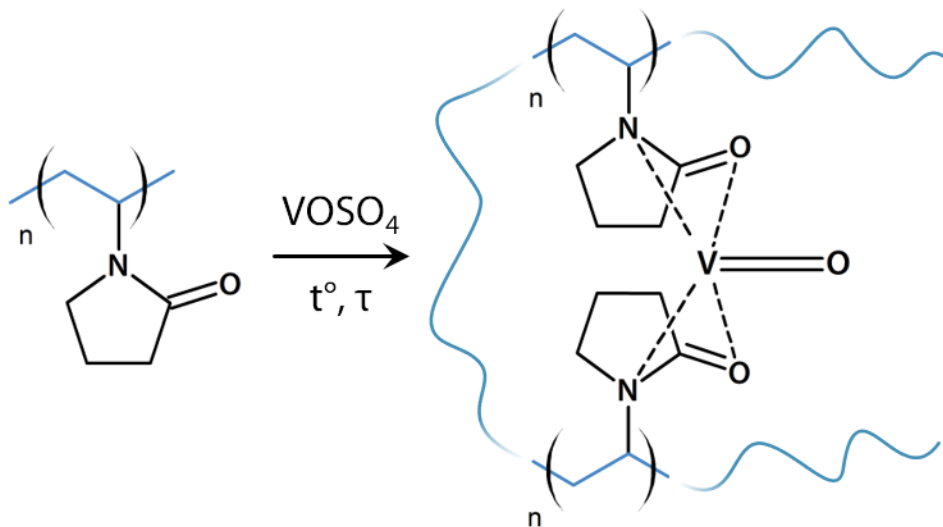
- ♦ **получение новых металлополимерных комплексов ванадия и изучение их фармакологических свойств.**

ЗАДАЧИ РАБОТЫ:

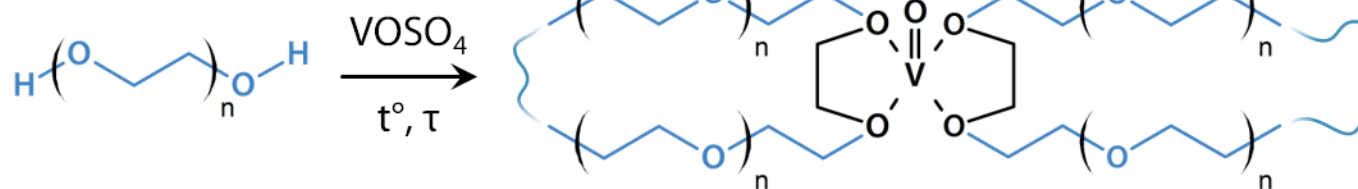
- ♦ **синтез и подтверждение структуры** металлополимерных комплексов ванадия на основе поли(N-винил-2-пирролидона) и полиэтиленгликоля;
- ♦ **оценка острой пероральной токсичности** полученных соединений;
- ♦ **изучение влияния полученных комплексов на показатели углеводного и липидного обмена** в условиях стрептозотоцинового сахарного диабета II типа с предшествующим периодом высокожировой диеты:
 - ♦ масса тела;
 - ♦ концентрация глюкозы в крови;
 - ♦ концентрация глюкозы в моче;
 - ♦ суточный диурез;
 - ♦ общий холестерин сыворотки крови;
 - ♦ триацилглицериды сыворотки крови.

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ

Комплексы ванадия на основе ПВП (**VO-ПВП**, 1) и ПЭГ (**VO-ПЭГ**, 2) получали путем хелатирования ванадила сульфата VOSO_4 в растворах ПВП ($M_r = 35$ кДа) и ПЭГ ($M_r = 30$ кДа) соответственно в течение 4-х часов при температуре 70°C . Очистку продуктов осуществляли путем диализа.



1. Получение комплекса VO-ПВП

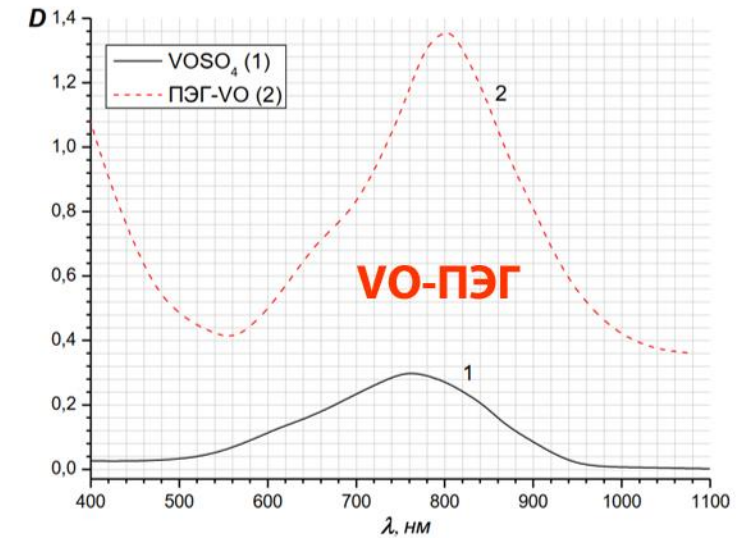
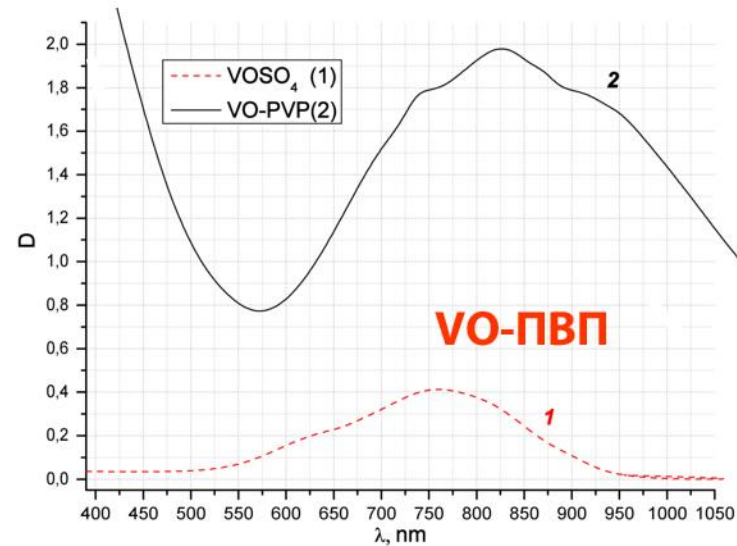


2. Получение комплекса VO-ПЭГ

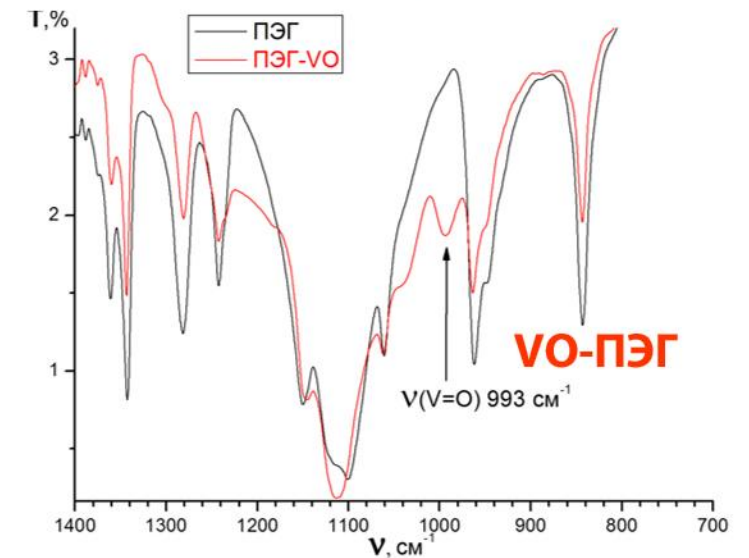
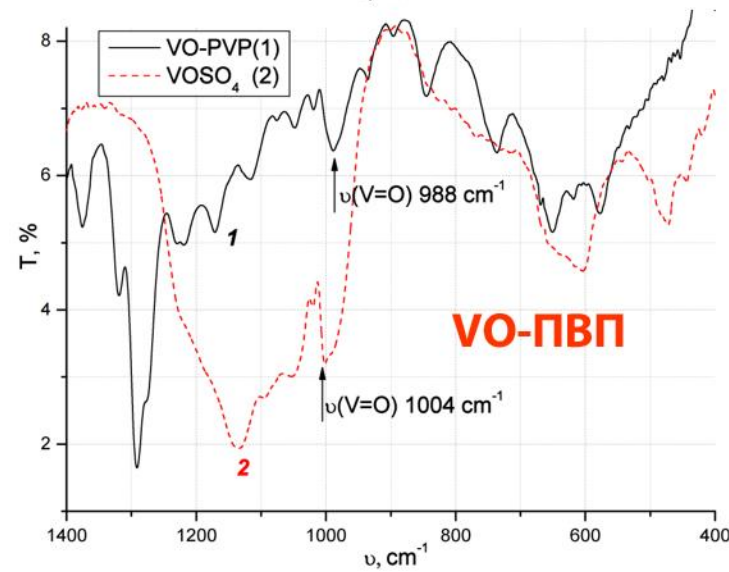
По данным атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (АЭС-ИСП), **содержание ванадия** в образцах, взятых в эксперимент *in vivo*, составило **7.2% (w/w)** в VO-ПВП и **10.4% (w/w)** в VO-ПЭГ.

РЕЗУЛЬТАТЫ СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА

◆ УФ-спектроскопия:



◆ ИК-спектроскопия:

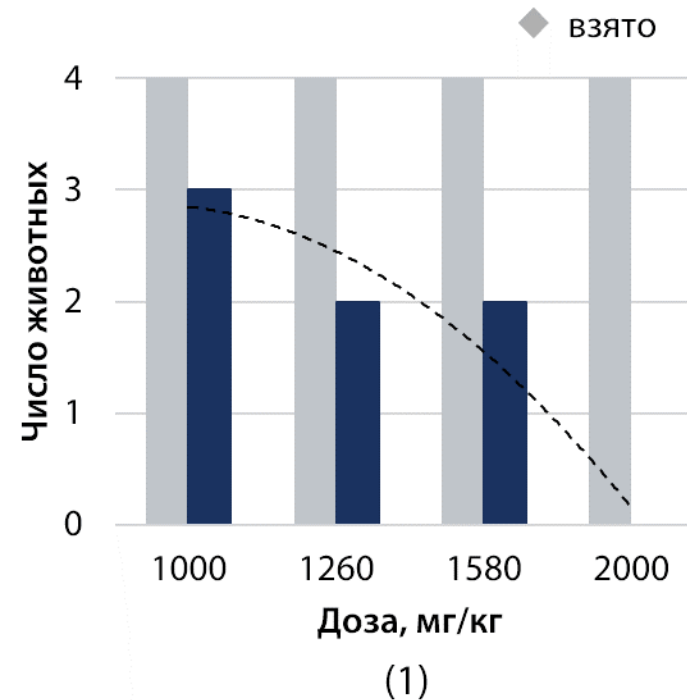


ОЦЕНКА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРИ ПРИЕМЕ ВНУТРЬ

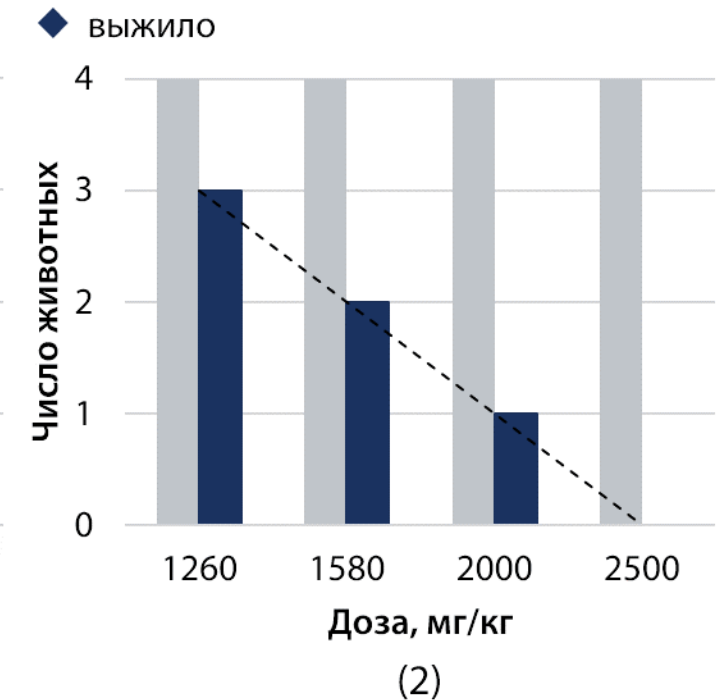
Зависимость выживаемости мышей от введенной дозы VO-ПВП (1) и VO-ПЭГ (2):

Острую токсичность изучали на 16-ти белых мышах массой 18-29 г, которые содержались в стандартных условиях вивария. Животных распределяли в экспериментальные группы по 4 особи случайно. Соединения VO-ПВП и VO-ПЭГ в виде свежеприготовленных водных растворов вводились однократно натошак внутрижелудочно с использованием зонда. Каждое соединение испытывали в 4-х дозах, расположенных по логарифмической шкале с интервалом 0,1.

Число летальных исходов в группах фиксировалось через 48 ч. Значения медианной летальной дозы (LD_{50}) и абсолютной погрешности измерения определялись по методу В. Б. Прозоровского^{25, 26}.



LD_{50} VO-ПВП = **1350 ± 160** мг/кг

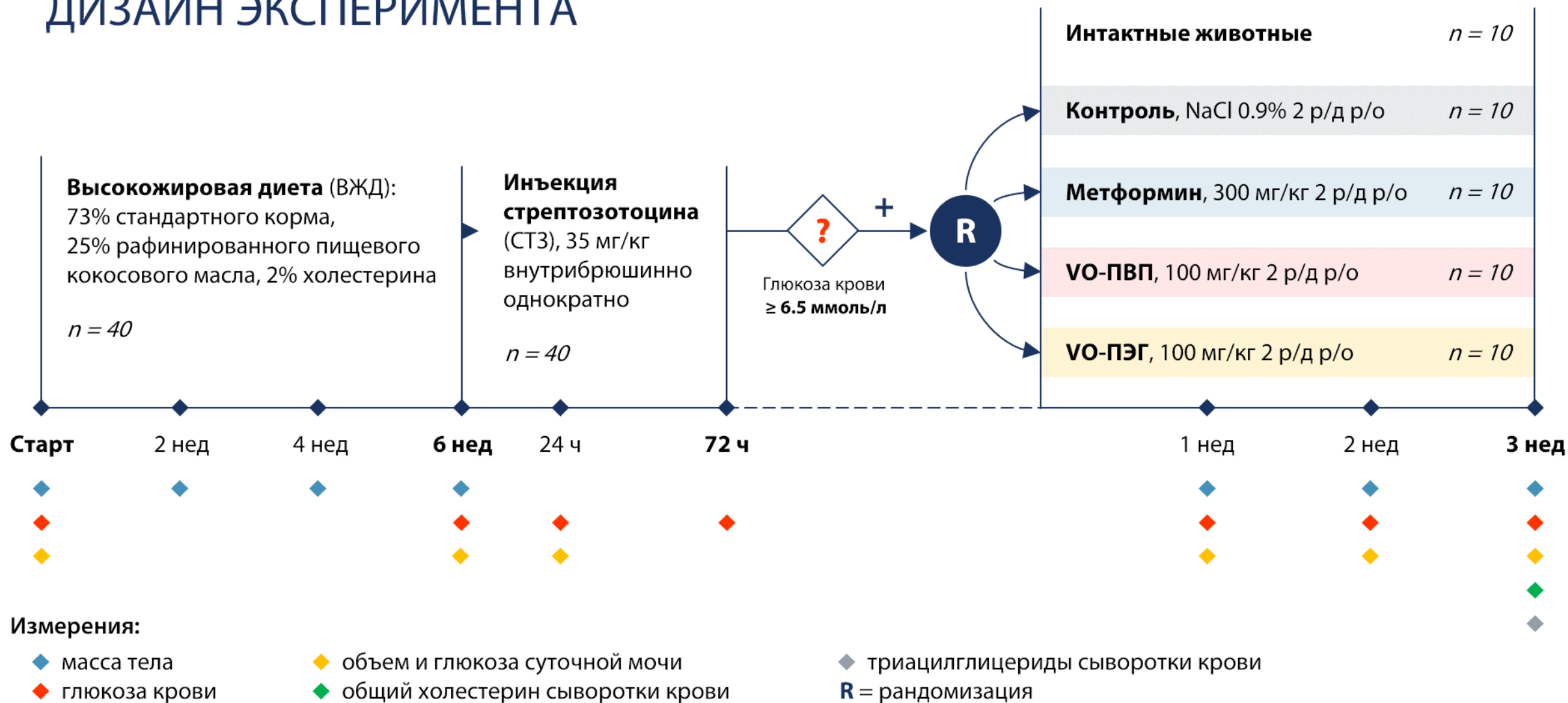


LD_{50} VO-ПЭГ = **1600 ± 180** мг/кг

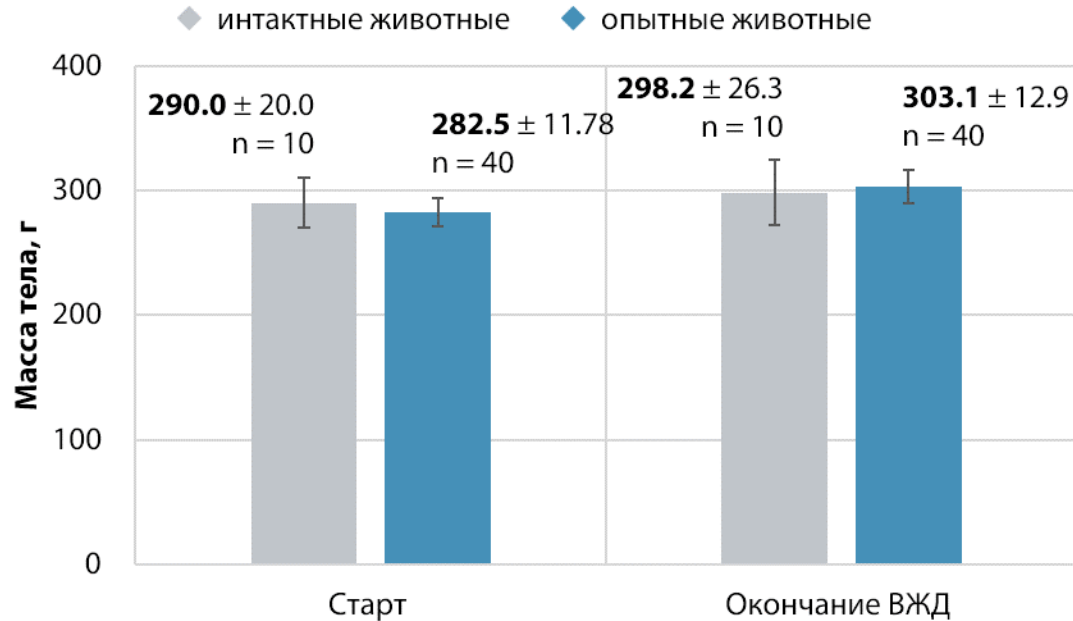
²⁵ – Прозоровский В. Б. Практическое пособие по ускоренному определению средних эффективных доз и концентрации биологически активных веществ //С. Пб., 1992.–42 с. – 1992.

²⁶ – Прозоровский В. Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований //Психофармакология и биологическая наркология. – 2007. – Т. 7. – №. 3-4.

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ: ДИЗАЙН ЭКСПЕРИМЕНТА

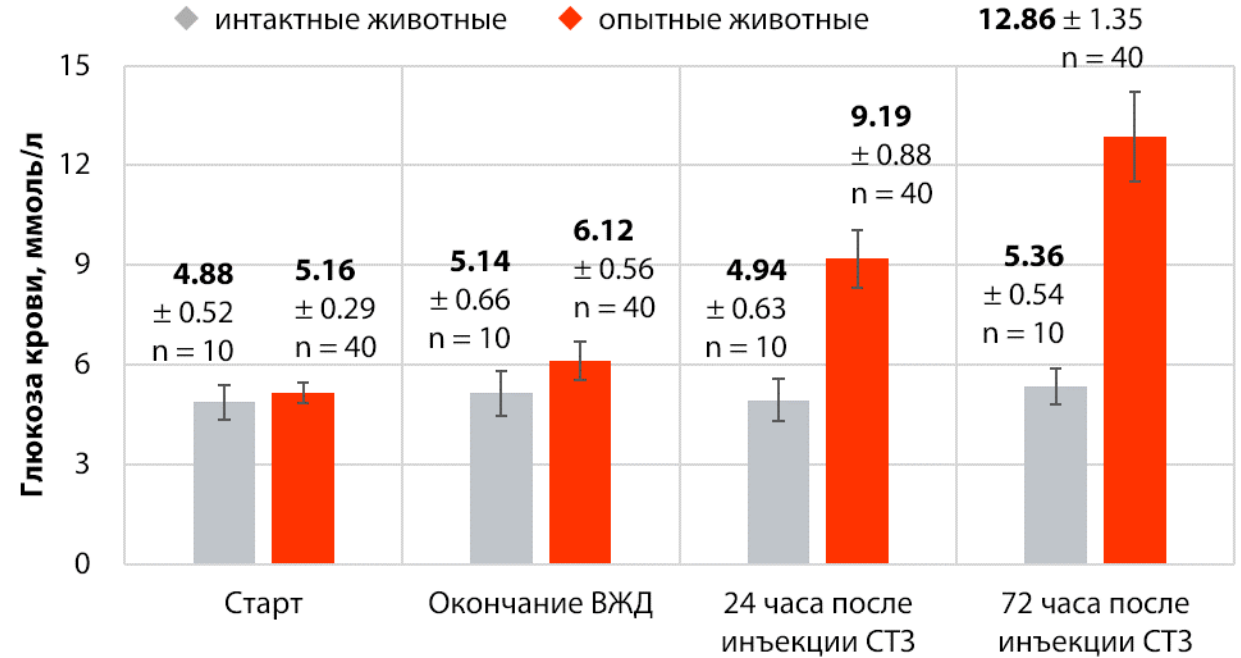


МОДЕЛИРОВАНИЕ СД II ТИПА (1)



А. Динамика массы тела:

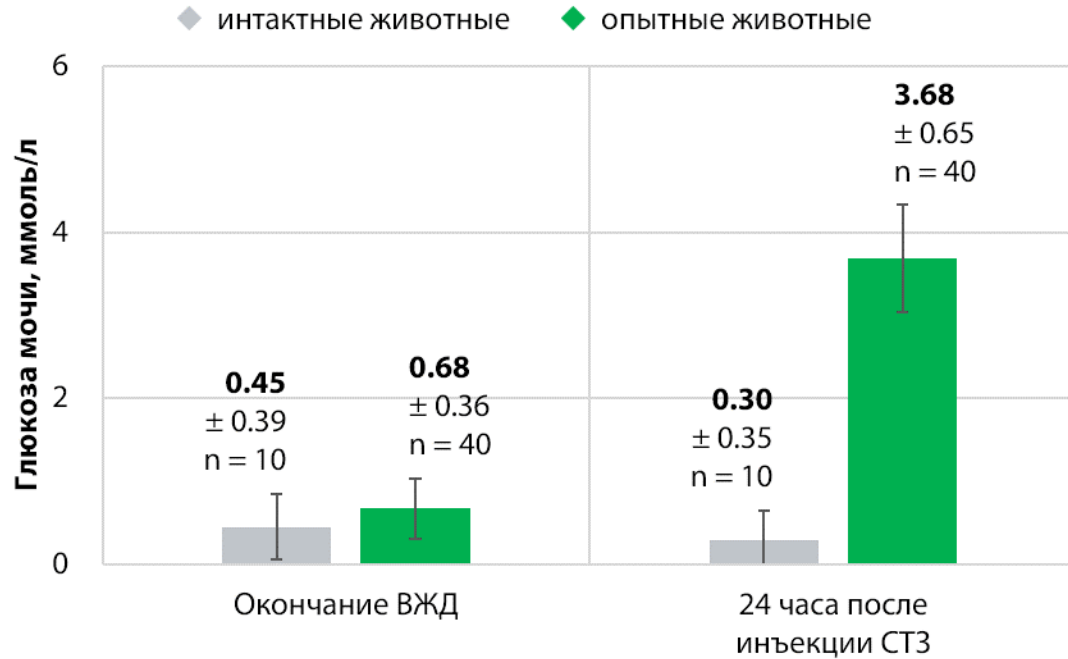
- ◆ прирост на фоне ВЖД: **+7.29%** ($p < 0.05$)



В. Динамика гликемии:

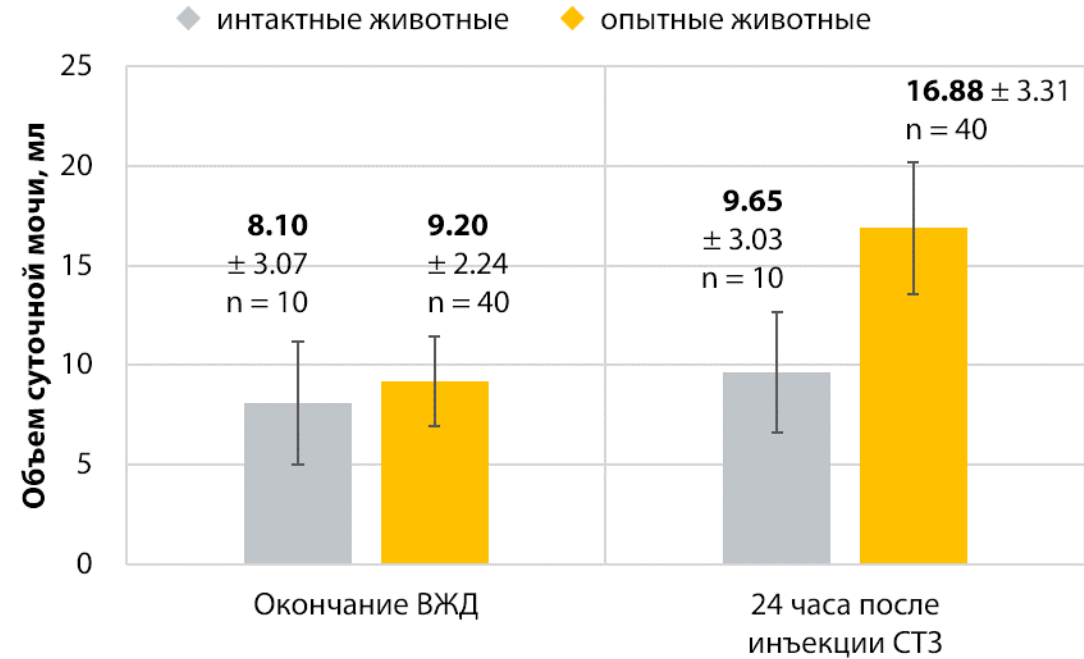
- ◆ прирост на фоне ВЖД: **+18.6%** ($p > 0.05$)
- ◆ прирост в результате инъекции СТЗ:
 - через 24 ч: **+50.1%** ($p < 0.01$)
 - через 72 ч: **+110.1%** ($p < 0.01$)

МОДЕЛИРОВАНИЕ СД II ТИПА (2)



С. Динамика глюкозурии:

- ◆ прирост в результате инъекции СТЗ:
 - через 24 ч: **+441.2%** ($p < 0.01$)

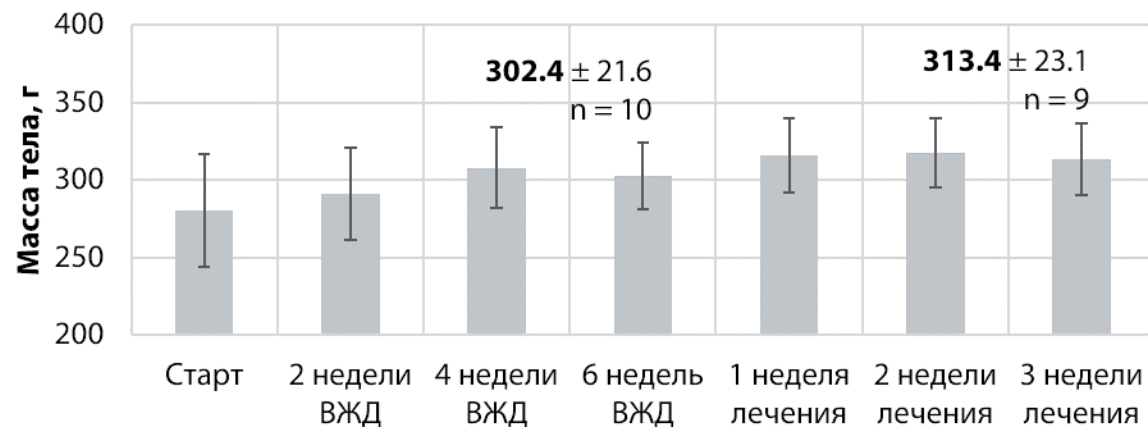


Д. Динамика диуреза:

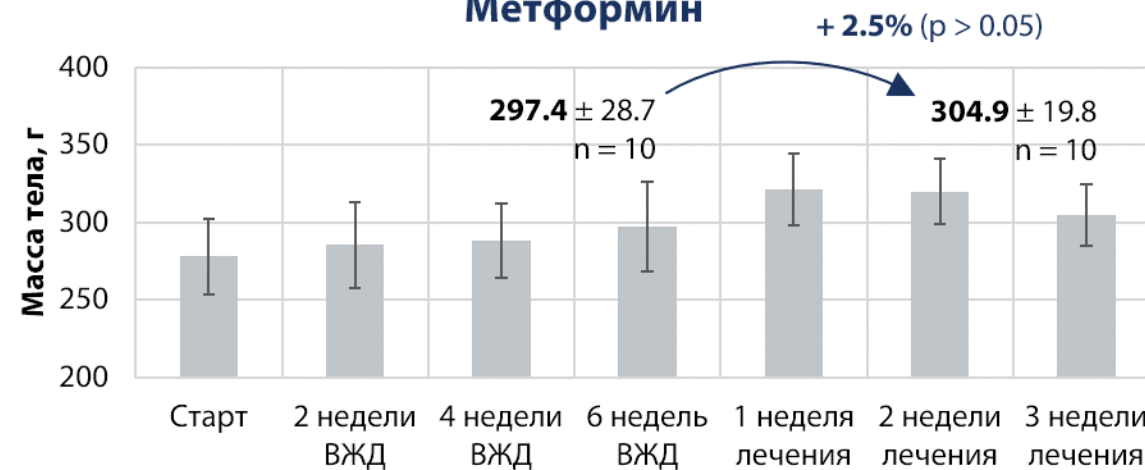
- ◆ прирост в результате инъекции СТЗ:
 - через 24 ч: **+83.5%** ($p < 0.05$)

РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ: МАССА ТЕЛА

Контроль

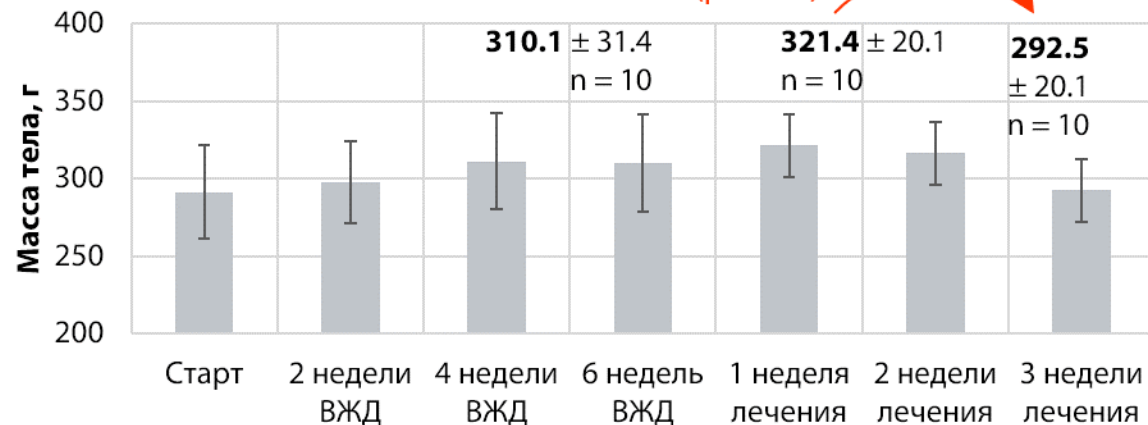


Метформин



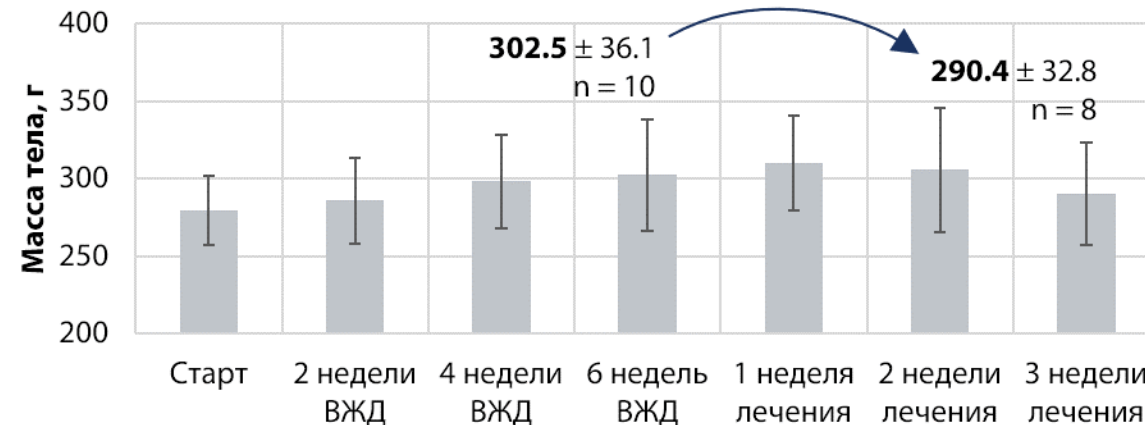
VO-ПВП

- 9.0%
(p < 0.05)



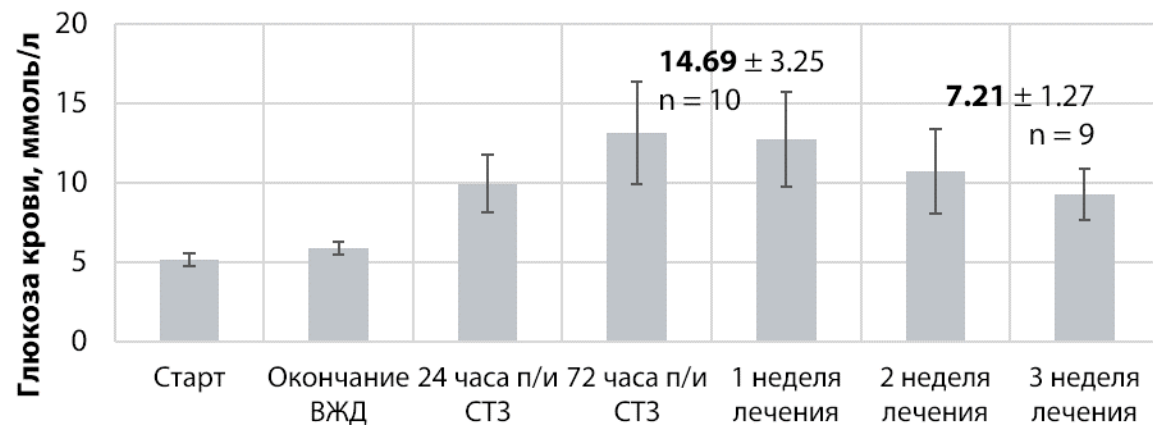
VO-ПЭГ

- 4.0% (p > 0.05)

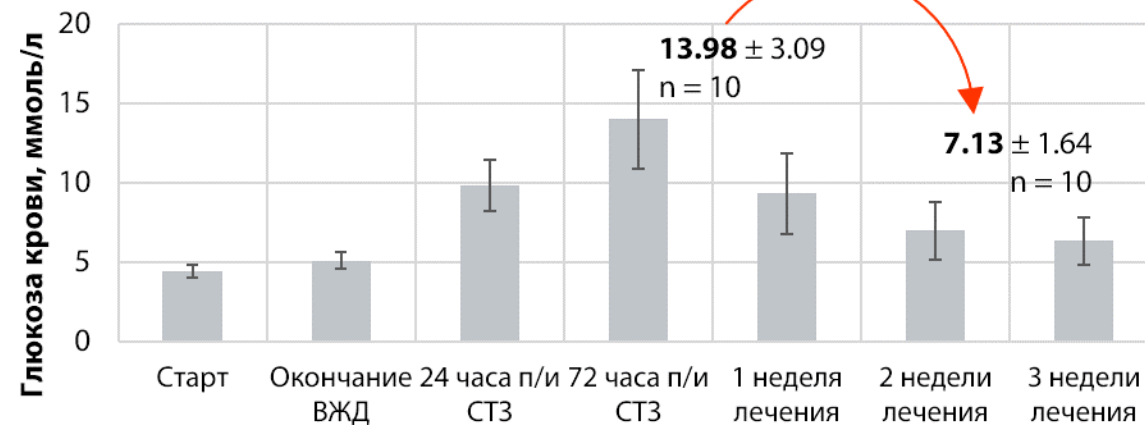


РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ: ГЛИКЕМИЯ

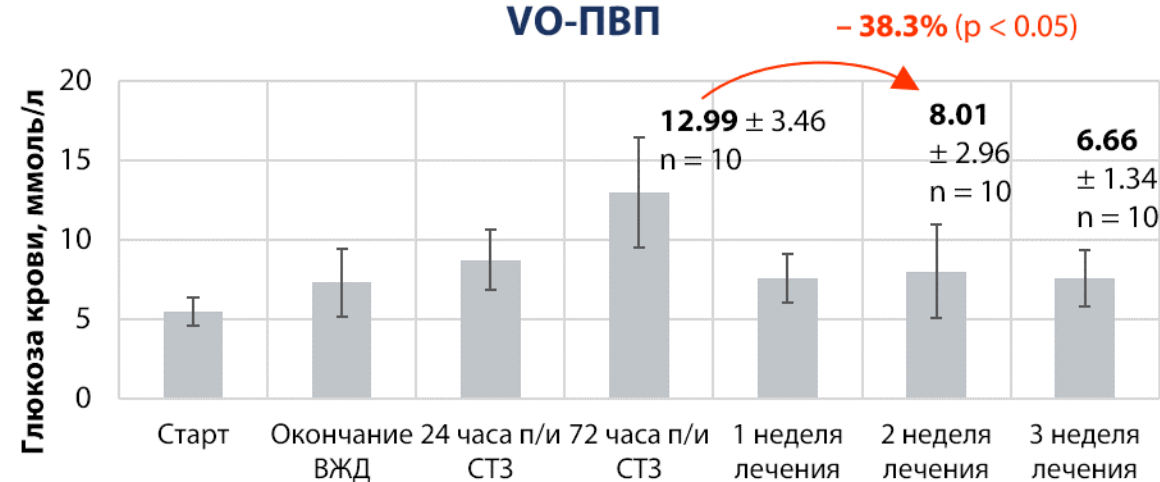
Контроль



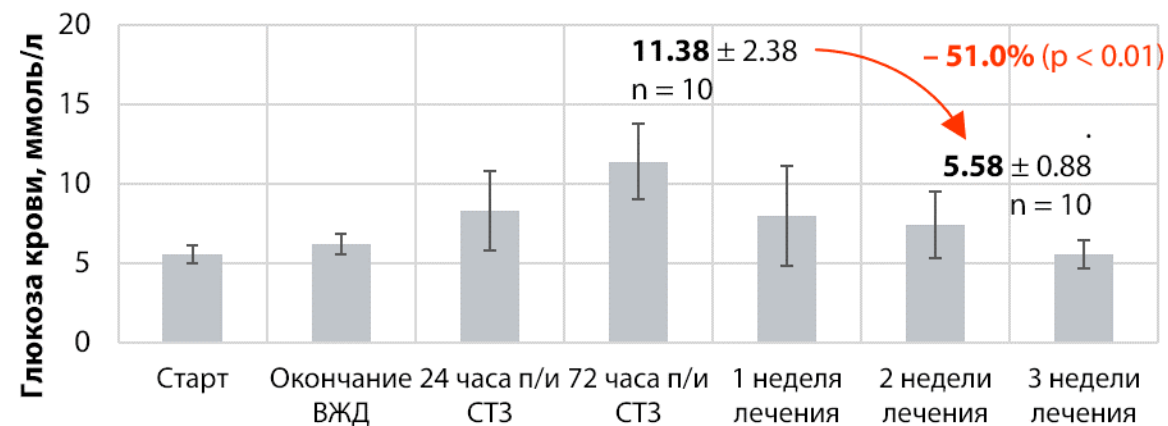
Метформин



VO-ПВП

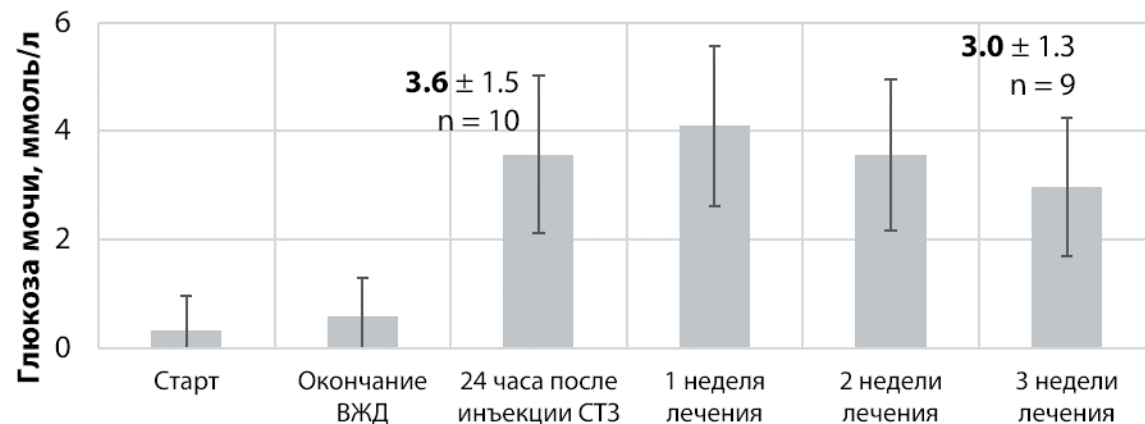


VO-ПЭГ

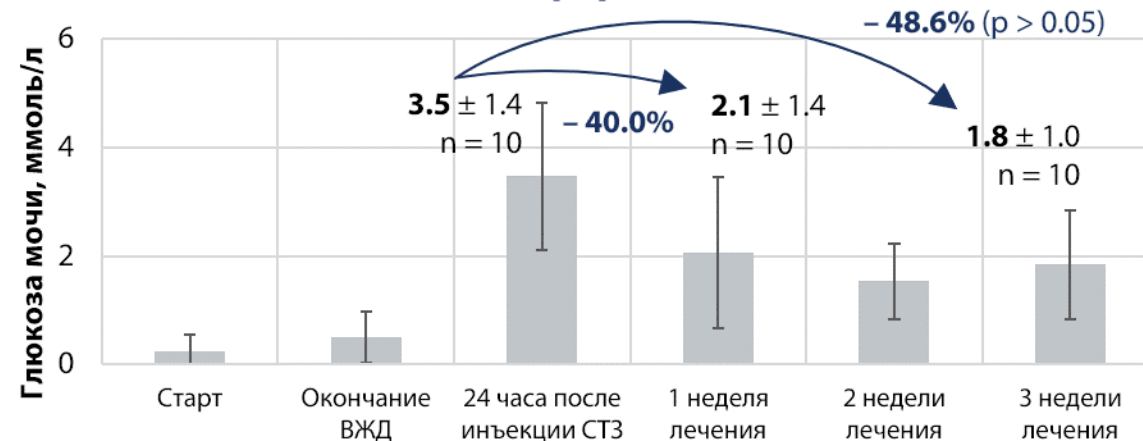


РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ: ГЛЮКОЗУРИЯ

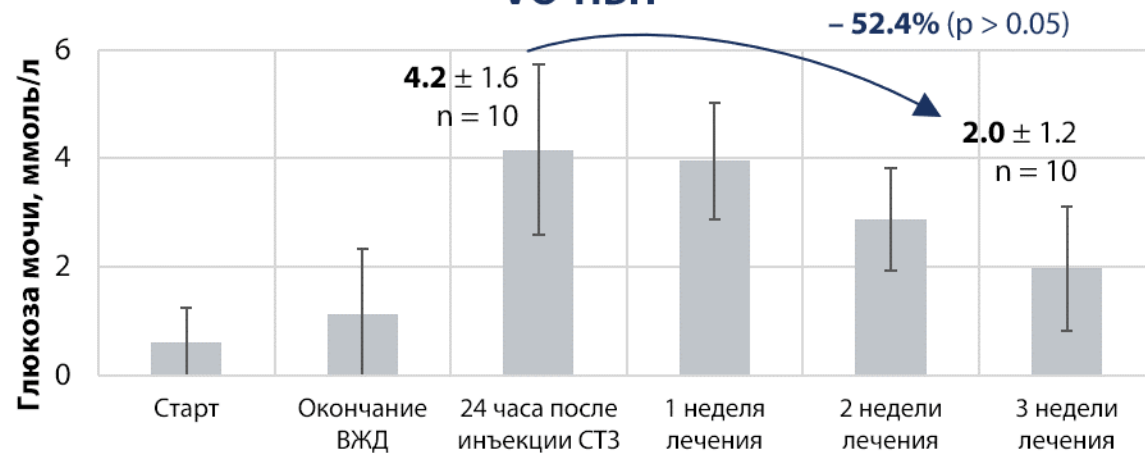
Контроль



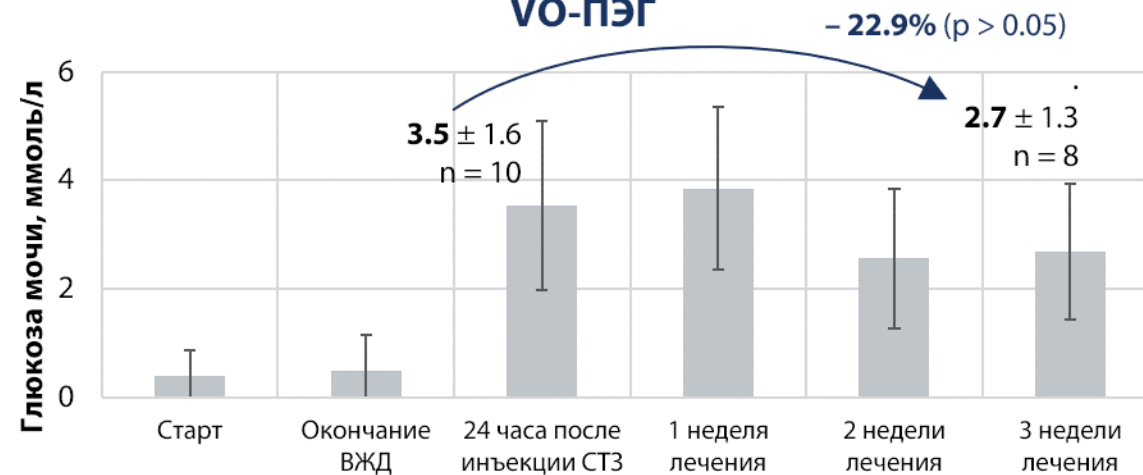
Метформин



VO-ПВП

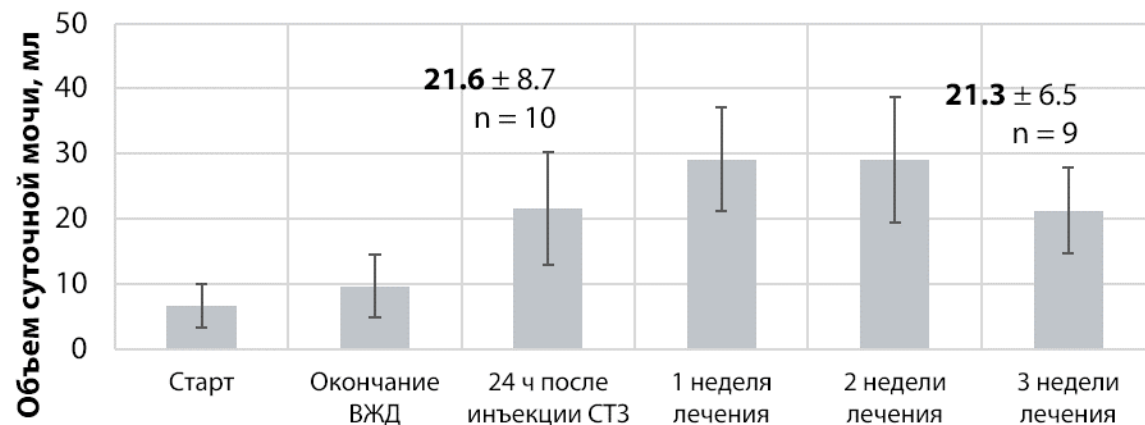


VO-ПЭГ

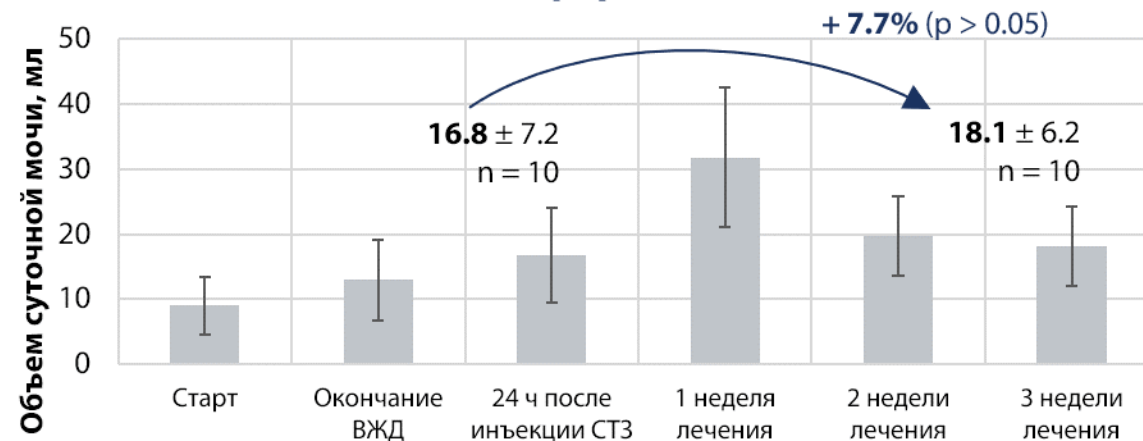


РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ: ДИУРЕЗ

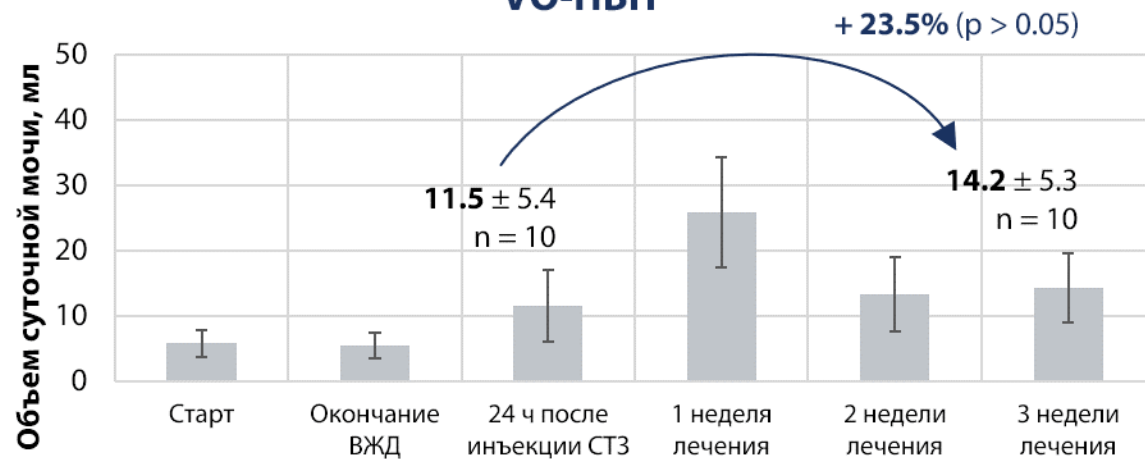
Контроль



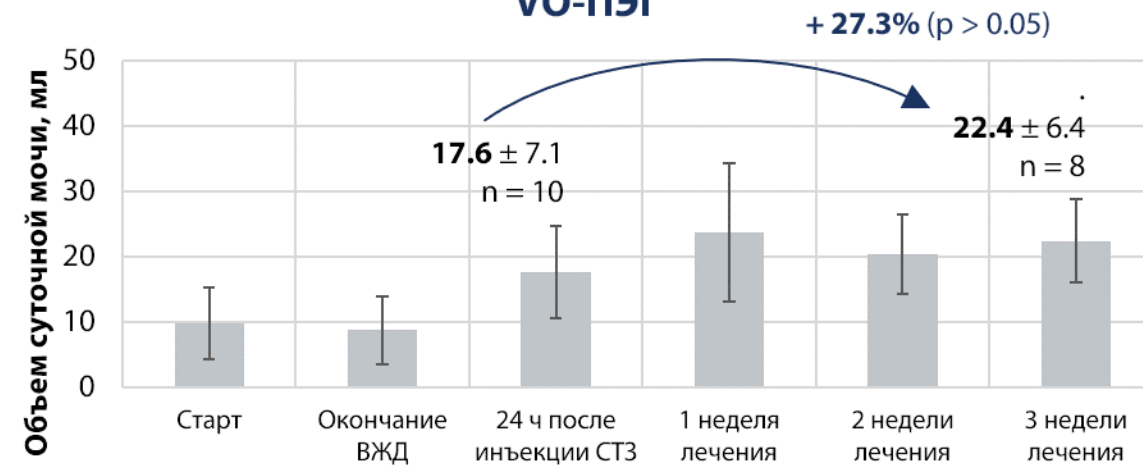
Метформин



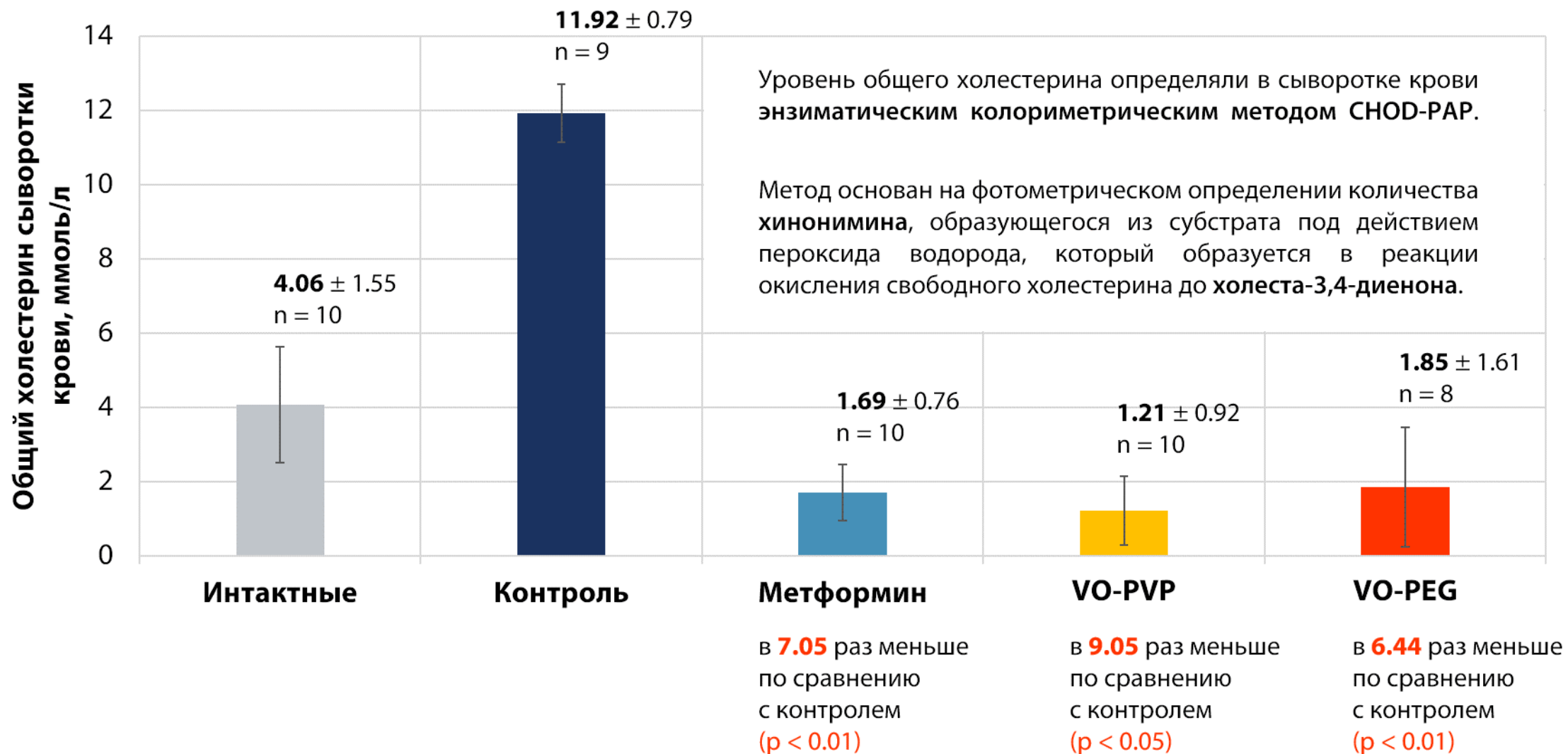
VO-ПВП



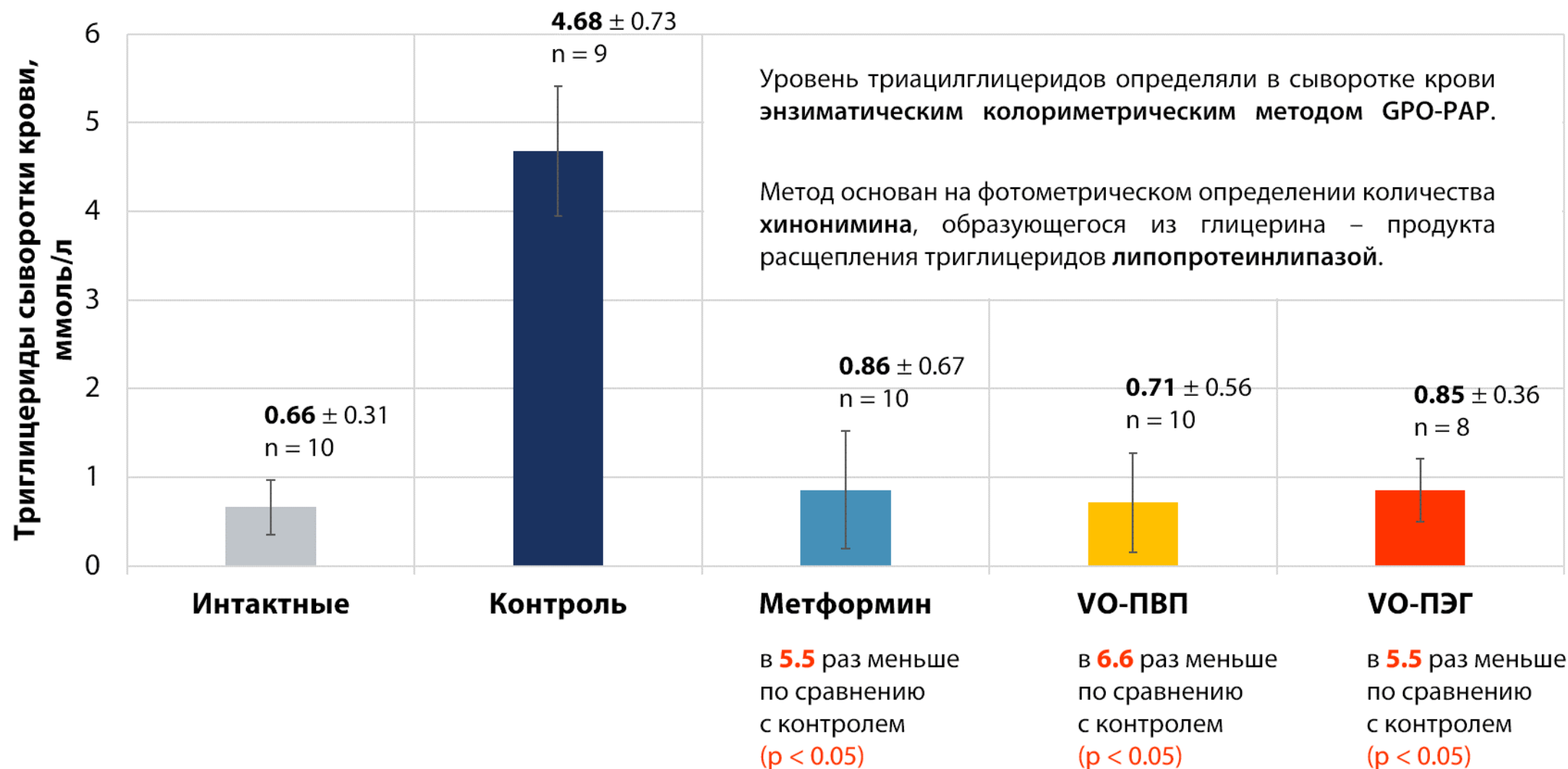
VO-ПЭГ



РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ: ХОЛЕСТЕРИНЕМИЯ



РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ: ТРИГЛИЦЕРИДЕМИЯ



ВЫВОДЫ

1. Проведен синтез и исследована структура **металлополимерных комплексов ванадия** на основе поли(N-винил-2-пирролидона) (**VO-ПВП**) и полиэтиленгликоля (**VO-ПЭГ**);
2. Проведена оценка острой пероральной токсичности полученных соединений. Имея медианные летальные дозы LD_{50} , равные соответственно 1350 ± 160 мг/мг и 1600 ± 180 мг/кг, соединения **VO-ПВП** и **VO-ПЭГ** являются **малотоксичными**;
3. Поставлена экспериментальная модель **сахарного диабета II типа**, сочетающая использование диабетогенного агента стрептозотоцина и высокожировой диеты;
4. Изучено влияние полученных соединений ванадия на показатели углеводного обмена (концентрации глюкозы в крови и моче, суточный диурез) в сравнении с метформином. Установлено, что **гипогликемическая активность** комплексов VO-ПВП и VO-ПЭГ по выраженности сопоставима с таковой метформина;
5. Изучено влияние новых комплексов ванадия на показатели липидного обмена – концентрации общего холестерина и триацилглицеридов сыворотки крови. Соединения VO-ПВП и VO-ПЭГ демонстрируют выраженные **гипохолестеринемический и гипотриглицеридемический эффекты**, не уступая в этом метформину.

**СПАСИБО
ЗА ВНИМАНИЕ!**

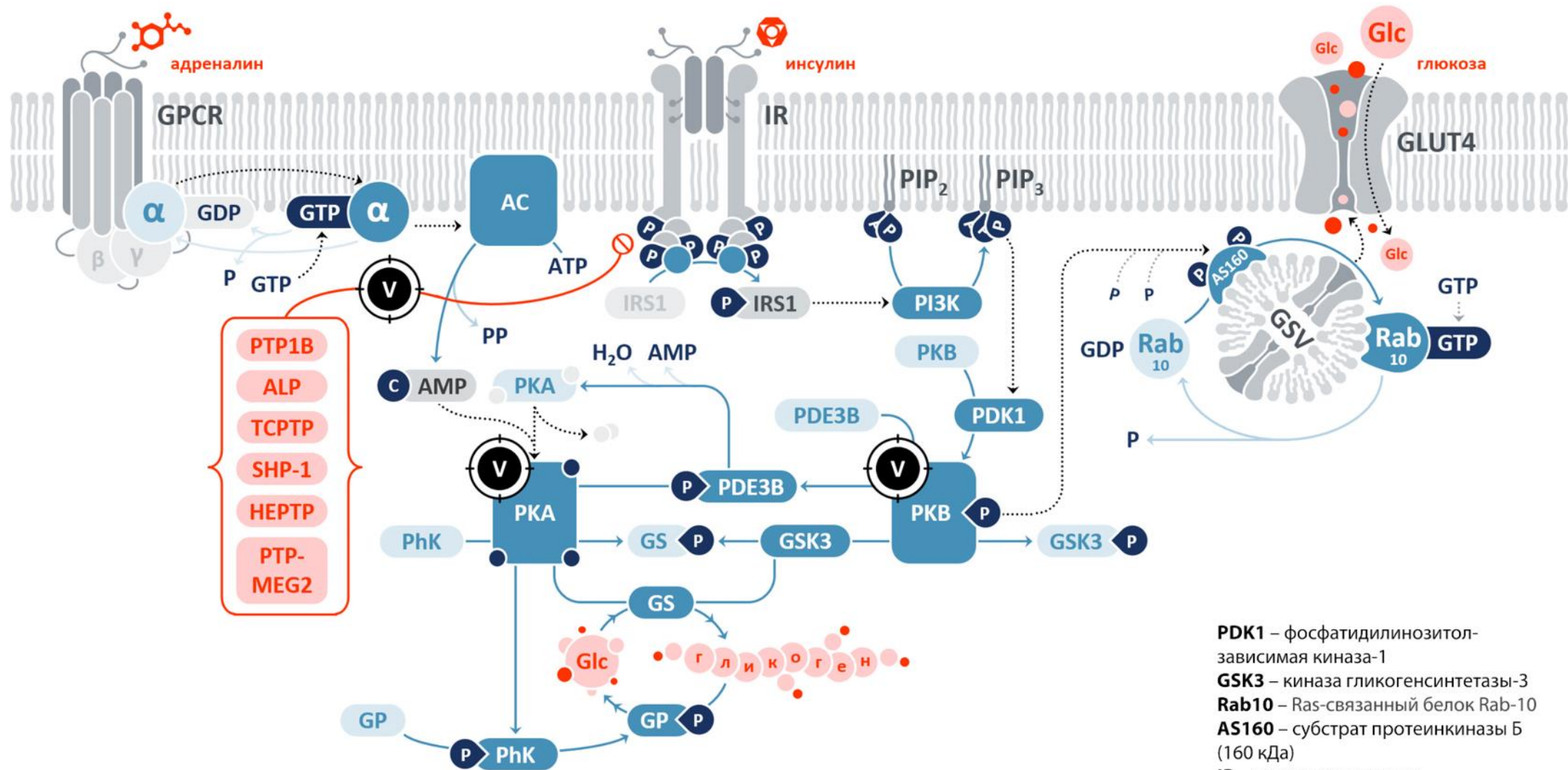


ИСТОЧНИКИ

- 1** – Yuan C. et al. Ternary oxovanadium (IV) complexes of ONO-donor Schiff base and polypyridyl derivatives as protein tyrosine phosphatase inhibitors: synthesis, characterization, and biological activities //JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry. – 2009. – Т. 14. – №. 6. – С. 841-851.
- 2** – Lu L. et al. Inhibition protein tyrosine phosphatases by an oxovanadium glutamate complex, $\text{Na}_2[\text{VO}(\text{Glu})_2(\text{CH}_3\text{OH})]$ (Glu= glutamate) //Biometals. – 2010. – Т. 23. – №. 6. – С. 1139-1147.
- 3** – Han H. et al. Synthesis and evaluation of oxovanadium (IV) complexes of Schiff-base condensates from 5-substituted-2-hydroxybenzaldehyde and 2-substituted-benzenamine as selective inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B //Dalton Transactions. – 2012. – Т. 41. – №. 36. – С. 11116-11124.
- 4** – Duan L. et al. A novel PTP1b inhibitor vanadium-flavone complex: synthesis and pharmacodynamic evaluation in streptozotocin-induced diabetic mice //Medicinal Chemistry Research. – 2017. – Т. 26. – №. 9. – С. 1863-1870.
- 5** – Hiromura M., Sakurai H. Action Mechanism of Insulin-Mimetic Vanadyl–Allixin Complex //Chemistry & biodiversity. – 2008. – Т. 5. – №. 8. – С. 1615-1621.
- 6** – Liu Y. et al. Ameliorative effect of vanadyl (IV)–ascorbate complex on high-fat high-sucrose diet-induced hyperglycemia, insulin resistance, and oxidative stress in mice //Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology. – 2015. – Т. 32. – С. 155-161.
- 7** – Zuo Y. Q. et al. Bis (α -furancarboxylato) oxovanadium (IV) prevents and improves dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes //Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2008. – Т. 60. – №. 10. – С. 1335-1340.
- 8** – Li M. et al. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B and alkaline phosphatase by bis (maltolato) oxovanadium (IV) //Journal of inorganic biochemistry. – 2008. – Т. 102. – №. 10. – С. 1846-1853.
- 9** – Katoh A. et al. Synthesis of new vanadyl complexes of hydroxyazine-type heterocycles and their insulin-mimetic activities //Chemistry Letters. – 2000. – Т. 29. – №. 8. – С. 866-867.
- 10** – Wang N. et al. Synthesis, characterization and anti-diabetic therapeutic potential of novel aminophenol-derivatized nitrilotriacetic acid vanadyl complexes //Journal of inorganic biochemistry. – 2015. – Т. 152. – С. 104-113.
- 11** – El-Megharbel S. M., Hamza R. Z., Refat M. S. Synthesis, spectroscopic, structural and thermal characterizations of vanadyl (IV) adenine complex prospective as antidiabetic drug agent //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2015. – Т. 135. – С. 850-864.
- 12** – Majithiya J. B. et al. Effect of bis [curcumino] oxovanadium complex on non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats //Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2005. – Т. 18. – №. 3. – С. 211-217.
- 13** – Saha T. K. et al. A new type of orally active insulin-mimetic vanadyl-porphyrin complex: meso-Tetrakis ({4-sulfonatophenyl} porphyrinato) oxovanadium (IV) //Chemistry letters. – 2005. – Т. 34. – №. 10. – С. 1350-1351.
- 14** – Koyuturk M. et al. Effects of vanadyl sulfate on liver of streptozotocin-induced diabetic rats //Biological trace element research. – 2005. – Т. 104. – №. 3. – С. 233-247.
- 15** – Abdel-Rahman L. H. et al. Three novel Ni (II), VO (II) and Cr (III) mononuclear complexes encompassing potentially tridentate imine ligand: Synthesis, structural characterization, DNA interaction, antimicrobial evaluation and anticancer activity //Applied Organometallic Chemistry. – 2017. – Т. 31. – №. 11. – С. e3750.

ИСТОЧНИКИ

- 16** – Yuen V. G. et al. Improvement in cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats following chronic oral administration of bis (maltolato) oxovanadium (IV) //Canadian journal of physiology and pharmacology. – 1993. – Т. 71. – №. 3-4. – С. 270-276.
- 17** – Naso L. G. et al. Antioxidant, DNA cleavage, and cellular effects of silibinin and a new oxovanadium (IV)/silibinin complex //JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry. – 2011. – Т. 16. – №. 4. – С. 653-668.
- 18** – Ferrer E. G. et al. Synthesis, characterization, antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl (IV) complexes //JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry. – 2006. – Т. 11. – №. 6. – С. 791-801.
- 19** – Noleto G. R. et al. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl (IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity //Molecular and cellular biochemistry. – 2002. – Т. 233. – №. 1-2. – С. 73-83.
- 20** – do Amaral A. E. et al. Leishmanicidal activity of polysaccharides and their oxovanadium (IV/V) complexes //European journal of medicinal chemistry. – 2015. – Т. 90. – С. 732-741.
- 21** – Rozzo C. et al. Antitumoral effect of vanadium compounds in malignant melanoma cell lines //Journal of inorganic biochemistry. – 2017. – Т. 174. – С. 14-24.
- 22** – Narla R. K. et al. In vivo antitumor activity of bis (4, 7-dimethyl-1, 10-phenanthroline) sulfatooxovanadium (IV){METVAN [VO (SO₄)(Me₂-Phen) 2]} //Clinical cancer research. – 2001. – Т. 7. – №. 7. – С. 2124-2133.
- 23** – Scalese G. et al. Expanding the family of heteroleptic oxido vanadium (IV) compounds with salicylaldehyde semicarbazones and polypyridyl ligands showing anti-Trypanosoma cruzi activity //Journal of inorganic biochemistry. – 2015. – Т. 147. – С. 116-125.
- 24** – Refat M. S., El-Shazly S. A. Identification of a new anti-diabetic agent by combining VOSO₄ and vitamin E in a single molecule: studies on its spectral, thermal and pharmacological properties //European Journal of Medicinal Chemistry. – 2010. – Т. 45. – №. 7. – С. 3070-3079.
- 25** – Прозоровский В. Б. Практическое пособие по ускоренному определению средних эффективных доз и концентрации биологически активных веществ //С. Пб., 1992.–42 с. – 1992.
- 26** – Прозоровский В. Б. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований //Психофармакология и биологическая наркология. – 2007. – Т. 7. – №. 3-4.

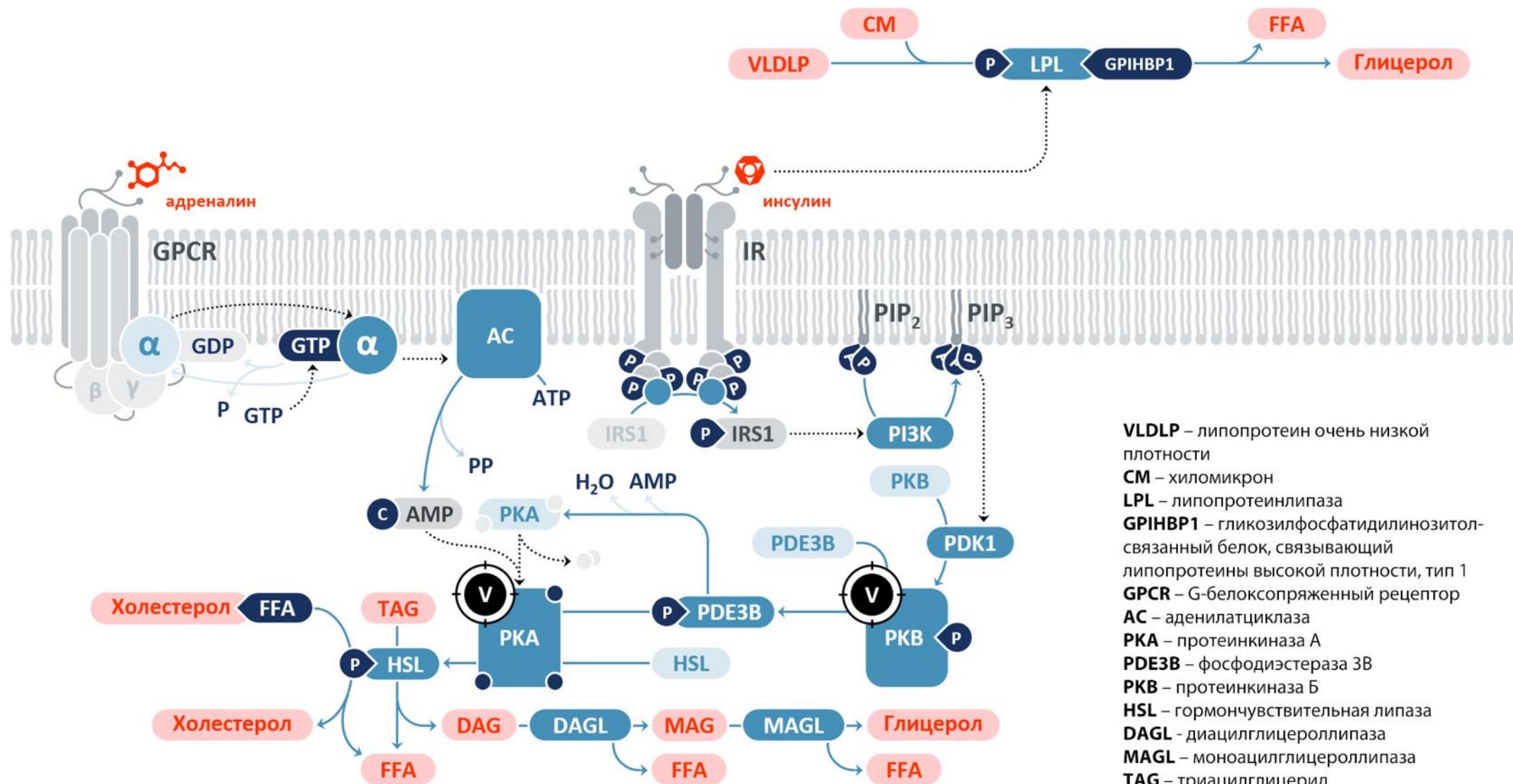


PTP1B – протеинтирозинфосфатаза 1B
ALP – щелочная фосфатаза
TCPTP – T-клеточная протеинтирозинфосфатаза
SHP-1 – Src-гомологичная фосфатаза-1
HEPTP – гемопоэтическая протеинтирозинфосфатаза
PTP-MEG2 – протеинтирозинфосфатаза MEG2

AC – аденилатциклаза
PKA – протеинкиназа A
PKB – протеинкиназа B
GS – гликогенсинтетаза
PKB – протеинкиназа B
GS – гликогенсинтетаза

GPCR – G-белоксопряженный рецептор
PDE3B – фосфодиэстераза 3B
GSK3 – киназа гликогенсинтетазы-3
PhK – киназа гликогенфосфорилазы
GP – гликогенфосфорилаза
PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа

PDK1 – фосфатидилинозитол-зависимая киназа-1
GSK3 – киназа гликогенсинтетазы-3
Rab10 – Ras-связанный белок Rab-10
AS160 – субстрат протеинкиназы B (160 кДа)
IR – рецептор инсулина
IRS – субстрат рецептора инсулина
GLUT4 – глюкозный транспортер-4
GSV – везикула, запасющая GLUT4
PIP₂ – фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат
PIP₃ – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат



VLDLP – липопротеин очень низкой плотности

CM – хиломикрон

LPL – липопротеинлипаза

GPIHBP1 – гликозилфосфатидилинозитол-связанный белок, связывающий липопротеины высокой плотности, тип 1

GPCR – G-белоксопряженный рецептор

AC – аденилатциклаза

PKA – протеинкиназа А

PDE3B – фосфодиэстераза 3В

PKB – протеинкиназа Б

HSL – гормончувствительная липаза

DAGL – диацилглицероллипаза

MAGL – моноацилглицероллипаза

TAG – триацилглицерид

DAG – диацилглицерид

MAG – моноацилглицерид

FFA – свободная высшая жирная кислота

V – ванадий