

УДК 547.458.88:513.71

МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСЫ ПРОТИВОАНЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИГЛИКАНОВ КИСЛОЙ ПРИРОДЫ**С.Т. Минзанова, В.Ф. Миронов, Л.Г. Миронова, Е.В. Чекунов, В.А. Милуков***ИОФХ им. А.Е. Арбузова, Казань, Россия*

Использование природных соединений в качестве основы лекарств – перспективный путь создания новых фармацевтических препаратов и новых лекарственных форм, особенно методами биотехнологии. Вследствие алиментарного дефицита железа даже в развитых странах среди детей младшей возрастной группы и женщин детородного возраста распространена анемия [1]. По данным Всемирной Организации здравоохранения (ВОЗ), последнее десятилетие характеризуется значительным ростом хронических и инфекционных заболеваний, в том числе таких социально значимых, как онкологические заболевания, почечная недостаточность, ВИЧ-инфекция, туберкулез. Как правило, анемия сопровождает данные заболевания [2]. Железодефицитная анемия возникает при недостаточном поступлении или плохой усвояемости железа, что наблюдается при заболеваниях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), а также при кровопотерях. «Злостная» анемия возникает как при недостатке микроэлемента железа, так и при недостатке ионов кобальта и меди.

Применяемые в настоящее время лекарственные препараты содержат преимущественно неорганические соединения металлов-микроэлементов, которые могут оказывать раздражающее воздействие на слизистую ЖКТ, проявлять токсические эффекты и вызывать системные нарушения при превышении дозировок [3]. В связи с поиском путей создания новых эффективных нетоксичных лекарственных средств внимание ученых привлекают процессы комплексообразования полисахаридов с макро- и микроэлементами. Обзор литературы демонстрирует широкий спектр биологической активности пектиновых полисахаридов и их химически модифицированных производных [4]. Комплексообразование с пектиновыми полисахаридами повышает терапевтическую и иммунологическую активность, снижает токсичность лекарственных препаратов [5]. Кроме того, пектиновые полисахариды позволяют решить проблему адресной доставки макро- и микроэлементов в кишечник, где происходит их всасывание, снижая ulcerогенный побочный эффект на ЖКТ.

В качестве противоанемического средства авторами работы [6] предложены полигалактуронаты железа, полученные на основе нестандартизованного пектина Grinstead XSS 100 со степенью метилирования 59.4 %. Для получения железо-полигалактуронатов пектин предварительно подвергали деметилированию в щелочной среде при действии раствора NaOH, далее к полигалактуронату натрия добавляли сульфат железа (II). Методом мессбауэровской спектроскопии изучена зависимость соотношения Fe(II)/Fe(III) в целевом продукте от условий получения. Установлено, что с повышением значений pH значительно возрастает доля Fe(III). Исследованиями (in vitro) японских авторов [7, 8] показано более выраженное повышение гемоглобина у крыс, получавших пектат железа, по сравнению с животными, получавшими в эквивалентных дозах неорганическое двухвалентное железо.

Практическую значимость имеют доклинические исследования лекарственного средства на основе синтезированного нами натрий-, кальций-, железополигалактуроната (ПГNaCaFe) для лечения анемии, проведенные нами в рамках мероприятия «Доклинические исследования инновационных лекарственных средств» федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу». Полученные результаты доклинических испытаний подтверждают нетоксичность и эффективность Na-, Fe-, Ca-полигалактуроната для лечения железодефицитной анемии. Показано выраженное гемопоэз- и иммуностимулирующее действие ПГNaCaFe [9, 10], сопоставимое и даже превосходящее эффективность известного противоанемического лекарственного препарата Тотема.

Настоящая работа посвящена созданию высокоэффективных биодоступных противоанемических препаратов на основе пектиновых полисахаридов, а именно получению новых полиметаллокомплексов железа, меди и кобальта – металлов, выполняющих **ключевую** роль в функции кроветворения, при их различных соотношениях с учетом физиологической потребности, перспективных для лечения как железодефицитной, так и «злостной» анемии».

Новизной обладает предлагаемый подход к синтезу целевых продуктов, обеспечивающий получение водорастворимых (биодоступных) комплексов пектиновых полисахаридов с биогенными макро- и микроэлементами. Известно, что пектовая (неметоксилированная полигалактуроновая) кислота не растворяется в воде, что и обуславливает необходимость их перевода в растворимые в воде пектаты или полигалактуронаты натрия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методика синтеза. На основе цитрусового пектина (Herbstreith&Fox, Германия) на первом этапе проводился синтез полигалактуроната натрия. Для этого пектин подвергали щелочному омылению раствором NaOH при температуре 60 °С в течение 2 часов. Далее согласно схеме 1 получали ПГNaFeCa и ПГNaFeCoCu. К раствору полученного пектата натрия добавляли раствор нескольких солей двухвалентного металла (солей кобальта, меди и железа при синтезе ПГNaFeCoCu; солей железа и солей кальция и железа при синтезе ПГNaFeCa) с концентрацией 0.02–0.002 моль/л и проводили процесс при постоянном перемешивании в течение 30 минут и температуре 55–60 °С. Осаждение целевых продуктов проводилось этиловым спиртом, далее их отделяли центрифугированием и сушили при температуре 50–55 °С. Измельчение полученных металлокомплексов проводилось на шаровой мельнице до диаметра (d) не более 0.5 мм.

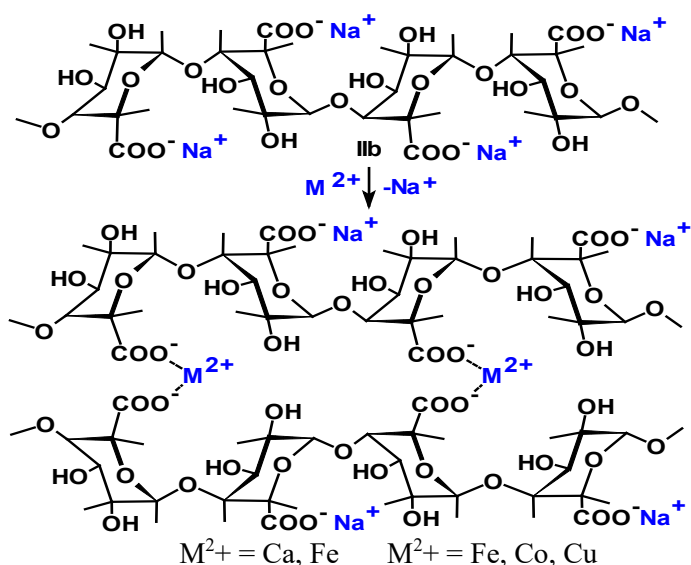


Схема 1. Предлагаемый подход для синтеза водорастворимых гетерометаллокомплексов на основе полигалактуроната натрия (степень солеобразования 100 %)

Целевые продукты ПГNaCaFeCoCu, одновременно содержащие все четыре металла, отвечающие за гемоглобин крови и за кроветворную функцию, – железо, кобальт, медь и кальций – получены смешиванием исходных металлокомплексов ПГNaCaFe и ПГNaFeCoCu (Fe : Cu : Co = 1 : 1 : 1) в определенном массовом соотношении 6:1 (Ia), 9:1 (Ib), 12:1 (Ic) с последующей обработкой на шаровой мельнице в течение 10 минут для обеспечения равномерного перемешивания.

Методика определения противоанемической активности ПГNaCaFeCoCu in vivo.

Эксперимент был проведен на 15 самцах крыс линии Sprague Dawley в возрасте 6–7 месяцев. Животные были разделены на 4 группы: контрольная группа состояла из трёх крыс, другие группы – из четырёх. Во время эксперимента животных содержали на рационе, составленном из продуктов с пониженным содержанием железа: рис отварной на воде (31.5 %), хлеб сухой (60 %), творог обезжиренный (7 %), морковь (1.5 %). Содержание железа в железodefицитном рационе, определенное в компонентах рациона атомно-абсорбционным методом и рассчитанное на 100 г. рациона, составляло примерно 0.51 мг/100 г. корма, что в 4.5 раз ниже, чем в стандартном рационе.

Для моделирования постгеморрагической анемии, у животных делали кровопускание из кончика хвоста в течение трех дней объемом по 1 % от массы тела, или 15–17 % от общего объема кровотока, суммарный объем кровопотери составлял 45–50 % от объема кровотока. Аналогичный способ моделирования анемии описан для кроликов в Патенте ВУ 5336 С1 (от 30.09.2003 г.). До начала опыта (1-й день кровопускания) были исследованы исходные морфологические показатели крови и веса. Сразу после кровопускания крысам перорально вводили исследуемые препараты – металлокомплексы пектина, содержащие разное массовое соотношение металлов, в виде 3 %-ных водных растворов в объеме 2 мл на 100 г. массы тела животного. Препараты вводили также после прекращения кровопускания в течение 30 дней.

Схема эксперимента была следующая:

- 1 группа (контроль) – получала дистиллированную воду в объеме 2 мл/кг массы животного;
- 2 группа – комплексный препарат Ia при массовом соотношении металлокомплексов пектина ПГNaCaFe и ПГNaFeCoCu как 6:1 (60 мг/кг);
- 3 группа – комплексный препарат Ib при массовом соотношении металлокомплексов пектина ПГNaCaFe и ПГNaFeCoCu как 9:1 (60 мг/кг);
- 4 группа – комплексный препарат Ic при массовом соотношении металлокомплексов пектина ПГNaCaFe и ПГNaFeCoCu как 12:1 (60 мг/кг).

Морфологические показатели крови были определены на каждый день кровопускания, а также в динамике наблюдения – на 1, 3, 7, 10, 13, 23 и 33 день опыта при каждом заборе крови на гематологическом анализаторе Mythic 18 Vet, использующий кондуктометрический и спектрофотометрический методы (табл. 2 и 3). Образцы крови брали из надреза кончика хвоста в одноразовые пробирки для капиллярной крови марки «ЭДТА».

Статистическая обработка результатов выполнена методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента по сравнению с контрольной и опытной группами в Origin 2017.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведены комплексные исследования полученных соединений ПГNaCaFeCoCu, включая их состав, физико-химические свойства (ИК спектроскопия, АСМ, ДСР, ПЭМ) и биологическую активность.

Элементный состав ПГNaCaFeCoCu, определенный на элементном CHNS-высокотемпературном анализаторе EuroEA3028-НТ-ОМ, количественное содержание металлов, определенное на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой iCAP 6300 DUO (Thermo Scientific, США), представлены в таблице 1. Установлено, что снижение количественного содержания кобальта и меди, увеличение содержания кальция и железа в комплексных препаратах в ряду ПГNaFeCa : ПГNaFeCoCu 6:1, 9:1, 12:1 приводит к увеличению кинематической вязкости их 0.5 %-ных растворов с 1.957 мм²/с (6:1) до 2.293 мм²/с (12:1), определенной с использованием вискозиметра Оствальда (K=0.009820) (табл. 1).

Таблица 1 – Содержание химических элементов в исследуемых образцах ПГNaCaFeCoCu

Образец	Содержание элементов, % масс.					C, %	H, %	Кинематическая вязкость, мм ² /с (20 °C)
	Na (588.995)	Fe (259.940)	Co (228.616)	Cu (324.754)	Ca (317.933)			
Ia	4.39	1.17	0.30	0.22	2.26	29.39	4.35	1.957
Iб	4.22	1.22	0.22	0.17	2.44	27.46	4.37	1.961
Ic	4.34	1.25	0.15	0.12	2.47	30.50	4.45	2.293

Исследование противоанемической активности комплексных препаратов ПГNaCaFeCoCu на модели постгеморрагической анемии. В результате кровопускания в течение 3-х дней и специальной диеты с пониженным содержанием железа, у крыс во всех группах наблюдается анемия, характеризующаяся снижением показателей числа эритроцитов и концентрации гемоглобина (табл. 2, 3).

Таблица 2 – Изменение концентрации гемоглобина (г/л) при постгеморрагической анемии и введении тестируемых веществ

День исследования	1 группа Контроль	2 группа Ia	3 группа Iб	4 группа Ic
0 (исходный)	218,0 ± 8,4	203,5 ± 3,3	212,0 ± 4,3	205,5 ± 4,4
1 (после 1 кровопускания)	186,3 ± 10,2	178,3 ± 2,9	179,7 ± 1,2	179,0 ± 1,5
2 (после 2 кровопускания)	132,7 ± 7,7	147,8 ± 0,6	160,3 ± 17,1	138,5 ± 11,5
3 (после 3 кровопускания)	154,0 ± 5,1	142,8 ± 3,9	137,8 ± 5,9	154,0 ± 7,2
7	176,0 ± 8,3	173,5 ± 4,8	166,8 ± 1,2	168,8 ± 2,7
10	162,0 ± 17,8	183,0 ± 2,0	185,8 ± 2,9	183,3 ± 3,2
13	200,3 ± 9,4	197,3 ± 0,9	196,5 ± 1,3	198,8 ± 1,7
23	210,7 ± 4,3	202,5 ± 2,9	203,8 ± 3,3	204,5 ± 4,0
33	204,0 ± 5,0	201,8 ± 1,8	198,0 ± 1,3	204,0 ± 0,4
* – различия с контрольной группой статистически достоверны при p < 0.05				

Наиболее выраженное повышение исследованных показателей крови под действием комплексных препаратов Ia-с наблюдалось на 10 день (табл. 2, 3), что свидетельствует об их стимулирующем влиянии на восстановление клеток крови, или эритропоэз, у животных при острой кровопотере и на фоне кормления железодефицитным рационом. Выявленное повышение числа эритроцитов наблюдалось при введении пектинового комплексного препарата Ib (9:1) (табл. 3), что свидетельствует о наибольшей эффективности комплексного препарата при данном массовом соотношении ПГNaCaFe и ПГNaFeCoCu.

Результаты дальнейшего наблюдения (13–33 день) показали полное восстановление исследованных гематологических показателей крови во всех группах и отсутствие различий с контрольной группой.

Таблица 3 – Изменение числа эритроцитов ($\times 10^{12}/л$) при постгеморрагической анемии и введении тестируемых веществ

День исследования	1 группа Контроль	2 группа Ia	3 группа Iб	4 группа Iс
0 (исходный)	8,41 $\pm$ 0,36	8,41 $\pm$ 0,25	9,22 $\pm$ 0,17	8,83 $\pm$ 0,18
1 (после 1 кровопускания)	7,82 $\pm$ 0,35	7,55 $\pm$ 0,10	7,66 $\pm$ 0,29	7,75 $\pm$ 0,08
2 (после 2 кровопускания)	5,86 $\pm$ 0,42	6,48 $\pm$ 0,05	7,28 $\pm$ 0,65	6,62 $\pm$ 0,47
3 (после 3 кровопускания)	7,09 $\pm$ 0,18	6,50 $\pm$ 0,18	6,68 $\pm$ 0,10	7,01 $\pm$ 0,31
7	7,44 $\pm$ 0,21	7,43 $\pm$ 0,19	7,19 $\pm$ 0,07	7,18 $\pm$ 0,09
10	6,76 $\pm$ 0,54	7,93 $\pm$ 0,16 *	8,17 $\pm$ 0,07 *	7,93 $\pm$ 0,14 *
13	8,60 $\pm$ 0,38	8,60 $\pm$ 0,08	8,62 $\pm$ 0,11	8,62 $\pm$ 0,07
23	9,35 $\pm$ 0,13	9,04 $\pm$ 0,18	9,19 $\pm$ 0,20	9,02 $\pm$ 0,19
33	9,01 $\pm$ 0,20	8,79 $\pm$ 0,14	8,84 $\pm$ 0,19	9,01 $\pm$ 0,04

* – различия с контрольной группой статистически достоверны при $p < 0.05$.

На основе пектиновых полисахаридов получены и исследованы гетерометаллокомплексы ПГNaCaFeCoCu, одновременно содержащие четыре металла, отвечающие за гемоглобин крови и за кроветворную функцию. Принципиальное отличие ПГNaCaFeCoCu заключается в комплексном воздействии на систему эритропоэза, т. к. в составе имеются три микроэлемента (железо, кобальт и медь), необходимые для кроветворения; в водорастворимости (биодоступности); а также в том, что макро- и микроэлементы связаны с органическими ионами природного нетоксичного вещества пектина – натуральной пищевой добавки, используемой в производстве йогуртов, сметаны, перспективных для детей и для взрослых. Макроэлемент – кальций, который содержится в составе гетерометаллокомплексов пектиновых полисахаридов, не снижает биологическую доступность железа, а дополнительно способствует нормализации обмена кальция в организме для больных с первичными и вторичными остеопорозами. Необходимо отметить, что пектиновые полисахариды обладают иммуномодулирующим, детоксикационным, радиопротекторным действием, что может обеспечить дополнительный терапевтический эффект предлагаемого лекарственного средства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты являются фундаментальной основой для организации производства высокоэффективных нетоксичных лекарственных препаратов пролонгированного действия отечественного производства, перспективных для лечения и реабилитации детей с гематологическими заболеваниями.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-03-00310_а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haram K. et al. Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica. 2001. Vol. 80. – P. 683–688.
2. World Health Organization. Iron deficiency anemia assessment, prevention, and control. A guide for programme managers. Geneva, Switzerland: WHO; 2001.
3. Лялякин П.Ф. Лекарства, которые вы выбираете. Москва: ТФ «Мир» ОНИКС 21 век. 2001. – С. 7–25.
4. S.T. Minzanova, V.F. Mironov, D.M. Arkhipova, A.V. Khabibullina, L.G. Mironova, Y.M. Zakirova, V.A. Milyukov // Polym., 2018. N. 10. – P. 1407. DOI: 10.3390/polym10121407.
5. Крисс Е.Е., Волченкова И.И., Бударин Л.И. // Координац. химия. 1990. Т. 6. Вып.1. – С. 11–21.
6. E. Kuzmann, V.K. Garg, A.C. de Oliveira et al. Mössbauer study of the effect of pH on Fe valence in iron – poly-galacturonate as a medicine for human anaemia // Radiation Physics and Chemistry. 2015. N. 107. – P. 195–198.
7. Miyada T., Iron bound to pectin is utilised by rats // British J. of Nutrition. 2011. V. 106. – P. 73–78.
8. Miyada, T., Nakajima, A., Ebihara, K. Degradation of pectin in the caecum contributes to bioavailability of iron in rats // British J. of Nutrition. 2012. V. 107 (10). – P. 1452–1457.
9. С.Т. Минзанова и др. Синтез и физико-химические свойства противоанемических комплексов железа и кальция с полигалактуронатом натрия // Докл. АН, 2016. Т. 467. № 4. – С. 431–435
10. S.T. Minzanova, V.F. Mironov et al. Complexation of pectin with macro – and microelements. Antianemic activity of Na, Fe and Na, Ca, Fe complexes // Carb. Polym., 2015. N. 134. – P. 524–533.