

Н. Б. Мельникова¹, М. В. Сидорова¹, А. Р. Сорокина¹, А. К. Мартусевич²,
С. П. Перетягин², А. В. Кочубейник¹, М. В. Гуленова¹, А. Е. Большакова¹

КОМПЛЕКСЫ ГИДРОХЛОРИДА ГЛЮКОЗАМИНА И ФИТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ВОДНОЙ СРЕДЕ И ИХ АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

¹ Нижегородская государственная медицинская академия, Российская Федерация, 603950, Нижний Новгород, пл. Минина, 10/1; e-mail: chem-pharm@yandex.ru

² Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии, Российская Федерация, 603155, Нижний Новгород, Верхне-Волжская набережная, 18.

Взаимодействие фитиновой кислоты в водной среде с гидрохлоридом глюкозамина приводит к образованию комплексов фитиновой кислоты и глюкозамина $\text{InsP}_6 \cdot 5\text{ГА}$, состав которых доказан элементным анализом по содержанию углерода, водорода, азота и фосфора. Методами ИК, ^1H , ^{13}C и ^{31}P ЯМР спектроскопии и потенциометрического титрования показано, что комплексы фитиновой кислоты с глюкозамином образуются за счет водородного связывания и электростатического взаимодействия по типу солевых комплексов. В исследованиях *in vitro* на плазме крови человека в условиях окислительного стресса для комплексов $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$ с глюкозамином доказаны высокое антиоксидантное действие по отношению к процессам липопероксидации и положительное влияние на активность супероксиддисмутазы.

Ключевые слова: фитиновая кислота; глюкозамина гидрохлорид; антиоксидантная активность; супероксиддисмутазы.

Нарушение метаболизма костной и соединительной тканей, в частности в коллагеновом и хрящевом матриксах, вызывающее воспалительные и дегенеративные изменения, обусловлено процессами, связанными с образованием активных форм кислорода, активацией перекисного окисления липидов (ПОЛ), снижением активности ферментов, например, супероксиддисмутазы (СОД), а также развитием окислительного стресса [1 – 4].

Известно, что препараты глюкозамина в солевой форме (хлорида или сульфата) ингибируют процессы образования малонового диальдегида, диеновых конъюгатов — промежуточных этапов окисления коллагена, лежащих в основе нарушения биохимических и биофизических свойств хрящевого матрикса [5]. Многолетняя практика показала положительную роль глюкозамина (I) в уменьшении деградации коллагена хряща, развивающейся в результате избыточной перексидации липидов и окисления белков [6]. Как правило, препараты I используются в сочетании с хондроитином, способствуя повышению активности антиоксидантных ферментов, таких как СОД и каталаза [7].

В последнее время большой интерес вызывает природный антиоксидант — фитиновая кислота (гексакисфосфат мио-инозит, II, $\text{InsP}_6\text{H}_{12}$), относящаяся к классу фосфорилированных сахаров и обладающая свойствами регулятора метаболических процессов, в том числе кальций-фосфорного и ионного баланса в костной и соединительной тканях, а также принимающая участие в поддержании энергетического статуса организма человека [8 – 10]. Принято считать, что антиоксидантный эффект II связан, главным образом, с ингибированием ксантиноксидазы, генерирующей супероксид-анионы $\text{O}_2^{\bullet-}$, и активированием СОД [11].

Следует ожидать, что II способна не только обустраивать синергетическое антиоксидантное действие препаратов I, но и обеспечивать более полную коррекцию метаболических процессов при коллаген-ассоциированных заболеваниях.

Целью настоящей работы является изучение процессов образования комплексов гидрохлорида I и II в водном растворе и оценка антиоксидантных свойств полученных комплексов по таким показателям как уровень ПОЛ, общей антиоксидантной активности (АОА) и активности СОД при моделировании окислительного стресса озоном.

Экспериментальная химическая часть

В работе использовали следующие материалы и реактивы: фитиновая кислота, 50 % (“Acros Organics”); гидрохлорид глюкозамина (“Wirud GmbH”); растворители — этанол и 2-пропанол — использовали без дополнительной очистки; трисамин (ч., ТУ 6-09-4292-76); вода очищенная, полученная на установке “Elix-3” (“Millipore”, Франция) имела удельное сопротивление менее 0,2 мкСм.

Эксперименты выполнены на УФ-спектрофотометре Specord S100 Bioline (Analytic Jena, Германия); рН-метре “pH-150M” фирмы РУП (Гомель, Белоруссия); ЯМР-спектрометре Agilent DD2 400 (Agilent Technologies, США), D_2O спектры ^1H , ^{13}C и ^{31}P ЯМР на рабочих частотах 400, 101 и 202,46 МГц, соответственно; ИК-спектрофотометре с преобразователем Фурье IRprestige-21 (Shimadzu, Япония).

Потенциометрическое титрование 0,076 М раствора II (20 мл, $n = 1,19$ ммоль) проводили 0,460 М раствором гидрохлорида I. Титровали медленно при перемешивании магнитной мешалкой, останавливая процесс

на 3 мин после добавления каждой порции титранта до установления равновесия. В контрольном опыте проводили титрование 0,076 М раствора II (20 мл, $n = 1,19$ ммоль) 0,460 М раствором HCl.

Комплексы II с I в кристаллическом состоянии получали добавлением 0,075 моль гидрохлорида I к 20 мл 50 % II (молярное соотношение I и II от 12:1 до 3:1) на ледяной бане и последующим высаливанием этанолом при 0 °С с выделением легкого белого аморфного порошка. Максимальный выход продукта ($\approx 50\%$) был получен при молярном соотношении I:II = 5:1.

Элементный анализ (табл. 1). Содержание общего фосфора после минерализации окислительной смесью азотной и хлорной кислот (в соотношении 1:1) аликваты определяли фотоколориметрически (425 ± 2) нм в соответствии с методикой ГФ XII. Элементный анализ углерода, азота и водорода проводили на анализаторе "VarioMICRO" (Elementar Analysen systeme GmbH, Германия).

^{31}P ЯМР спектр продукта реакции содержал несколько сигналов с химическими сдвигами (δ , ppm) от -1 до $+1$, типичными для различных фосфатных эфиров инозита, в том числе InsP_5 , InsP_4 и др. [8, 12]. **^{13}C ЯМР спектр** продукта был представлен основными сигналами (δ , ppm), которые близки к химическим сдвигам протонированных форм гидрохлорида I α -эпимер 92,6 и β -эпимер 89,1; 76,1; 71,9; 71,5; 60,4; 60,2; 56,6; 54,2 [13]. **^1H ЯМР спектр** продукта (D_2O) содержал сигналы (δ , ppm): два т, 2,85, 2,87, 2,90; два д, 3,15, 3,16, 3,17, 3,18; мультиплет 3,32, 3,33, 3,34, 3,35, 3,86, 3,38; комплекс для 2 эпимеров 3,53, 3,55, 3,58, 3,59, 3,61, 3,63, 3,64, 3,66, 3,67, 3,70, 3,71, 3,74, 3,76, 3,78, 3,79; д, 4,80, 4,82; д, 5,31, 5,32.

ИК-спектры II, I гидрохлорида и продукта их взаимодействия представлены в табл. 2.

Анализ фитиновой кислоты с реактивом Вэйда. Раствор, содержащий 0,3240 г сульфосалициловой кислоты в 100 мл воды (раствор А), смешивали с раствором Б, в котором было растворено 0,0324 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 100 мл воды (соотношение 1:1 по объёму), и использовали свежеприготовленным. Для анализа использовали объёмное соотношение 0,3 мМ раствора II к реагенту, равное 1:3.

Таблица 1

Элементный анализ комплекса фитиновой кислоты с глюкозаминном в соотношении II:I = 1:5

Система	C [%]	H [%]	N [%]	P [%]
Рассчитано	28,70	6,04	4,40	1,19
Экспериментально найдено	28,62	5,98	4,13	1,22
Абсолютное отклонение	0,540	0,069	0,080	0,090
Относительное отклонение RSD %	1,900	1,157	1,920	1,592

Экспериментальная биологическая часть

Исследования антиоксидантных свойств гидрохлорида I, II и их комплексов *in vitro* проводились на цельной консервированной крови в соответствии с нормативными документами [14 – 16]. Кровь, полученную от 10 доноров (по 25 мл), разделяли на 4 порции (интактную, на которую не оказывали воздействий, и 3 опытных). Для моделирования окислительного стресса 3 опытные порции крови барботировали озон-кислородной смесью (100 мл, концентрация озона — 5000 мкг/л) в течение 5 мин [17]. Первая опытная порция представляла собой модель окислительного стресса без коррекции, во вторую вносили 0,5 мл 10 мМ раствора II, в третью — 0,5 мл водного раствора комплекса "II – I", при молярном соотношении II:I = 1:5 ($C_{II} = 10$ мМ), в четвёртую 0,5 мл водного раствора комплекса "II – I" при молярном соотношении II:TA = 1:7 ($C_{II} = 10$ мМ). Содержимое пробирок осторожно перемешивали в течение 1 мин, затем выдерживали смесь в течение 5 мин, pH = 7.

Хемилюминесцентный анализ проб, индуцированных по реакции Фентона [2], на общую антиоксидантную активность проводили на приборе БХЛ-06 (Россия). Фиксировали величины: I_{\max} (mV), характеризующий максимальную вспышку хемилюминесценции; S (mV) — суммарная хемилюминесценция за 30 с; $\text{tg}2\alpha$, показывающий скорость нормализации процессов свободно-радикального окисления; I_{\max}/S — фактор антиоксидантной активности.

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 7.0 ($p < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

Показано, что изменение pH исходного 0,076 М раствора II при медленном титровании 0,460 М раствором гидрохлорида I происходило ступенчато от pH 2,1 до 1,7 (рис. 1, кривая I).

Ступенчатый характер кривой, полученной при титровании II равными порциями гидрохлорида I с останковками для установления равновесия, показывает,

Таблица 2

ИК-спектры II, I гидрохлорида и продукта их взаимодействия

Группа	Волновое число, cm^{-1}		
	II	I гидрохлорид	продукт
OH ν	3320	3319	3354
OH δ	1130	1146	1138
C-O $_{\text{спирт}}$	—	1094	1094
		1067	1059
		1038	1034
C-O $_{\text{эфирн}}$	1009	1182	1182
		1003	1005
NH $_3^+\delta$	—	1584	1585
		1537	1539
P-O ν	889	—	891
P=O ν	1643, 1130	—	1618, 1138

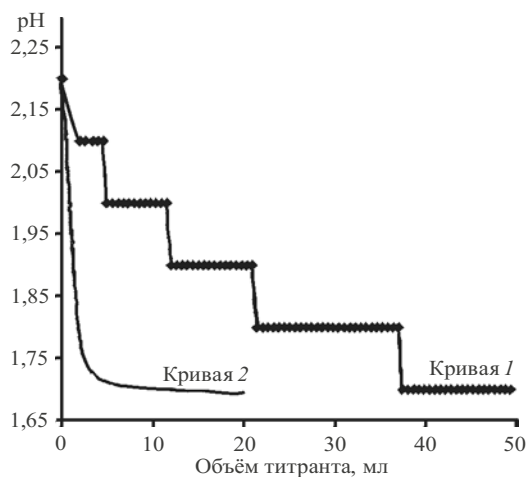
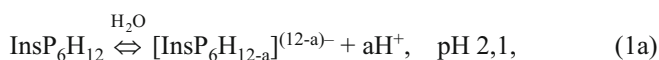


Рис. 1. Зависимость $pH = f(V_{\text{титранта}})$, титрование 0,076 М раствора II 0,460 М раствором гидрохлорида I (кривая 1) и 0,460 М раствором HCl (кривая 2).

что скорость изменения pH непостоянна. Вначале pH изменяется быстро при добавлении небольшого объема титранта, затем скорость изменения pH постепенно уменьшается.

Основное влияние на форму кривой титрования оказывает диссоциация II (уравнение 1а) и присутствие в системе хлорид-иона, способствующего стабилизации депротонированной формы [18]. Последний нижний участок указывает на присутствие в системе раствора HCl и завершение образования комплекса II с I в этих условиях (уравнение 1б). О появлении в системе HCl также свидетельствует контрольный опыт добавления в раствор II 3,5 мл 0,460 М раствора HCl и снижения pH раствора до 1,7 (рис. 1, кривая 2).



где a — число протонов, образованных в результате диссоциации.



где X — условно обозначен как фитат-анион.

В целом, зависимость $pH = f(V_{\text{ГАН}^+})$ можно рассматривать как кривую титрования многоосновного основания — аниона фитата кислотой — протонированным I (катионной кислотой или ониевым ионом). Диссоциация II в воде происходит преимущественно по первой ступени (pK_a 1,90) во всех 6 фосфатных группах, аналогично диссоциации фосфорной кислоты (pK_a 2,12) и глюкозо-1-фосфата (pK_a 1,10) при отрыве первого протона [19]. Следовательно, можно ожидать, что заряд фитат-аниона как при диссоциации по первой ступени, так и при взаимодействии с протонированным I будет близок к 6.

Ранее авторы работы [20] на примере биогенных аминов (этилендиамин-1,4,-диаминобутан; N,N'-бис-[3-аминопропил]-1,4-диаминобутан и N-[3-аминопропил]-1,4-диаминобутан) в гидрохлоридной форме показали, что при нековалентном взаимодействии I и II

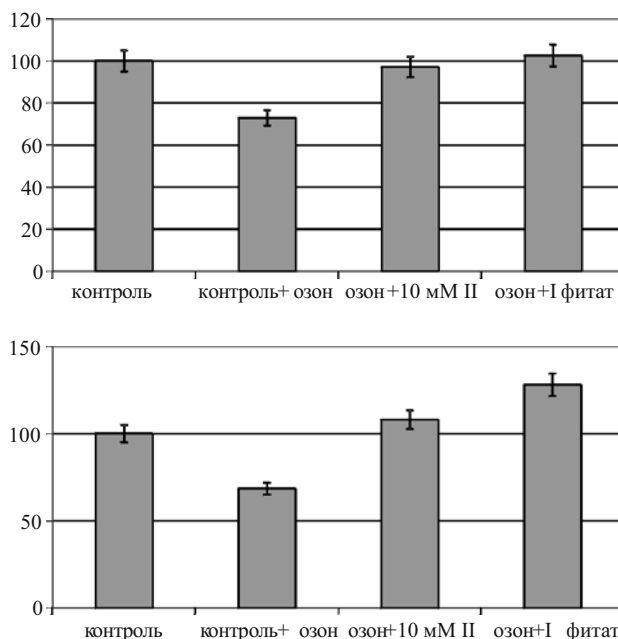


Рис. 2. Интенсивность ПОЛ в плазме крови и АОА плазмы крови в условиях озон-индуцированного окислительного стресса и при действии растворов 10 мМ II и комплекса с I на его основе (в процентах относительно контрольного образца): а) интенсивность СРО (I_{max}/S), отн. %; б) скорость нормализации СРО АОА, отн. %.

образуются преимущественно комплексы со стехиометрией амин — фитат-анион, равной 5, а в случае дикалиевой соли фитиновой кислоты, где 2 наиболее подвижных протона замещены, стехиометрия близка к 3. Принимая во внимание результаты нашего исследования, такие как: 1) наличие 5 ступеней на кривой $pH = f(V_{\text{ГАН}^+})$; 2) данные элементного анализа выделенного продукта; 3) мольную долю аниона II в продукте, определенную с реактивом Вэйда и равную 20 %; можно предположить, что в результате реакции гидрохлорида I и II также образуются комплексы, в которых суммарное отношение I к фитат-аниону равно 5.

Циклогексановая структура фосфорилированного сахара InsP_6 в комплексах, вероятно, сохраняется, о чём свидетельствуют результаты с реактивом Вэйда — специфического реагента на гексакисфосфат-инозитный фрагмент. Оптическая плотность при 500 нм реакци-

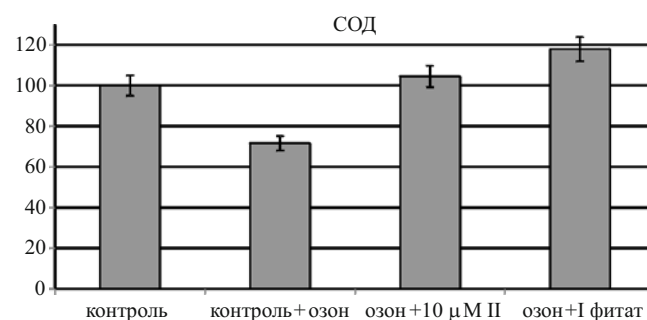


Рис. 3. Активность СОД крови в условиях озон-индуцированного окислительного стресса и при действии растворов 10 мМ II и комплекса с I на его основе (в процентах относительно контрольного образца).

онной смеси II и I оставалась неизменной в широком диапазоне молярных соотношений от 1:1 до 1:12 и соответствовала значению оптической плотности исходного раствора II в отсутствие лиганда. Сохранение гексакисфосфат-инозитного фрагмента также подтверждается данными ИК-спектров выделенного продукта. В комплексах II с I содержатся полосы инозитного фрагмента многоатомного спирта (854 см^{-1}), валентных колебаний C-O-связи эфирного ($1150 - 1030\text{ см}^{-1}$), появляются полосы, характерные для аниона II [13, 21], а именно колебания P-O-связи (889 см^{-1}), сдвиг по отношению к продукту $\Delta\nu = 2\text{ см}^{-1}$; колебания фосфорильной группы 1130 и 1643 см^{-1} (сдвиг в продукте $\Delta\nu = 8\text{ см}^{-1}$). Кроме того, в спектре присутствуют полосы протонированной формы I всех деформационных и валентных колебаний, исчезает полоса Cl^- (774 см^{-1}). Отсутствие Cl^- также было подтверждено отрицательной пробой с AgNO_3 .

Можно предположить, что комплексы II с I, аналогично комплексам протонированных аминов в водной среде, образующихся за счет водородного связывания и электростатических сил [20, 22, 23], достаточно устойчивы в водной среде, что доказывает рассчитанная авторами [20] величина свободной энергии Гиббса $\Delta G^\circ = (4,0 \pm 0,2)\text{ кДж/моль}$, приходящаяся на 1 связь.

Исследование процессов липопероксидации в плазме крови в присутствии водных растворов фитиновой кислоты и её комплексов в условиях окислительного стресса *in vitro*

Влияние I как лиганда в комплексе с II на липопероксидацию было изучено при сопоставлении его непосредственно с II. На основании данных биофлуоресцентного исследования образцов крови показано, что при введении в них 100 мл озono-кислородной смеси (концентрация озона 5000 мкг/л) имеют место признаки окислительного стресса (рис. 2). Они включают выраженную стимуляцию интенсивности процессов липопероксидации плазмы крови в сочетании с умеренным снижением ее антиоксидантной активности.

При введении в систему II и её комплекса с I умеренно увеличивается интенсивность свободно-радикального окисления (CPO), что должно характеризовать усиление липопероксидации (рис. 2).

Однако скорость нормализации CPO, рассчитываемая как величина отношения $\text{tg}2\alpha_{\text{образца}}/\text{tg}2\alpha_{\text{контроля}}$ (в процентах) и определяемая нами как АОА, увеличивается (рис. 2).

Полученные результаты по CPO, вероятно, можно объяснить увеличением липопероксидации при использовании комплексов II с I, а также самой II в результате ответной реакции на интенсификацию CPO (проявление проантиоксидантного эффекта). Однако, на наш взгляд, увеличение показателей интенсивности CPO, ответственных за ПОЛ, объясняется также ролью II как хелатора ионов железа (Fe^{2+} и Fe^{3+}) при инициации в реакции Фентона.

Особо важная роль в антиоксидантной активности как II, действие которой связано с ингибированием ксантиноксидазы, так и гидрохлорида I, снижающего деградацию коллагена за счет активирования ферментной системы, принадлежит СОД. Оценка активности СОД, ингибирующей образование супероксид-анион радикала, по методу [24] показала увеличение каталитической активности СОД как в присутствии II, так и комплексов II с I (рис. 3).

В целом, можно констатировать высокую антиоксидантную активность комплексов II с I и их положительное влияние на активность СОД в условиях окислительного стресса *in vitro* на плазме крови человека.

Проведенные нами исследования позволяют предложить простой и надежный способ получения растворов комплекса II с I, защищающих биологическую систему от окислительного стресса за счет высоких антиоксидантных свойств компонентов комплекса. Данные элементного анализа (содержание углерода, водорода, азота и фосфора) и потенциометрического титрования позволили предположить состав комплекса, определяемый молярным соотношением II:I = 1:5. Наиболее вероятно, что образование комплексов происходит по типу солеобразования за счет водородного связывания и электростатических сил при полном сохранении гексакисфосфато-инозитного фрагмента InsP_6 .

Кроме того, полученные нами комплексы, как в водном растворе, так и в твердом состоянии, имеют большое сродство к 1,4,5-трифосфат-инозитному (InsP_3) рецептору, действие которого ответственно за высвобождение кальция из каналов мембраны эндоплазматического ретикулума [23].

С учетом физико-химических и фармакологических свойств солевых комплексов можно предложить использование их для более эффективной коррекции метаболических процессов в соединительной и костной ткани как регулятора обмена фосфора и ингибитора деструкции коллагена. Другим преимуществом комплексов в водных растворах является создание новых лекарственных средств в виде гидрофильных гелей, лосьонов и пленок.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. С. Еловикова, О. В. Бугрова, В. Г. Лайзерман и др., *Казанский мед. ж.*, **90**(6), 784 – 788 (2009).
2. Е. Е. Дубинина, *Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток: (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические процессы*, Мед. пресса, Санкт-Петербург (2006), сс. 55 – 64.
3. Ю. А. Вадимиров, *Вестник РАМН*, № 7, 43 – 47 (1998).
4. R. Kohen, A. Nyska, *Toxicol. Pathol.*, **30**(6), 620 – 650 (2002).
5. M. L. Tiku, Y. P. Yan, K. Y. Chen, *Free Radic. Res.*, **29**(3), 177 – 187 (1998).
6. M. L. Tiku, H. Narla, M. Jain, et al., *Arthritis Res. Ther.*, **9**(4), R76, 1 – 10 (2007).
7. K. M. Surapaneni, G. Venkataramana, *Indian J. Med. Sci.*, **61**(1), 9 – 14 (2007).
8. V. Kumar, A. K. Sinha, H. P. S. Makkar, et al., *Food Chem.*, № 120, 945 – 959 (2010).

9. J. Khatiwada, M. Verghese, Sh. Davis, et al., *J. Med. Food*, **14**(11), 1313 – 1320 (2011).
10. A. Zajdel, A. Wilczok, L. Wglarz, et al., *BioMed Res. Intern.*, **2013**, 1 – 6 (2013).
11. S. Muraoka, T. Miura, *Life Sciences*, № 74, 1691 – 1700 (2004).
12. D.-L. M. Tzou, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, № 27, 209 – 214 (2005).
13. L. D. Carli, E. Schnitzler, M. Ionashiro, et al., *J. Braz. Chem. Soc.*, **20**(8), 1515 – 1522 (2009).
14. ГОСТ Р ЕН 13641-2010. Введ. 2012-01-01, Стандартинформ, Москва (2011).
15. ГОСТ Р ИСО 22442-1-2011. Введ. 2012-03-01, Стандартинформ, Москва (2011).
16. ГОСТ Р ИСО 22442-2-2011. Введ. 2012-03-01, Стандартинформ, Москва (2011).
17. А. К. Мартусевич, А. Г. Соловьева, С. П. Перетягин и др., *Биомедицина*, № 1, 103 – 108 (2013).
18. О. Труфанов, *Фитаза в кормлении сельскохозяйственных животных и птицы*, ПолиграфИнко, Киев (2011), сс. 11 – 15.
19. D. R. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 90ed, CRC Press, New York (2010), pp. 5 – 13.
20. C. De Stefano, *Chem. Speciat. Bioavailab.*, **15**(2), 29 – 36 (2002).
21. S. Mignani, S. E. Kazzouli, M. Bousmina, et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, № 65, 1316 – 1330 (2013).
22. J. A. Maga, J. Agrie, *Food Chem.*, № 30, 1 – 9 (1982).
23. J. Chan, A. E. Whitten, C. M. Jeffries, et al., *J. Mol. Biol.*, **373**(5), 1269 – 1280 (2007).
24. Т. В. Сирота, *Вопросы мед. химии*, № 3, 263 – 272 (1999).

Поступила 27.03.14

COMPLEXES OF GLUCOSAMINE HYDROCHLORIDE AND PHYTIC ACID IN AQUEOUS MEDIUM AND THEIR ANTIOXIDANT PROPERTIES IN HUMAN BLOOD PLASMA

N. B. Mel'nikova^{1*}, M. V. Sidorova¹, A. R. Sorokina¹, A. K. Martusevich², S. P. Peretyagin², A. V. Kochubeinik¹, M. V. Gulenova¹, and A. E. Bol'shakova¹

¹ Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

² Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, 603155 Russia

* e-mail: chem-pharm@yandex.ru

The interaction of phytic acid (myo-inositol hexakisphosphate) in an aqueous medium with glucosamine hydrochloride (2-amino-2-deoxy-beta-D-glucopyranose hydrochloride) leads to the formation of phytic acid – glucosamine complexes with formula InsP6 – 5GA, which has been confirmed by elemental analysis for the content of carbon, hydrogen, nitrogen, and phosphorus. Using IR, ¹H-, ¹³C- and ³¹P-NMR spectroscopy, and potentiometric titration, it was shown that these complexes were formed by hydrogen bonding and electrostatic interaction by the type of salt complexes. High antioxidant effect of InsP6 – 5GA complexes with respect to lipid peroxidation processes and a positive influence on the activity of superoxide dismutase in human blood plasma have been demonstrated *in vitro* under oxidative stress conditions.

Keywords: phytic acid; glucosamine hydrochloride; antioxidant activity; superoxide dismutase.