

М. М. Бикбов¹, Н. А. Никитин¹, В. К. Суркова¹, Р. Р. Фархутдинов²,
Л. М. Халилов³, А. Р. Тулябаев³, А. Ф. Никитина¹, С. А. Федореев⁴,
Н. П. Мищенко⁴

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА β -ЦИКЛОДЕКСТРИН – ГИСТОХРОМ

¹ ГБУ "Уфимский НИИ глазных болезней АН РБ", Россия, Уфа.

² ГБОУ ВПО "Башкирский государственный медицинский университет" МЗ РФ, Россия, Уфа.

³ ФГБУН Институт нефтехимии и катализа РАН, Россия, Уфа.

⁴ ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Россия, Владивосток.

На основе сравнительных экспериментальных исследований гистохрома синтезирован комплекс β -циклодекстрин – гистохром в соотношении 2:1. В экспериментах на длительность сохранения антиоксидантного эффекта комплекс β -циклодекстрин – гистохром при сравнении с эквимольной дозой гистохрома показал пролонгацию антиоксидантной активности с 6 до 16 дней по сравнению с гистохромом. На основании результатов ¹H ядерной магнитной резонансной спектроскопии показано формирование комплекса β -циклодекстрин – гистохром. Проведено компьютерное моделирование комплекса β -циклодекстрин – гистохром, показавшее наименьшую энергию при формировании комплекса "голова-к-хвосту".

Ключевые слова: гистохром; эмоксипин; β -циклодекстрин; антиоксидантная активность.

Антиоксидантная (АО) система человека играет важную роль нейтрализатора активных форм кислорода, оксида азота и ряда других радикалов для поддержания гомеостаза организма [1]. Последние в нормальных условиях рассматриваются как внутри- и внеклеточные мессенджеры сигнала, тогда как при патологии, возникающей в результате провоцирующих внутренних и внешних сигналов, приобретают деструктивный характер [2 – 4].

В зрительном анализаторе человека присутствуют как ферментативные, так и неферментативные АО, располагающиеся в тканевых структурах и жидких/полужидких средах глаза, соответственно. Так, супероксиддисмутаза, глутатион-пероксидаза, каталаза найдены в основном в конъюнктиве, роговице, склере, сосудистой оболочке, хрусталике, сетчатке и зрительном нерве; тогда как аскорбат, урат, L-глутатион, L-цистеин, L-тирозин, α -токоферол превалируют в слезной жидкости, водянистой влаге и стекловидном теле [5 – 15]. Указанные выше эндогенные АО поддерживают гомеостаз, который при патологических состояниях нарушается ввиду истощения на клеточном уровне. Для нормализации гомеостаза применяют экзогенные АО, среди которых наиболее широко используются гистохром (I) и эмоксипин (II) (рис. 1). Данные препараты используются для субконъюнктивальных, парабульбарных, ретробульбарных и внутримышечных инъекций, однако их эффект непродолжителен, поэтому требуется дальнейший поиск антиоксидантов с модификацией структуры ранее разрешенных к применению препаратов.

Целью данной работы является синтез комплекса включения β -циклодекстрин-I и изучение его АО активности в сравнении с I.

Экспериментальная часть

В работе применяли β -циклодекстрин (β -ЦД) (Sigma-Aldrich, Германия), медицинские препараты гистохром 0,02 и 1 %, ампульная форма ("Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН", Россия) и эмоксипин 1 %, ампульная форма (ФГУП "Московский эндокринный завод", Россия).

Синтез комплекса β -ЦД-I проводили путём встряхивания растворов исходных ингредиентов в течение 2 ч при 37 °С в тёмных флаконах. Растворы β -ЦД — гистохром готовили в соотношении 1:1 и 2:1 при молярной концентрации гистохрома 1 мМоль, а также 0,5 мМоль. Встряхивание растворов проводили в водяном термостате 1ТЖ-0-03 (ПО "Медлабтехника", СССР, патент на изобретение РФ № 2530886).

Оценку АО активности I и II проводили в следующем диапазоне — первоначальная ампульная концентрация и в разведении 1/10 ампульной концентрации. В качестве растворителя применяли 0,9 % раствор хлорида натрия и дистиллированную воду.

АО активность определяли по влиянию на процессы свободнорадикального окисления (СРО). Для определения АО активности использовали тест-наборы компании "Randox Laboratories, Ltd." NX2332 и NX2331 (Великобритания). Тест основан на спектрофотометрическом анализе АО активности изучаемых соединений при использовании в качестве оксиданта высокоактивного радикала катиона 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоната), а в качестве контроля — тролокс (водорастворимое производное витамина E), предписанных к использованию в концентрациях 0,61 и 2,23 мМоль/л соответственно.

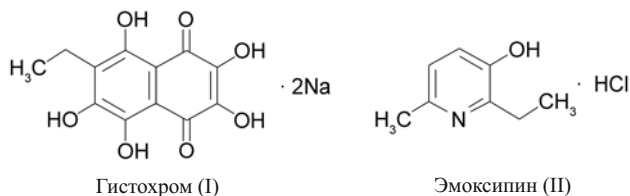


Рис. 1. Антиоксиданты для сравнительного анализа.

Спектрофотометрический анализ проводили на спектрофотометре СФ-26 (“Ломо”, СССР) при длине волны 600 нм.

Также АО активность определяли по влиянию на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ). В качестве модельной системы использовали суспензию желточных липопротеидов, окисление которых активировали добавлением сернокислого железа. Активность антиоксидантов оценивали по степени угнетения хемилюминесценции (ХЛ) — свечения, возникающего при взаимодействии свободных радикалов [16]. ХЛ регистрировали с помощью хемилуминомера ХЛ-003 (ГБОУ ВПО “Башкирский государственный медицинский университет” МЗ РФ) в течение 5 мин — периода, оптимального для оценки активности ПОЛ. В качестве контроля использовали дистиллированную воду [16].

Для определения кислотности растворов применяли рН-метр рН-150М (ОАО “Томельский завод измерительных приборов”, Республика Беларусь).

ЯМР исследование проведено в ЦКП “Агидель” при ФГБУН Институт нефтехимии и катализа РАН с помощью спектрометра “Avance-400” (Bruker, Германия). Оценку данных спектрального анализа осуществляли с помощью программы TopSpin 3.1 (Bruker, Германия, 2011). Компьютерное моделирование проводили с помощью программы HyperChem 8.0.8 (HyperCube, Inc., США, 2009).

Результаты и их обсуждение

На первом этапе проведен сравнительный анализ АО активности I 0,02 % и II 1 %. Для анализа применялся тест-набор “Randox”. В ходе анализа получены следующие результаты. Наибольшая АО активность наблюдалась у I — (109,84 ± 2,42) % в концентрации 0,02 %. При разведении I физиологическим раствором в 10 раз его АО активность снижалась на 65,77 % ($p < 0,001$). Вторую позицию занял II 1 %, АО активность которого составила 44,54 %, а при разведении в 10 раз снизилась лишь на 27,75 % ($p < 0,002$) (рис. 2).

Для подтверждения данных результатов проведен эксперимент на модели ПОЛ. Исследования антиоксидантов проводили в тех же дозах. Показано, что контроль (дистиллированная вода) не обладает АО активностью на (100 ± 2,83) %; I в концентрациях 0,02 % и 0,002 % — (1,57 ± 0,87) % и (59,90 ± 1,33) %; II — 1,0 % и 0,1 % — (14,44 ± 0,42) % и (36,54 ± 0,94) %, соответственно (рис. 3).

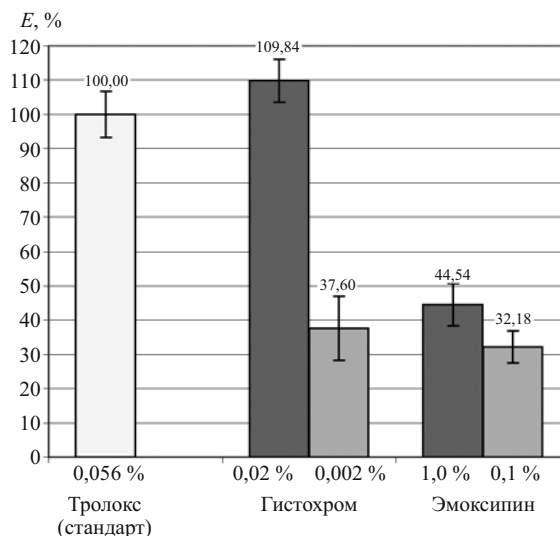


Рис. 2. Сравнительная оценка АО активности препаратов на модели СРО с применением набора “Randox”.

Как и на предыдущей модели, СРО I 0,02 % по АО активности достоверно превосходил II 1 % ($p < 0,05$). При редукции концентрации антиоксидантов в 10 раз наблюдалась та же тенденция: активность I 0,002 % снизилась на 58,33 % ($p < 0,002$), а II 0,1 % — лишь на 22,10 % ($p < 0,05$) относительно контроля (рис. 3). Схожесть результатов тестов АО активности на моделях СРО и ПОЛ позволила дальнейшие исследования проводить с использованием хемилуминомера.

Высокая АО активность I в дозе 0,02 % по сравнению с АО активностью II обусловлена наличием в составе молекулы 5 гидроксильных групп. Однако, как показали выше приведенные тесты, АО активность I при снижении концентрации значительно понижается, что требует поиска способа ее сохранения.

С целью повышения устойчивости I к окислению и пролонгации АО активности нами предпринята попытка его модификации за счет создания комплекса на базе β-ЦД. β-ЦД представляет собой молекулу торической формы, сформированную 7 глюкопиранозными

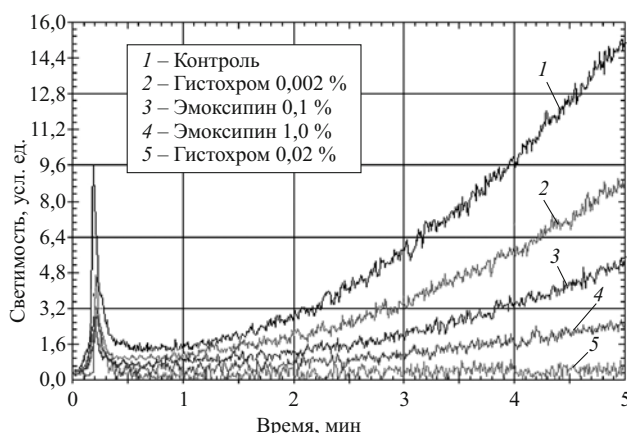


Рис. 3. Сравнительная оценка АО активности препаратов на модели ПОЛ.

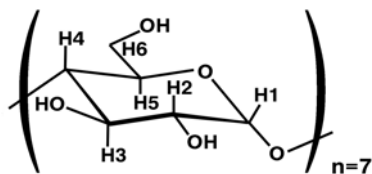


Рис. 4. Глюкопиранозное звено β-ЦД с порядковыми номерами ЯМР протонов [17].

звеньями (рис. 4), у которого наружная сторона обладает гидрофильными, а внутренняя — гидрофобными свойствами [4], что и позволяет сформироваться комплексу включения (клатрату).

Первоначально произведены эксперименты для оценки влияния молярного соотношения компонентов комплекса β-циклодекстрин – I (β-ЦД-Г) на сохранение АО активности. Для этого комплексы β-ЦД-Г синтезировали в соотношениях 1:1 и 2:1 с эквимольной концентрацией I (1 мМоль). Антиоксидантную активность оценивали на модели ПОЛ на 3 день синтеза комплексов β-ЦД-Г.

Результаты эксперимента показали, что АО активность комплекса β-ЦД-Г в соотношении 1:1 снизилась на (53,34 ± 6,57) % ($p < 0,05$), тогда как в соотношении 2:1 лишь на (24,12 ± 3,78) % ($p < 0,05$). Это позволило выбрать соотношение компонентов комплекса β-ЦД-Г 2:1 для последующих экспериментов.

Следующим шагом явилась сравнительная оценка АО активности комплекса β-ЦД-Г (2:1) с собственно β-ЦД. Анализ активности ПОЛ проводили через 24 ч после подготовки соединений. Установлено, что, как и дистиллированная вода, β-ЦД обладает инертностью к ПОЛ: (100,00 ± 0,11) % и (102,58 ± 1,38) % ($p > 0,1$), соответственно; тогда как комплекс β-ЦД-Г характеризуется значительной активностью — снижал ПОЛ до (14,33 ± 0,82) % ($p < 0,001$).

Также оценена роль влияния температурного режима синтеза и концентрации компонентов комплекса β-ЦД-Г на эффективность сохранения АО активности. Эксперименты проводили на растворах β-ЦД-Г, синте-

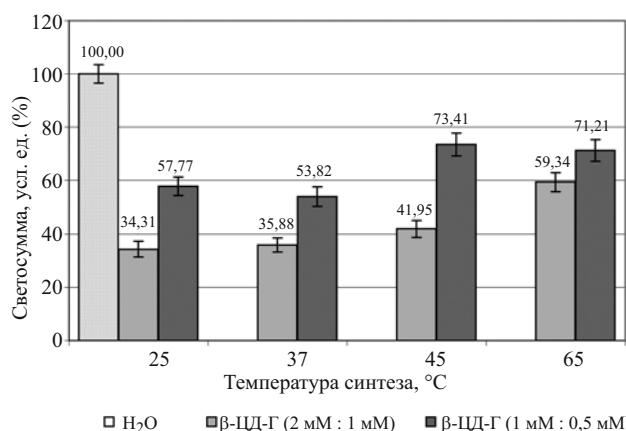


Рис. 5. АО активность на модели ПОЛ комплексов β-ЦД-Г, синтезированных при различной температуре, на 8 сут хранения.

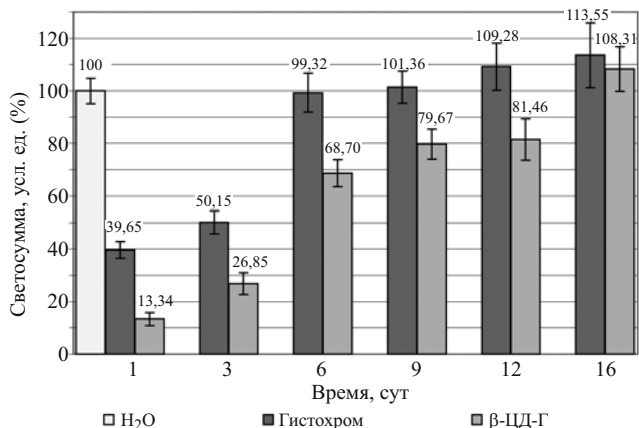


Рис. 6. Динамика АО активности гистохрома и комплекса β-ЦД-Г (2:1) на модели ПОЛ в течение 16 сут хранения.

зированных при 25, 37, 45 и 65 °С. На 8 сут после синтеза проводилась оценка АО активности растворов, хранившихся в темных флаконах при 25 °С.

Установлено, что комплексы β-ЦД-Г в молярном соотношении 2:1 мМоль, синтезированные при температуре 25 и 37 °С, сохраняют свою АО активность; тенденция к снижению АО активности отмечается при 45 °С ($p < 0,1$); снижение — при 65 °С ($p < 0,05$) (рис. 5). У комплексов β-ЦД-Г в молярном соотношении 1:0,5 мМоль, синтезированных при 25 и 37 °С, отмечается сохранение АО активности, тогда как ее снижение уже при 45 °С ($p < 0,05$) (рис. 5). Полученные результаты показывают эффективность синтеза комплекса β-ЦД-Г в температурном диапазоне 25 – 45 °С и молярном соотношении 2:1 мМоль.

На следующем этапе проводилась сравнительная оценка длительности АО активности гистохрома и комплекса β-ЦД-Г (2:1 мМоль) при регулярном засвечивании.

Установлено, что после ежедневного 60 с засвечивания лампой накаливания 60 Вт с расстояния 30 – 35 см АО активность у гистохрома исчезала к 6 сут, тогда как у комплекса β-ЦД-Г — к 16 сут (рис. 6). Таким образом, пролонгация АО активности подтверждает эффективность формирования комплекса β-ЦД-Г.

Для предварительной оценки раздражающего эффекта водного раствора комплекса β-ЦД-Г (2:1 мМоль) при инстиляции в конъюнктивальную полость изучена его кислотность. Известно, эффект раздражения усиливается от 1 до 99 % при снижении pH раствора с 7,3 до 5,9 и при повышении pH с 9,7 до 11,4 [18]. Установлено, что кислотность водного раствора β-ЦД-Г направлена в кислую сторону и составляет (6,73 ± 0,06), что может вызывать слабый раздражающий эффект.

Для уточнения молекулярной структуры комплекса β-ЦД-Г проведена сравнительная с β-ЦД ¹H ЯМР спектроскопия в растворе дейтерированной воды (D₂O).

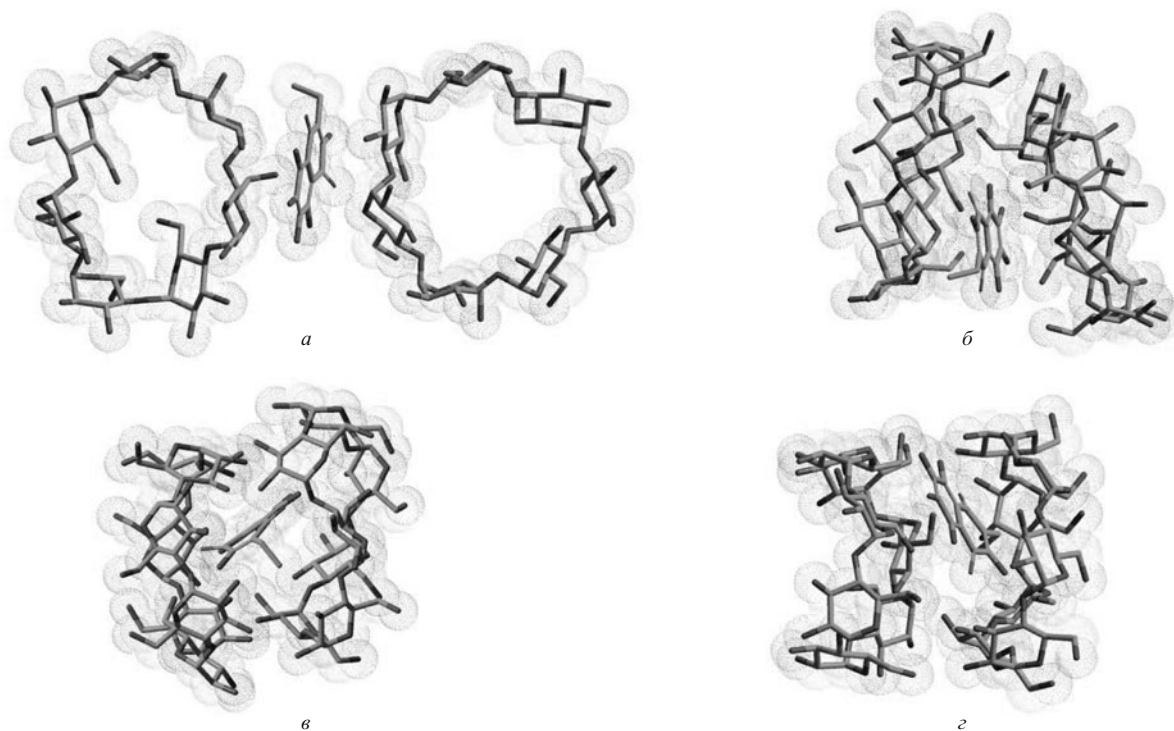


Рис. 7. Структурные модели комплекса β -ЦД-Г: а) комплекс “бок-о-бок”; б) комплекс “хвост-к-хвосту”; в) комплекс “голова-к-голове”; г) комплекс “голова-к-хвосту”.

В ЯМР-спектре (D_2O) β -ЦД фиксировались классические сигналы глюкопиранозного звена (рис. 4) δ , м.д.: 5,01 (д, J 3,6 Гц, 1H, H-1); 3,90 (т, J 9,5 Гц, 1H, H-3); 3,81 (м, 2H, H-6); 3,79 (м, 1H, H-5); 3,59 (д, J 9,5 Гц, д, J 3,6 Гц, 1H, H-2); 3,52 (т, J 9,5 Гц, 1H, H-4). Для синтезированного комплекса β -ЦД-Г в ЯМР-спектре (D_2O) регистрировались следующие сигналы δ , м.д.: 4,99 (д, J 3,7 Гц, 1H, H-1); 3,89 (т, J 9,6 Гц, 1H, H-3); 3,79 (м, 3H, H-6); 3,56 (д, J 9,9 Гц, д, J 3,7 Гц, 1H, H-2); 3,51 (т, J 9,6 Гц, 1H, H-4); 2,58 (кв, J 7,2 Гц, 2H, $-CH_2$); 2,43 (кв, J 7,2 Гц, 2H, $-CH_2$); 1,05 (т, J 7,2 Гц, 3H, $-CH_3$); 0,99 (т, J 7,2 Гц, 3H, $-CH_3$).

При образовании водородной связи между молекулами гистохрома и β -ЦД отмечалось смещение в сильное поле сигналов протонов H-6 $\Delta\delta_{H6} = 0,02$ м. д. По-видимому, это обусловлено формированием водородной связи H-6 с гистохромом, присоединяющимся вне полости β -ЦД. В диапазоне спектра гистохрома, помимо основных пиков, имелось удвоение сигналов в областях 0,97 – 1,00 м.д. и 2,40 – 2,46 м.д., обусловленное наличием в водном растворе конформационных изомеров моновалентных солей гистохрома [2]. Параллельно отмечалось наличие слабовыраженных пиков, возникших вследствие разрушения 12 – 18 % молекул гистохрома в растворе: 1,09 – 1,12 (т, 3 H, CH_3). Таким образом, полученные 1H ЯМР спектры свидетельствуют о формировании комплекса без включения гистохрома в полость β -ЦД.

В завершение проведено компьютерное молекулярное моделирование комплекса β -ЦД-Г с помощью NucleusChem 8.0.8. Молекулярная механика рассчитывалась в режиме MM+ до градиента ниже 0,001. Было

сформировано 4 модели с различным расположением молекулы гистохрома между 2 кавитатами β -ЦД, расположенными “бок-о-бок” (рис. 7, а); узким входом друг к другу (“хвост-к-хвосту”) (рис. 7, б); широким входом друг к другу (“голова-к-голове”) (рис. 7, в); широким входом к узкому (“голова-к-хвосту”) (рис. 7, г).

По результатам расчетов молекулярной механики наименьшей энергией обладал комплекс “голова-к-хвосту”; вторую позицию занял комплекс “голова-к-голове”, разность энергий с комплексом “голова-к-хвосту” которого составила 4,05 %; на третьей позиции оказался комплекс “хвост-к-хвосту”, разность энергий — 11,34 %; на последней позиции оказался комплекс “бок-о-бок”, разность энергий — 20,62 %. Таким образом, установлено, что формирование комплекса “голова-к-хвосту” энергетически является наиболее выгодным, а следовательно наиболее стабильным по отношению к другим формам комплексообразования β -ЦД-Г.

Таким образом, предварительные исследования показали, что оптимальными условиями синтеза комплекса β -ЦД-Г являются температурный диапазон 25 – 45 °С и молярное соотношение β -ЦД:гистохром = 2:1 (мМоль); функциональные преимущества комплекса β -ЦД-Г заключаются в пролонгации антиоксидантной активности гистохрома; 1H ЯМР спектроскопия β -ЦД-Г в растворе D_2O показала комплексообразование без включения гистохрома в полость β -ЦД.

ЛИТЕРАТУРА

1. З. А. Алиева, М. Ю. Султанов, Р. В. Гаджиев и др., *Вестник офтальмол.*, **101**(3), 35 – 38 (1985).
2. В. П. Глазунов, Д. В. Бердышев, В. Л. Новиков, *Известия АН. Сер. хим.*, № 1, 44 – 55 (2010).
3. А. Е. Губарева, *Обмен липидов / Биохимия*, Е. С. Северин (ред.) (2003).
4. Н. А. Никитин, *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, **6**, 3 – 11 (2015).
5. Патент РФ 2530886 (2013); Бюл. изобрет., 29 (2014).
6. Н. П. Чеснокова, Е. В. Понукалина, М. Н. Бизенкова, *Успехи совр. естествознания*, № 7, 37 – 41 (2006).
7. G. Bartosz, *Biochem Pharmacol.*, **77**, 1303 – 1315 (2009).
8. R. F. Brubaker, W. M. Bourne, L. A. Bachman, et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**(7), 1681 – 1683 (2000).
9. J. Čejková, T. Ardan, M. Filipец, et al., *Histol Histopathol.*, **17**(3), 755 – 760 (2002).
10. C. K. Choy, P. Cho, W. Y. Chung, et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **42**(13), 3130 – 3134 (2001).
11. C. Cotagliola, G. Iuliano, M. Menzione, et al., *Exp. Eye Res.*, **43**(6), 905 – 914 (1986).
12. R. K. Crouch, P. Goletz, R. A. Snyder, et al., *J. Ocular Pharmacol. Ther.*, **7**(3), 253 – 258 (1991).
13. J. V. Fecondo, R. C. Augusteyn, *Exp Eye Res.*, **36**(1), 15 – 23 (1983).
14. C. J. Kennedy, P. E. Rakoczy, I. J. Constable, *Eye*, **9**, 763 – 771 (1995).
15. D. V. Ratnam, D. D. Ankola, V. Bhardwaj, et al., *J. Control. Rel.*, **113**(3), 189 – 207 (2006).
16. Р. Р. Фархутдинов, В. А. Лиховских, *Хемилюминесцентные методы исследования свободнорадикального окисления в биологии и медицине*, Уфа (1995).
17. F. B. Pessine, A. Calderini, G. L. Alexandrino, in: *Magnetic Resonance Spectroscopy*, D.-H. Kim (ed.), InTech (2012), pp. 237 – 264.
18. K. J. Falahee, C. S. Rose, S. S. Olin, H. E. Seifried, *Eye irritation testing*, Washington (1981).

Поступила 23.11.15

EXPERIMENTAL STUDY OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF β -CYCLODEXTRIN – HISTOCHROME COMPLEX

M. M. Bikbov¹, N. A. Nikitin¹, V. K. Surkova¹, R. R. Farkhutdinov², L. M. Khalilov³, A. P. Tulyabaev³, A. F. Nikitina¹, S. A. Fedoreev⁴, and N. P. Mishchenko⁴

¹ Ufa Eye Research Institute, Academy of Sciences of the Republic of Bashkortostan, Ufa, Bashkortostan, 450008 Russia

² Bashkir State Medical University, Ufa, Bashkortostan, 450008 Russia

³ Institute of Petrochemistry and Catalysis, Ufa Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Bashkortostan, 450054 Russia

⁴ G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690922 Russia

On the basis of comparative experimental studies of histochrome, a β -cyclodextrin – histochrome complex with 2:1 ratio of components was synthesized. In tests for the duration of *in vitro* antioxidant effect, the proposed complex was compared to equimolar dose of histochrome and showed prolongation of the antioxidant activity from 6 to 16 days against histochrome. The formation of β -cyclodextrin – histochrome complex was proved by the results of ¹H NMR measurements. The results of computer modeling of the β -cyclodextrin-histochrome complex showed that a minimum energy corresponds to the formation of complexes of the “head-to-tail” type.

Keywords: histochrome; emoxypine; β -cyclodextrin; antioxidant activity.