

# ВПЛИВ РІЗНОМЕТАЛІЧНОГО КОМПЛЕКСУ [Cu(dmen)<sub>2</sub>][Fe(CN)<sub>5</sub>(NO)] (dmen=N,N-диметилетилендіамін) НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НИРОК ЩУРІВ

Н.О. Карпезо, к.біол.н., І.В. Бєлінська, к.біол.н., Т.В. Рибальченко, к.біол.н.,  
В.М. Козозей, д.хім.н., В.Г. Маханькова, к.хім.н., В.К. Рибальченко, д.біол.н.  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

**РЕЗЮМЕ.** Досліджено вплив різнометалічного комплексу [Cu(dmen)<sub>2</sub>][Fe(CN)<sub>5</sub>(NO)] (dmen=N,N-диметилетилендіамін, код KL447), на морфо-функціональний стан нирок щурів при субхронічному пероральному введенні його в організм. Встановлено, що KL447 викликає дозозалежну реакцію нирок. У дозі 2,5 мг/кг він був не ефективним. KL447 у дозі 25 мг/кг, яка за вмістом заліза порівнянна з терапевтичною, викликає незначні структурні зміни у нирках. KL447 у дозі 100 мг/кг призводить до ниркової недостатності, обумовленої пошкодженням гломерулярного та каналікулярного апаратів нирок. Ключові слова: різнометалічний комплекс Cu/Fe, нирки.

**РЕЗЮМЕ.** Исследовано влияние разнометаллического комплекса [Cu(dmen)<sub>2</sub>][Fe(CN)<sub>5</sub>(NO)] (dmen=N,N-диметилэтилендиамин) на морфо-функциональное состояние почек крыс при субхроническом пероральном введении его в организм. Установлено, что KL447 вызывает дозозависимую реакцию почек. В дозе 2,5 мг/кг он был не эффективным. KL447 в дозе 25 мг/кг, по содержанию железа сравнимой с терапевтической, вызывает незначительные структурные изменения в почках. KL447 в дозе 100 мг/кг вызывает почечную недостаточность, обусловленную повреждением гломерулярного и каналікулярного аппаратов почек. Ключевые слова: разнометаллический комплекс Cu/Fe, почки

**SUMMARY.** There were investigated the mixed-metal complex [Cu(dmen)<sub>2</sub>][Fe(CN)<sub>5</sub>(NO)] (dmen=N,N-dimethylethylenediamine, code KL447) influence on the morpho-functional condition of the rat kidney after subchronic peroral introduction it during a month. It was established, that KL447 had the dose-dependent action on the kidney. In dose 2,5 mg/kg it wasn't effective. The dose KL447 25 mg/kg according to Fe content is comparable to therapeutic. KL447 in this dose led to unimportant structural changes in kidney. KL447 in dose 100 mg/kg provoked the renal insufficiency with the tubular and glomerular apparatus damages. Key words: mixed-metal complex Cu/Fe, kidney.

Різннометалічний комплекс, одержаний прямим синтезом на хімічному факультеті Київського національного університету імені Тараса Шевченка, [Cu(dmen)<sub>2</sub>][Fe(CN)<sub>5</sub>(NO)] (dmen=N,N-диметилетилендіамін, код KL447) містить атоми міді та заліза. Це робить його потенційним стимулятором кровотворення, зокрема синтезу гемоглобіну, оскільки залізо є складовою частиною останнього, а мідь входить до складу білків, які беруть участь у зв'язуванні та транспорті іонів заліза та синтезі молекули гемоглобіну. Показано, що KL447 впливає на метаболізм заліза і міді при експериментальній анемії [1].

Вивчення впливу будь-якої хімічної сполуки на організм потребує детального дослідження її токсичної дії. Використовуючи поведінкові реакції як інтегральний показник фізіологічного стану організму та впливу на нервову систему хімічних речовин, ми показали, що різнометалічний комплекс KL447 сприяє зниженню тривожності та зростанню орієнтовно-дослідницької активності щурів, тобто не має токсичної дії на ЦНС [2].

Досліджуваний комплекс у дозі 25 мг/кг, порівнянний за вмістом заліза з терапевтичною дозою, хоча і викликає певні структурні та

функціональні зміни у печінці щурів, не призводить до незворотних її пошкоджень. А значні морфо-функціональні зміни у печінці щурів відбуваються лише при дії KL447 у дозі 100 мг/кг [3].

Нирки відіграють важливу роль у метаболізмі та виведенні значної кількості речовин і водночас є одним з найчутливіших органів до дії шкідливих факторів. Аналіз морфо-функціонального стану нирок при дії KL447 особливо доцільний тому, що вони разом із печінкою депонують і виводять залізо і мідь [4, 5], які містить дана сполука. Важливо підкреслити, що сполуки заліза, і особливо міді, є досить токсичними речовинами [6].

## Матеріали та методи дослідження

Досліди проведено на самках нелінійних білих щурів з початковою масою 160-190 г. Щурів утримували при стандартному світловому дні на нормальному харчовому раціоні. KL447, розведений у дистильованій воді, вводили протягом місяця інтрагастрально за допомогою зонду щоденно вранці до годування тварин у дозах 2,5 мг/кг, 25 мг/кг та 100 мг/кг. Контрольні тварини отримували дистильовану воду.

Для гістологічного аналізу нирки фіксували у рідині Буена, після стандартної гістологічної

Вплив різнометалічного комплексу KL447 на гломерулярний апарат нефронів у кортикомедулярній зоні коркового шару нирок щурів ( $M \pm m$ )

Серія досліджу	Площа, мкм <sup>2</sup>		
	Капсул Шумлянського-Боумена	Судинних клубочків	Просвіту капсул
Контроль	5366±320,4	4235±396,3	1148±80,5
2,5 мг/кг	5392±301,7	4218±305,1	1107±89,4
25 мг/кг	5579±330,9	4678±367,7	901±109,1
100 мг/кг (всі)	5583±539,1	4472±420,5	1110±353,2
100 мг/кг (не змінені)	5768±492,3	4409±422,6	1358±305,4
100 мг/кг (змінені)	4645±335,6* #	4455±315,9	190±71,4* #

\* — позначено вірогідні зміни відносно контролю при  $P \leq 0,05$

# — позначено вірогідні зміни відносно не змінених капсул при дії різнометалічного комплексу KL447 у дозі 100 мг/кг при  $P \leq 0,05$

обробки заливали у парафін, робили зрізи товщиною 5–7 мкм та забарвлювали їх гематоксиліном Бюмера з дофарбуванням еозином та оранжем G [7, 8]. Функціональний стан нирок оцінювали, базуючись на візуальному аналізі препаратів та морфометричних вимірах. У кортикомедулярній зоні кіркового шару нирок вимірювали площі поперечного перерізу капсул Шумлянського-Боумена та судинних клубочків (мкм<sup>2</sup>), вираховували площі вільного простору капсул у (мкм<sup>2</sup>); вимірювали висоту епітелію проксимальних та дистальних каналців нефронів (мкм). Морфометричні дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопа Olympus BX-41 та програми Image J. Статистичну обробку результатів проводили з використанням t критерію Стьюдента. Для відповідних розрахунків використовували стандартний пакет програм статистичного аналізу Microsoft Excel 2007 для персонального комп'ютера. Вірогідною вважалась різниця між дослідом і контролем при значенні  $p \leq 0,05$ .

#### Результати та їх обговорення

Морфологія нирок добре вивчена [9–11]. У щурів контрольної групи нирки мають типову для цього виду тварин будову. Інтракорткальні судинні клубочки, що розміщені в середній зоні кори і становлять приблизно 60–70 % від їх загальної кількості, відіграють основну роль у фільтрації. Саме тому увагу було зосереджено на цій зоні кіркового шару нирок. Капсули Шумлянського-Боумена (5366 320,4 мкм<sup>2</sup>) містять судинні клубочки (4235 396,3 мкм<sup>2</sup>), капілярні петлі яких утворюють сферичну структуру, вільно розташовану у капсулі. Вони мають рівномірне помірне або інтенсивне кровонаповнення. Просвіт між вісцеральним і парієнтальним листками капсули Шумлянського-Боумена дорівнює 1148 80,5 мкм<sup>2</sup>, що

становить 21.4 3,9 % об'єму капсули. У нирках контрольних щурів базальні мембрани каналців та капсул Шумлянського-Боумена добре виражені (табл. 1).

Проксимальні звивисті каналці нирок, утворені епітеліоцитами кубічної або призматичної форми, мають еозинофільну цитоплазму, містять сферичні ядра, локалізовані ближче до базальної мембрани. Клітини мають добре виражену щіткову облямівку апікального краю. Просвіти проксимальних каналців незначні. Висота епітелію проксимальних каналців дорівнює 8,56 0,68 мкм. Епітеліоцити дистальних каналців нирок мають кубічну або дещо сплюснену форму, їх цитоплазма слабо еозинофільна, світла. Ядра епітеліоцитів світлі, округлі або овальні, розташовані у центрі клітини або дещо зміщені до її апікального полюсу. Висота епітелію дистальних каналців становить 6,44 0,09 мкм (рис.1). Дистальні каналці мають значний просвіт, що не має вмісту.

Різннометалічний комплекс KL447 у дозі 2,5 мг/кг не впливає на морфо-функціональний стан нирок щурів. У гломерулярному апараті кортикомедулярної зони нирок не відбувається структурних змін: площі поперечного перерізу капсул Шумлянського-Боумена (5392 301,7 мкм<sup>2</sup>), судинних клубочків (4218 305,1 мкм<sup>2</sup>) та, відповідно, просвіту капсул (1148 80,5 мкм<sup>2</sup>) залишаються на рівні контролю (табл. 1). Не змінюється висота епітелію проксимальних (8,54 0,59 мкм) та дистальних (6,38 0,34 мкм) каналців (рис. 1).

Під впливом різнометалічного комплексу KL447 у дозі 25 мг/кг у нирках переважної більшості щурів істотних структурних змін не викликає. Площі поперечного перерізу капсул Шумлянського-Боумена (5579 330,9 мкм<sup>2</sup>) та судинних клубочків (4678 367,7 мкм<sup>2</sup>) залиша-

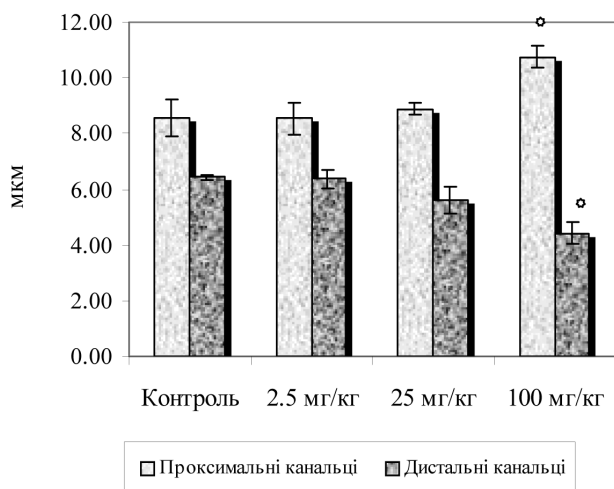


Рис. 1. Вплив різнометалічного комплексу KL447 на висоту епітелію проксимальних і дистальних каналців у кортикомедулярній зоні коркового шару нирок щурів.  
\* - позначено вірогідні зміни відносно контролю при  $P \leq 0,05$

ються майже такими ж, як у контрольних тварин. Проте частина капсул Шумлянського-Боумена і судинних клубочків трохи збільшуються у розмірах, а в окремих щурів з'являються поодинокі зменшені капсули Шумлянського-Боумена, весь просвіт яких займає судинний клубочок. Капсулярний простір практично не змінюється і дорівнює  $901\,109,1\text{ мкм}^2$ , що становить 19,3 % від площі поперечного перерізу капсули (табл. 1). Структура каналців також істотно не змінюється, лише в деяких щурів невеликі ділянки кіркового шару мають розширені дистальні каналці, стінки яких утворені сплюсненими епітеліоцитами. Висота епітеліальної стінки проксимальних каналців залишається на рівні контролю ( $8,87\,0,21\text{ мкм}$ ), а висота дистальних каналців має тенденцію до зменшення ( $5,63\,0,49\text{ мкм}$ ) (рис. 1). Помітних змін мікроциркуляторного русла не виявлено.

Після впливу різнометалічного комплексу KL447 у дозі 100 мг/кг нирки щурів зазнають суттєвих структурних змін, які проявляються вже в підкапсулярній зоні нирок. При цьому у нирках є зони майже не змінені, а є такі, які відреагували на дію KL447. Співвідношення їх у різних особин різне. Так, серед незмінених капсул Шумлянського-Боумена з'являються поодинокі або розміщені групами (фокальна глобальна гломерулопатія), найчастіше зменшені, капсули, в яких судинні клубочки займають весь об'єм капсули або, навпаки, дуже стиснені до одного її краю. В таких клубочках помітно зменшується кількість мезангіоцитів, про що свідчить зменшення кількості ядер у центральній зоні клубочкової часточки. Є капсули, в яких клубочки перетворюються на майже гомогенну масу з окремими ядрами. У дея-

ких клубочках чітко виражені часточки, переповнені еритроцитами. Іноді еритроцити виявлено і в порожнині капсули Шумлянського-Боумена. Кількість змінених капсул становить в окремих особин від 5,7 до 25,7 %, (в середньому 16,9 %). Середні значення площ поперечного перерізу капсул Шумлянського-Боумена ( $5583\,539,1\text{ мкм}^2$ ), судинних клубочків ( $4472\,420,5\text{ мкм}^2$ ) та капсулярного простору ( $1110\,353,2\text{ мкм}^2$ ) не змінюються, проте детальний аналіз їх розмірів показав, що значна частина капсул Шумлянського-Боумена, хоча і не відрізняється вірогідно від контролю, має тенденцію до збільшення ( $5768\,492,3\text{ мкм}^2$ ), а приблизно 30% капсул вірогідно менші за контроль ( $4645\,335,6\text{ мкм}^2$ ). Площі перерізу судинних клубочків як у незмінених ( $4409\,422,6\text{ мкм}^2$ ), так і у змінених ( $4455\,315,9\text{ мкм}^2$ ) капсулах Шумлянського-Боумена однакові. Проте капсулярний простір у змінених капсулах Шумлянського-Боумена, внаслідок зменшення розмірів самих капсул, на порядок зменшується і становить  $190\,71,4\text{ мкм}^2$  (табл. 1), що становить 4,42 0,39 % від розмірів капсул на відміну від 21.4 3,9 % у контролі.

Значні зміни відбуваються і у каналікулярному апараті нирок. Серед майже незмінених є зони, де проксимальні каналці зовсім не мають просвіту або він заповнений еозинофільним вмістом, а дистальні каналці дуже розширені. У різних особин відрізняється співвідношення незмінених і пошкоджених зон. Між каналцями, найчастіше поблизу капсул Шумлянського-Боумена, з'являються скупчення еритроцитів, що є результатом стазу крові у приносних судинах та крововиливів. Проксимальні каналці мають високий епітелій, утворений призматичними клітинами. Висота його становить  $10,76\,0,38\text{ мкм}$ , що вірогідно більше за контроль. Цитоплазма епітеліоцитів інтенсивно еозинофільна, в більшості клітин ядра зміщуються до їх центру або навіть до апікального краю. Такі структурні зміни епітеліоцитів є ознакою зернистої дистрофії та свідчать про резорбційну недостатність проксимальних каналців [9], зокрема про порушення реабсорбції білка. Дистальні каналці дуже розширені, а клітини епітеліального шару сплюснені та часто з ознаками деструкції. Апікальна частина значної кількості клітин епітелію дистальних каналців зруйнована. Відбувається десквамація епітелію, тобто злушення його аж до базальної мембрани. Висота епітелію вірогідно зменшується відносно контролю і становить  $4,42\,0,39\text{ мкм}$  (рис. 1). Зміни у дистальних каналцях зумовлені як безпосередньою дією на них різнометалічного комплексу KL447, так і недостатністю функції проксимальних каналців. Ядра епітеліоцитів

як проксимальних, так і дистальних каналців часто набувають неправильної форми і стають гіперхромними.

Отримані дані свідчать про певну нефротоксичність різнометалічного комплексу KL447, перші ознаки якої з'являються вже при дії комплексу у дозі 25 мг/кг. При дії KL447 у дозі 100 мг/кг за цілою низкою ознак [10-12] розвивається ниркова недостатність, обумовлена поєднанням порушень функції судинних клубочків та каналців, що призвело до зменшення рівня маси діючих нефронів. Важливо підкреслити, що KL447 у дозі 25 мг/кг, що за вмістом заліза є порівнянною з терапевтич-

ною, не викликає істотних морфофункціональних змін у нирках.

#### Висновки:

1. KL447 у дозі 100 мг/кг викликає порушення структури і функції судинних клубочків та епітелію проксимальних і дистальних звивистих каналців, що призводить до ниркової недостатності.
2. KL447 у дозі 25 мг/кг, яка за вмістом заліза порівнянна з терапевтичною, не викликає суттєвих структурних змін у нирках.
3. KL447 у дозі 2,5 мг/кг не впливає на нирки щурів.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Byelinska I. Influence of the mixed-metal Cu/Fe complex [Cu(dmen)<sub>2</sub>][Fe(CN)<sub>5</sub>(NO)] (dmen=N,N-dimethylethylenediamine) on serum iron and copper levels in experimental anemia of rats / I. Byelinska, T. Rybalcheko, V. Kokozay [et al.] // *Annales universitatis Mariae Curie-Sclodowska. Lublin-Polonia.* — 2010. — Sectio DDD. — Vol. XXIII, N3. — P.221-225.
2. Карпезо Н.О. Вплив різнометалічного комплексу [Cu(dmen)<sub>2</sub>][Fe(CN)<sub>5</sub>(NO)] (dmen=N,N-диметилетилендіамін) на поведінкові реакції щурів / Н.О. Карпезо, І.В. Белінська, В.М. Козозей [та ін.] // *Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології* — 2009 — Вип. 8(95). — С. 36-42.
3. Карпезо Н.О. Вплив різнометалічного комплексу [Cu(dmen)<sub>2</sub>][Fe(CN)<sub>5</sub>(NO)](dmen=N,N-диметилетилендіамін) на морфофункціональний стан печінки / Н.О. Карпезо, І.В. Белінська, В.К. Рибальченко [та ін.] // *Доповіді Національної академії наук України.* — 2011. — №3. — С. 158-163.
4. Хендерсон Д.М. Патолофізіологія органів травлення / Д.М. Хендерсон — М. Из-во БИНОМ, 2005 — 272 с.
5. Schumann K. Hohenheim Consensus Workshop: Copper / K. Schumann, H.G. Classen, H.H. Dieter, J. Konig [et al.] // *European Journal of Chemical Nutrition.* — 2002. — 56. — С. 469-483.
6. Вредные вещества в промышленности. Справочник для химиков инженеров и врачей. Т.Ш Неорганические и элементорганические соединения / [Под ред. Н.В. Лазарева и И.Д. Гадаскиной]. — Л. "Химия". — 1977. — 608 с.
7. Лилли Р. Патологистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лилли — М.: Мир, 1969. — 650 с.
8. Горальський Л.П. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології. Навчальний посібник / Л.П. Горальський, В.Т. Хомич, О.І. Кононський. — Житомир: Полісся, 2005. — 288 с.
9. Серов В.В. Морфогенез дистрофії нефроцитів / В.В. Серов, В.А. Варшавський, Т.И. Ковтун, Л.А. Куприянова // *Архив патологии* — 1983 — Вип. 1. — С. 25-33.
10. Возианов А.Ф. Болезни почек. Атлас макропатологии и микропатологии / А.Ф. Возианов, Д.Д. Зербино, А.В. Шуляк. — Львов: Издательский дом "Наутилус", 2003. — 214 с.
11. Урология. Национальное руководство / [под ред. акад. РАМН Н.А. Лопаткина]. — Москва "ГЭОТАР-Медиа" 2009. — 1021 с.
12. Нефрология. Руководство для врачей / [под. ред. И.Е. Тареевой]. — М. "Медицина". — 2000. — 688 с.

Надійшла до редакції 18.05.2011 р.і