

ГЕМАТОТОКСИЧНІСТЬ РІЗНОМЕТАЛІЧНОГО КОМПЛЕКСУ $[\text{Cu}(\text{dmen})_2][\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$

I.В. Белінська, к.біол.н., Т.В. Рибальченко, к.біол.н., В.М. Кокозей, д.хім.н.,
Н.О.Карпезо, к.біол.н., О.М. Гурняк, к.біол.н., В.К. Рибальченко, д.біол.н
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м.Київ

РЕЗЮМЕ. Різнометалічний комплекс $[\text{Cu}(\text{dmen})_2][\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$ (dmen N,N-диметилетилендіамін, код KL447) містить іони міді (II) і заліза (II). KL447 в дозах 2,5 і 25 мг/кг, які не перевищують терапевтичні дози за вмістом заліза, протягом місячного введення не впливає на показники крові щурів. Введення протягом місяця KL447 в дозі 100 мг/кг, яка в 4 рази перевищує терапевтичну дозу заліза і майже у 200 разів міді, призводить до зменшення концентрації гемоглобіну і кількості еритроцитів у крові, а також середньої концентрації гемоглобіну в еритроцитах, збільшення середнього об'єму еритроцитів та кількості ретикулоцитів, що може свідчити про розвиток гемолітичної анемії. Дія KL447 призводить до незначної еозинофілії, інші показники лейкоцитів (загальна кількість лейкоцитів і лейкоцитарний склад) після впливу всіх досліджених доз не змінюються.

Ключові слова: різнометалічний Cu/Fe комплекс, гематотоксичність, еритроцити, лейкоцити.

РЕЗЮМЕ. Разнометаллический комплекс $[\text{Cu}(\text{dmen})_2][\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$ (dmen N,N-диметилэтилендиамин, код KL447) содержит ионы меди (II) и железа (II). KL447 в дозах 2,5 и 25 мг/кг, которые не превышают терапевтические дозы по содержанию железа, не влияет на показатели крови крыс после месячного введения. Введение KL447 в дозе 100 мг/кг, которая превышает по содержанию железа терапевтическую дозу в 4 раза, а меди — почти в 200 раз, на протяжении месяца приводит к уменьшению концентрации гемоглобина и количества эритроцитов в крови, а также средней концентрации гемоглобина в эритроцитах, увеличению среднего объема эритроцитов и количества ретикулоцитов, что может свидетельствовать о развитии гемолитической анемии. Действие KL447 приводит к незначительной эозинофилии, другие показатели лейкоцитов (общее количество и лейкоцитарный состав) при действии всех исследуемых доз не изменяются.

Ключевые слова: разнометаллический Cu/Fe комплекс, гематотоксичность, эритроциты, лейкоциты.

SUMMARY. The mixed-metal Cu/Fe complex $[\text{Cu}(\text{dmen})_2][\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$ (dmen N,N-dimethylethylenediamine, code KL447) contains copper (II) and iron (II). KL447 at doses of 2.5 and 25 mg/kg, which does not exceed the therapeutic dose of iron, does not affect the blood parameters of rats after a month of administration. There were investigated hematotoxicity of KL447 in dose 100 mg/kg, which exceeds the iron content of the therapeutic dose is 4 times, and copper — to 200-fold, during month of the introduction shows a significant decrease in the concentration of hemoglobin and red blood cell count in the blood, mean hemoglobin concentration in red blood cells, the number of reticulocytes and the mean volume of red blood cells significantly increased. Such changes suggest development of hemolytic anemia. The effect of KL447 leads to an increase in the number of eosinophils in the blood, other parameters of leukocytes (total and leukocyte composition) in all studied doses do not change.

Key words: mixed-metal Cu/Fe complex, hematotoxicity, red blood cells, leukocytes.

Різнометалічні комплексні сполуки, що містять два або більше різних за природою металів в одній сполуці, можуть мати меншу токсичність у порівнянні з оксидами або солями цих металів [1-3], що надає перевагу при їх використанні в біології та медицині [4]. В попередніх дослідженнях показано, що ці сполуки мають мембранотропну активність (взаємодіють з природними і штучними мембранами, змінюють активність мембранозв'язаних ферментів) [5], антимікробні, фунгіцидні [6] та протипухлинні властивості [7]. Саме це і дозволяє розглядати їх як потенційні лікувальні речовини

Різнометалічний комплекс $[\text{Cu}(\text{dmen})_2][\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$ (dmen N,N-диметилетилендіамін, код KL447) був одержаний прямим синтезом у міжфакультетській НДЛ "Біологічно активні речовини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка, містить іони міді (II) і заліза (II). KL447 і нітропрурид натрію $[\text{Cu}(\text{dmen})_2][\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ мають однаковий аніон. Нітропрурид є донором оксиду азоту і судинорозширювальним препаратом [8]. Введення до складу цієї сполуки міді може змінити її властивості. Адже доведено: введення до складу існуючих ан-

тибіотиків іонів різних металів (Cu, Co, Ni, Zn) підсилює антимікробну дію останніх [9]. KL447 впливає на метаболізм заліза і міді [10], які, в свою чергу, відіграють важливу роль у диференціюванні та функціонуванні клітин крові [11]. Виходячи з цього, дослідження ймовірних ефектів даного комплексу на клітини крові є актуальним.

Метою даної роботи було дослідити вплив різних доз KL447 на показники крові щурів після місячного введення для встановлення гематоксичної дії даної сполуки.

Матеріали і методи дослідження. Досліди проведені на безпородних білих самках щурів з початковою масою 160-190 г. Щурів утримували при стандартному світловому дні на нормальному харчовому раціоні. KL447 розводили у дистильованій воді в дозах 2,5, 25 і 100 мг/кг та вводили зондом per os протягом 4-х тижнів (5 днів на тиждень) вранці до годування тварин. KL447 у дозі 25 мг/кг містить 3 мг/кг заліза, що відповідає терапевтичній дозі, і 3,5 мг/кг міді. Доза 100 мг/кг перевищує за вмістом заліза терапевтичну дозу у 4 рази, а міді — майже у 200 раз. Щурам контрольної групи вводили per os дистильовану воду. В

кожній групі було по 8 щурів. Показники крові визначали загальноприйнятими методами перед дослідом (вихідні показники) та після місячного введення досліджуваної речовини.

Математичну обробку експериментальних даних проводили з використанням програми SPSS-16.0. Для визначення вірогідних відмінностей між величинами використовували однофакторний дисперсійний аналіз з критерієм Даннета (q).

Результати досліджень та їх обговорення
Вихідні значення основних показників крові контрольної та експериментальних груп істотно не відрізняються і знаходяться в межах фізіологічних значень (табл. 1).

KL447 після місячного введення в дозах 2,5 і 25 мг/кг не впливає на концентрацію гемоглобіну і кількість еритроцитів у крові, а в дозі

100 мг/кг — призводить до вірогідного їх зниження (рис. 1, 2). Не виявлено істотного впливу KL447 у всіх досліджених дозах на гематокрит (рис. 3) і вміст гемоглобіну в еритроцитах (рис. 4).

У максимальній досліджуваній дозі KL447 призводить до зменшення середньої концентрації гемоглобіну в еритроцитах (рис. 5) і збільшення середнього об'єму еритроцитів (рис. 6) та кількості ретикулоцитів (рис. 7, 8А, 8Б). У всіх щурів у мазках крові виявляються 1-2 оксифільних або поліхроматофільних нормобластів (рис. 8 В) в середньому на 200 лейкоцитів, що свідчить про істотну стимуляцію еритроїдної ланки гемопоєзу і виходу ядерних попередників еритроцитів із кісткового мозку в кров.

Аналізуючи комплекс змін в еритроїдній

Таблиця 1

Вихідні показники (М ± m) крові щурів

Група	Гемоглобін, г/л	Еритроцити, $\times 10^{12}/\text{л}$	МСН, пг	Лейкоцити, $\times 10^9/\text{л}$
Контрольна група	154,1 ± 3,60	8,00 ± 0,14	19,26 ± 0,17	18,28 ± 2,02
KL447 2,5 мг/кг	158,63 ± 4,18	8,01 ± 0,10	19,78 ± 0,34	23,76 ± 2,58
KL447 25 мг/кг	149 ± 1,94	7,76 ± 0,06	19,21 ± 0,17	19,68 ± 1,64
KL447 100 мг/кг	154,1 ± 4,30	7,86 ± 0,22	19,62 ± 0,21	21,05 ± 1,06

Примітка: МСН — середній вміст гемоглобіну в еритроцитах

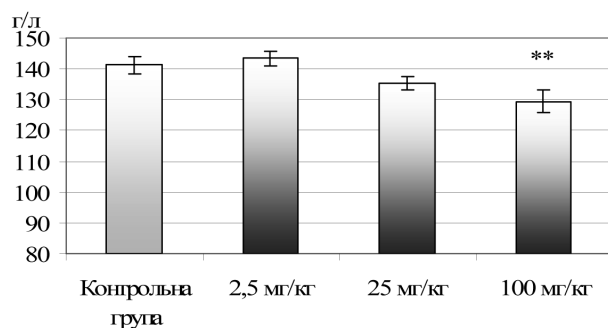


Рис. 1. Вплив KL447 на концентрацію гемоглобіну в крові
Примітка: ** $p < 0,01$ у порівнянні з контрольною групою

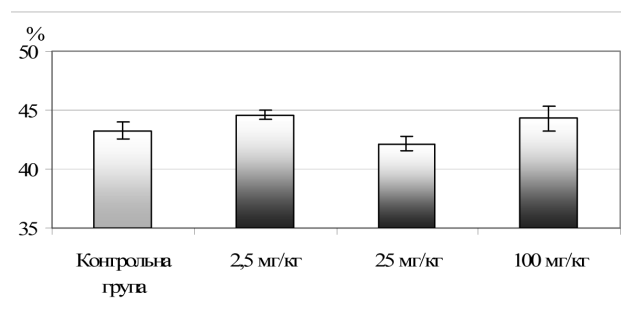


Рис. 3. Вплив KL447 на гематокрит

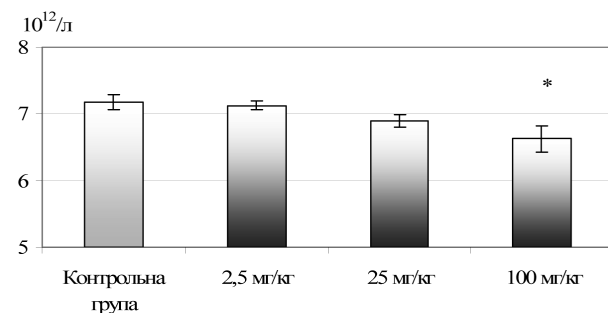


Рис. 2. Вплив KL447 на кількість еритроцитів
Примітка: * $p < 0,05$ у порівнянні з контрольною групою

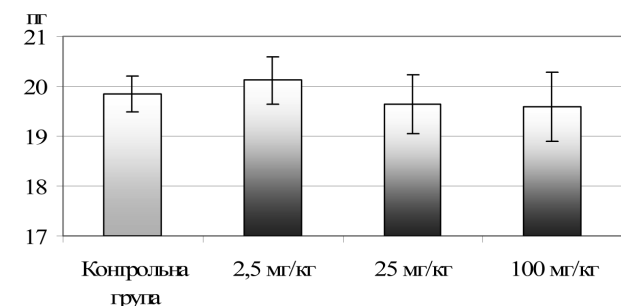


Рис. 4. Вплив KL447 на середній вміст гемоглобіну в еритроцитах (МСН)

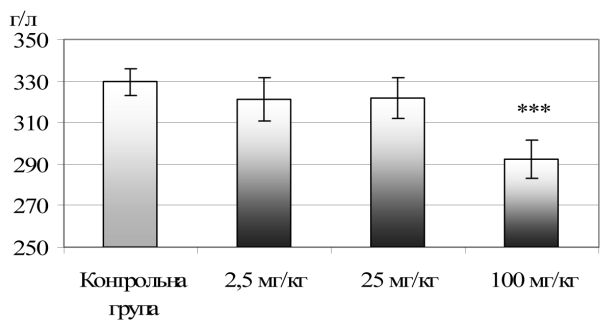


Рис. 5. Вплив KL447 на середню концентрацію гемоглобіну в еритроцитах (MCHC)

Примітка: *** $p < 0,001$ у порівнянні з контрольною групою

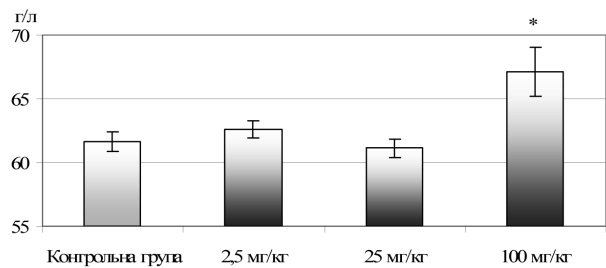


Рис. 6. Вплив KL447 на динаміку середнього об'єму еритроцитів (MCV)

Примітка: *** $p < 0,001$ у порівнянні з контрольною групою

лінії крові, можна припустити, що KL447 у дозі 100 мг/кг призводить до гемолізу еритроцитів, про що свідчить зменшення концентрації гемоглобіну і кількості еритроцитів у крові і компенсується збільшенням кількості ретикулоцитів. Оскільки ретикулоцити є молодими еритроцитами [11], вони мають більший об'єм, що підтверджується в даному дослідженні

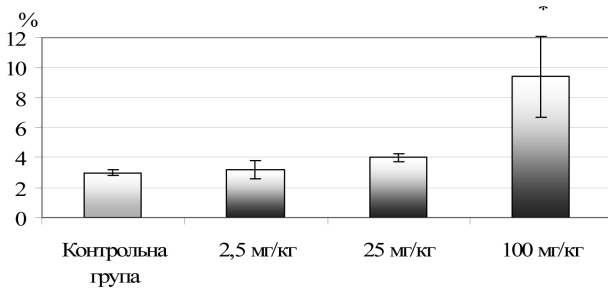


Рис. 7. Вплив KL447 на кількість ретикулоцитів в крові
Примітка: * $p < 0,05$ у порівнянні з контрольною групою

підвищенням середнього об'єму еритроцитів. Аналогічні результати одержано в наших попередніх дослідженнях експериментальної моделі анемії, яку створювали за допомогою крововтрат [12]. Крім того, в ретикулоцитах незавершений синтез гемоглобіну, тому ми реєструємо зменшення середньої концентрації гемоглобіну в еритроцитах (MCHC).

KL447 не впливає на загальну кількість лейкоцитів у крові в усіх досліджених дозах. У найменшій дозі 2,5 мг/кг дія KL447 призводить до еозинофілії, в дозах 25 і 100 мг/кг є тенденція до збільшення кількості еозинофілів. Інші показники лейкоцитарного складу не змінюються (табл.2). Із морфологічних особливостей лейкоцитів привертає увагу вакуолізація лімфоцитів (рис. 8 Г) і моноцитів крові. Якщо для моноцитів вакуолізація характерна в нормі, то для лімфоцитів є ознакою патологічних процесів: лейкозів, лімфопроліферативних [11] та метаболічних захворювань [14].

Токсичний вплив KL447 може бути обумовлений іонами міді та заліза, які входять до його складу. Відомо, що їх надлишок призводить до

Таблиця 2

Вплив KL447 на кількість лейкоцитів і показники лейкограм шурів ($M \pm m$)

Група	Лейкоцити, $\times 10^9/\text{л}$	Еозинофільні гранулоцити		Паличкоядерні нейтрофільні гранулоцити		Сегментоядерні нейтрофільні гранулоцити		Лімфоцити		Моноцити	
		%	$\times 10^9/\text{л}$	%	$\times 10^9/\text{л}$	%	$\times 10^9/\text{л}$	%	$\times 10^9/\text{л}$	%	$\times 10^9/\text{л}$
Контрольна група	$19,34 \pm 2,06$	$0,44 \pm 0,20$	$0,09 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,13$	$0,07 \pm 0,03$	$13,94 \pm 0,96$	$2,64 \pm 0,23$	$78,56 \pm 1,35$	$15,26 \pm 1,75$	$6,75 \pm 0,51$	$1,29 \pm 0,14$
KL447 2,5 мг/кг	$18,18 \pm 1,49$	$3,50 \pm 0,59^*$	$0,60 \pm 0,09^*$	$0,50 \pm 0,25$	$0,08 \pm 0,04$	$14,31 \pm 1,06$	$2,52 \pm 0,15$	$75,44 \pm 2,09$	$13,88 \pm 1,43$	$6,25 \pm 1,19$	$1,11 \pm 0,22$
KL447 25 мг/кг	$19,94 \pm 1,80$	$1,81 \pm 0,48$	$0,37 \pm 0,10$	$0,50 \pm 0,19$	$0,12 \pm 0,06$	$12,88 \pm 1,68$	$2,63 \pm 0,48$	$76,44 \pm 1,02$	$15,15 \pm 1,22$	$8,38 \pm 1,09$	$1,66 \pm 0,24$
KL447 100 мг/кг	$18,46 \pm 1,52$	$2,06 \pm 0,74$	$0,35 \pm 0,07$	$0,75 \pm 0,21$	$0,13 \pm 0,11$	$14,25 \pm 1,64$	$2,57 \pm 0,32$	$77,19 \pm 1,83$	$14,33 \pm 1,34$	$5,75 \pm 0,63$	$1,07 \pm 0,18$

Примітка: * $p < 0,05$ у порівнянні з контрольною групою

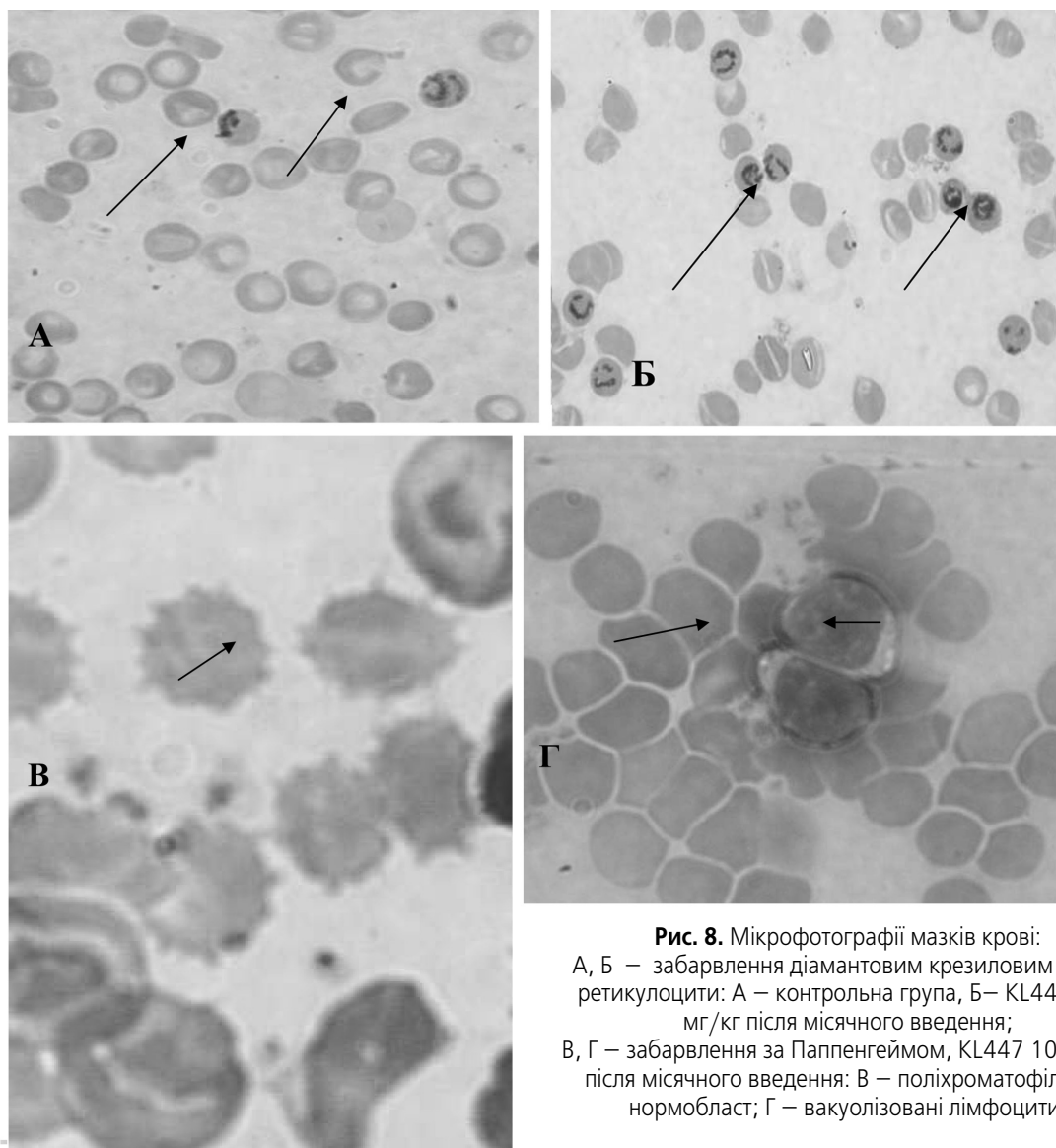


Рис. 8. Мікрофотографії мазків крові:
 А, Б – забарвлення діамантовим крезіловим синім, ретикулоцити: А – контрольна група, Б– KL447 100 мг/кг після місячного введення;
 В, Г – забарвлення за Паппенгеймом, KL447 100 мг/кг після місячного введення: В – поліхроматофільний нормобласт; Г – вакуолізовані лімфоцити.

гемолізу еритроцитів [11, 13], оскільки вони каталізують утворення вільних радикалів, які взаємодіють з білками цитоскелета і мембран та запускають процес перекисного окиснення ліпідів. Необхідно зазначити, що токсична дія вказаних металів призводить до змін кількості нейтрофільних гранулоцитів. У наших же дослідженнях кількість цих клітин залишається в межах норми, хоча дози металів істотно перевищують терапевтичні та вводились протягом місяця. Це свідчить про меншу токсичність металів у складі комплексних сполук порівняно з ефектами їх простих солей.

Таким чином, різнометалічний комплекс KL447 $[\text{Cu}(\text{dmen})_2][\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$ у дозах 2,5 і 25 мг/кг, які не перевищують терапевтичні до-

зи за вмістом заліза, протягом місячного введення істотно не впливає на показники крові щурів. Введення протягом місяця KL447 у дозі 100 мг/кг, яка в 4 рази перевищує терапевтичну дозу заліза і майже у 200 разів міді, призводить до зменшення концентрації гемоглобіну і кількості еритроцитів у крові, а також середньої концентрації гемоглобіну в еритроцитах, збільшення середнього об'єму еритроцитів та кількості ретикулоцитів, що може свідчити про розвиток гемолітичної анемії. Дія KL447 призводить до незначної еозинофілії та вакуолізації лімфоцитів, інші показники лейкоцитів (кількість і лейкоцитарний склад) істотно не змінюються.

ЛІТЕРАТУРА

1. Григор'єва Г.С. Координаційні сполуки d-перехідних металів / Г.С. Григор'єва Г.С., Л.М. Киричок // *Современные проблемы токсикологии*. — 1998. — №1 — с.21—24.
2. Параметри гострої токсичності хлоридного комплексу Cu/Zn з етилендіаміном при одноразовому введенні per os / І.Белінська, Т.Рибальченко, В.Кокозей, О.Нестерова // *Вісник Київського національного університету. Біологія*. — 2008. — Вип.52-53. — С.67—68.
3. Гематотоксичність хлоридного комплексу Cu/Zn з етилендіаміном при однократному введенні / І.В.Белінська, Т.В.Рибальченко, В.М.Кокозей [та ін.] // *Совр. Пробл. Токсикологии*. — 2008. — №2. — С.20—24.
4. Gielen M. Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: The Use of Metals in Medicine / M. Gielen, E.R. Tekink. // John Wiley & Sons, 2005 — 561 p.
5. Мембранотропная активность гетерополиядерных комплексов Cu(II)/Co(II) с диэтанололамином / Е.М. Филинская, Т.В. Рыбальченко, Г.В. Островская [та ін.] // *Доповіди НАН України*. — 2008. — №7. — С.179—183.
6. Формування резистентності грамнегативних та грампозитивних тест-культур до ацетатного комплексу Cu/Cd з етилендіаміном / Т.М. Фурзікова, Н.В. Яворська, В.В. Позур [та ін.] // *Буковинський медичний вісник*. — 2008. — Том 12, №2. — С.82—83.
7. Патент України на корисну модель № 36261, C01G 1/00, A61K 31/13, A61K 31/30. Застосування ацетатного комплексу міді та кадмію з етилендіаміном як протипухлинного та антиметастатичного засобу / В.М. Кокозей, Л.В. Гарманчук, О.В. Нестерова [та ін.]. — Бюл. № 20, 2008.
8. Newcomer S.C. Heterogeneous Vasodilator Responses of Human Limbs: Influence of Age and Habitual Endurance Training / S.C. Newcomer, U.A. Leuenberger, C.S. Hogeman, D.N. Proctor // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* — 2005. — V.58, N1. — P.H308—H315.
9. Chohan Z.H. Metal binding and antibacterial activity of ciprofloxacin complexes / Z.H. Chohan, C.T. Supuran, A. Scozzafava // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. — 2005. — V. 20, N.3. — P.303—307.
10. Influence of the mixed-metal Cu/Fe complex [Cu(dmen)2][Fe(CN)5(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.
11. Williams Hematology / M.A. Lichtman, T.J. Kipps, U. Seligsohn [et al.] — [8-th edition]. — USA: The McGraw-Hill Companies, 2010. — 2297 p.
12. Белінська І.В. Експериментальна анемія: динаміка показників крові і еритроцитарних індексів та вміст заліза і міді на піку анемії у щурів / І.В. Белінська // *Український журнал гематології та трансфузіології*. — 2010. — №5(10). — С. 36 — 42.
13. Hohenheim Consensus Workshop: Copper / K. Schumann, H.G. Classen, H.H. Dieter [et al.] // *Eur. J. Clin. Nutr.* — 2002. — V. 56, N. 6. — P. 469-483.
14. Anderson G. Blood film examination for vacuolated lymphocytes in the diagnosis of metabolic disorders; retrospective experience of more than 2500 cases from a single centre / G. Anderson, V.V. Smith, M. Malone, N.J. Sebire // *J. Clin. Pathol.* — 2005. — V.58. — P.1305-1310.

Надійшла до редакції 17.08.2011 р.