

мікроскопії було показано, що після виділення та криоконсервування ядровмісних клітин кордової крові спостерігається висока збереженість ультраструктури. Виявлені зміни органел ядровмісних клітин кордової крові лежать в межах фізіологічної компенсації та можуть бути відновлені репаративними можливостями клітин, що корелює з отриманими нами даними по їх життєздатності.

Ключові слова: ядровмісні клітини, кордова кров, криоконсервування, ультраструктура, життєздатність.

UDC 612.112.086.3:57.043

EVALUATION OF CORD BLOOD NUCLEATED CELLS OF ULTRASTRUCTURE BEFORE AND AFTER CRYOPRESERVATION

Babijchuk L.A., Migunova R.K., Nevzorov V.P.

Summary. The study of ultrastructural traits and viability of cord blood nucleated cells (CB NC) before and after cryopreservation according our developed methods was carried out. Electron microscopy showed that ultrastructure of CB NC remained well after separation and cryopreservation. Revealed changes in CB NC organells were within physiological compensation and could be returned by cell reparation possibilities that correlated with cell viability data.

Key words: nucleated cells, cord blood, cryopreservation, ultrastructure.

Стаття надійшла 29.03.2011 р.

УДК 576.31+616.11+616.112

І.В. Белінська, Т.В. Рибальченко, В.М. Кокозей, О.В. Врещ, В.К. Рибальченко

ДИНАМІКА ГЕМАТОТОКСИЧНОГО ВПЛИВУ РІЗНОМЕТАЛІЧНОГО Cu/Fe КОМПЛЕКСУ [Cu(dmen)₂][Fe(CN)₅(NO)]

Київський національний університет імені Тараса Шевченка (м.Київ)

Дослідження проведені в рамках наукової теми: „Прямий синтез та біологічні властивості гетерополіядерних комплексів перехідних металів” (№ держреєстрації 0106U006627).

Вступ. Різнометалічні комплексні сполуки, останнім часом, активно застосовують в біології і медицині. Їх використовують в діагностичних цілях [17], вони входять до складу терапевтичних препаратів з протипухлинною [3, 17], антипаразитарною [11, 17], протимікробною та фунгіцидною [14, 17] активностями. Показано, що введення до складу існуючих антибіотиків іонів різних металів, підсилює антимікробну дію останніх [13].

Різнометалічні комплексні сполуки, які синтезовані на хімічному факультеті Київського національного університету імені Тараса Шевченка [8], мають мембранотропну активність, взаємодіють з природними і штучними моношаровими та бішаровими мембранами, змінюють активність мембранозв'язаних ферментів гепатоцитів, проявляють гальмівну дію на об'ємну швидкість секреції жовчі печінкою [7, 9, 20], мають антифітовірусні [15], антимікробні, фунгіцидні [10] і протипухлинні [5] властивості, що обумовлює їх вивчення, як потенційної сировини для медичних препаратів.

Різнометалічний комплекс [Cu(dmen)₂][Fe(CN)₅(NO)], dmen=N,N'-диметилетилендіамін(кодKL447), містить іони міді (II) і заліза (II). KL447 і нітропрурид натрію (Na₂[Fe(CN)₅NO]2H₂O) мають однаковий аніон. Нітропрурид використовують в медицині як судинорозширювальний препарат (при внутрішньовенному введенні), завдяки здатності бути донором оксиду азоту [18]. За результатами досліджень останніх років, нітропрурид вивільнює і іони заліза [22]. Відомо, що іони заліза і міді відіграють важливу роль в диференціюванні і функціонуванні клітин крові. Так, іони заліза входять до складу гемоглобіну [16], а міді – до складу білків, які беруть участь в транспорті і зберіганні іонів заліза в організмі [19]. Тому дослідження ймовірних

ефектів різнометалічного комплексу KL447 на клітини крові є актуальним.

Метою роботи є дослідження динаміки змін показників крові щурів під впливом високої дози KL447, яка істотно перевищує терапевтичні дози заліза і міді, для встановлення токсичних ефектів даної сполуки.

Об'єкт і методи досліджень. 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 дозі 100 мг/кг і вводили зондом per os протягом 3-х тижнів (5 днів на тиждень) вранці до годування тварин. 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 перед дослідом (вихідні показники) та після 5, 10 та 15 введень досліджуваної речовини загальноприйнятими методами [4].

Метематичну 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. Перед введенням KL447 були проаналізовані основні вихідні показники крові для створення однорідних груп за цими параметрами. Як видно з **табл. 1** показники крові експериментальної та контрольної груп істотно не відрізняються і знаходяться в межах фізіологічних значень.

Після п'яти введень KL447 у дозі 100 мг/кг спостерігається істотне зниження концентрації гемоглобіну в крові (**рис. 1**), кількості еритроцитів (**рис. 2**), концентрації гемоглобіну в еритроцитах (**рис. 5**). Гематокрит змінюється у напрямку зменшення, але різниця невірогідна через широкі межі коливань даного показника (**рис. 3**). Вміст гемоглобіну

Таблиця 1

Вихідні показники (M±m) крові щурів

Група	Гемоглобін, г/л	Еритроцити, 10 ¹² /л	МСН, пг	Лейкоцити, 10 ¹² /л
Контрольна група	154,1 ± 3,60	8,00 ± 0,14	19,26 ± 0,17	18,28 ± 2,02
KL447	154,1 ± 4,30	7,86 ± 0,22	19,62 ± 0,21	21,05 ± 1,06

Примітка: МСН – середній вміст гемоглобіну в еритроцитах.

в еритроцитах (MCH) вірогідно не змінюється (рис. 4). Середній об'єм еритроцитів істотно збільшується (рис. 6). Вищевказані зміни можна пояснити гемолізом еритроцитів на введення досліджуваної речовини, що обумовлене вмістом в ній іонів заліза і міді, а також цианіду. Відомо, що токсичний вплив сполук вказаних металів пов'язаний з гемолізом еритроцитів [6, 16, 21], а в наших попередніх дослідженнях показано, що KL447 впливає на метаболізм заліза і міді в організмі [12]. Дане припущення підтверджується різким збільшенням кількості ретикулоцитів в крові (рис. 7), що є компенсаторною реакцією організму на зменшення кількості еритроцитів. Як відомо, такі клітини є молодими і незрілими, вони мають більший об'єм в порівнянні з еритроцитами [16], і знижену концентрацію гемоглобіну, оскільки процеси синтезу даного білка ще не завершені.

При подальшому введенні KL447 протягом десяти днів зберігаються зменшені концентрація гемоглобіну (рис. 1), кількість еритроцитів (рис. 2), вірогідно зменшується не тільки концентрація гемоглобіну в еритроцитах (рис. 5), а і його вміст (рис. 4), реєструється тенденція до зменшення гематокриту ($p=0.07$, рис. 3). Кількість ретикулоцитів

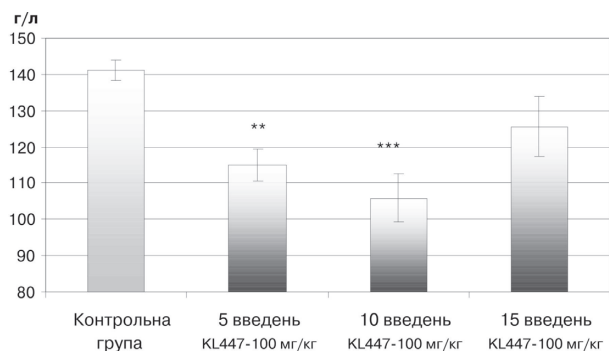


Рис. 1. Вплив KL447 у дозі 100 мг/кг на концентрацію гемоглобіну крові.

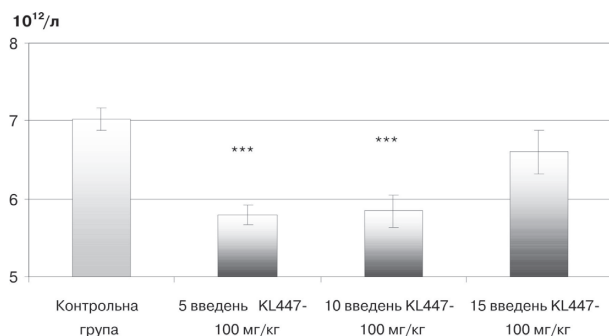


Рис. 2. Вплив KL447 у дозі 100 мг/кг на кількість еритроцитів.

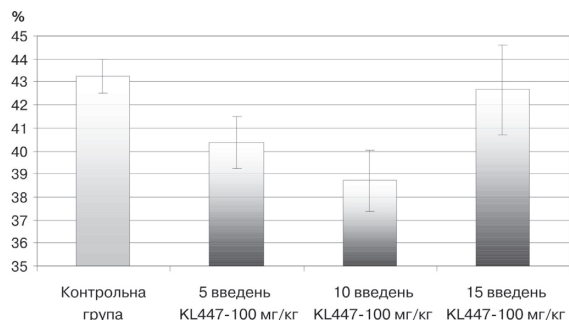


Рис. 3. Вплив KL447 у дозі 100 мг/кг на гематокрит.

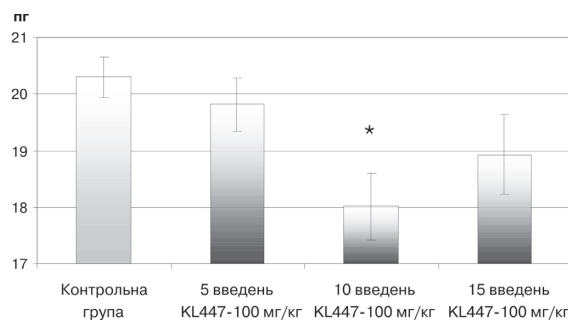


Рис. 4. Вплив KL447 у дозі 100 мг/кг на вміст гемоглобіну в еритроцитах (MCH).

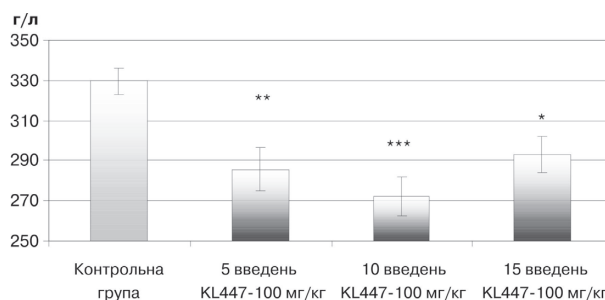


Рис. 5. Вплив KL447 у дозі 100 мг/кг на концентрацію гемоглобіну в еритроцитах (MCHC).

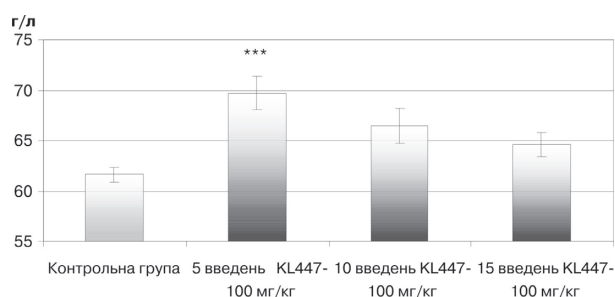


Рис. 6. Вплив KL447 у дозі 100 мг/кг на середній об'єм еритроцитів (MCV).

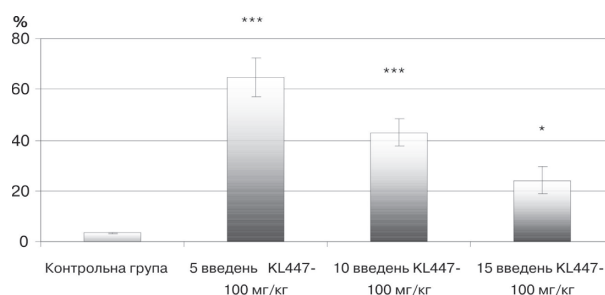


Рис. 7. Вплив KL447 у дозі 100 мг/кг на кількість ретикулоцитів.

залишається істотно збільшеною в порівнянні з показниками контрольної групи (рис. 7), але дещо нижча, в порівнянні з 5 введеннями досліджуваної речовини і співпадає з меншими показниками середнього об'єму еритроцитів (рис. 6). MCV залишається збільшеним в порівнянні з контрольною групою, але через широкі межі коливань даного показника різниця невірогідна ($p=0,08$).

Введення KL447 протягом 15 днів призводить до поступового відновлення гемоглобіну (рис. 1), кількості еритроцитів (рис. 2), гематокриту (рис. 3), MCH (рис. 4). Ці показники залишаються меншими контрольних значень, але

через широкі межі коливань (внаслідок відновлення) істотна різниця не реєструється. Залишаються вірогідно зменшеною концентрація гемоглобіну в еритроцитах (рис. 5) і збільшеною кількістю ретикулоцитів (рис. 7).

KL447 після 15 введень у дозі 100 мг/кг призводить до збільшення кількості еозинофілів в крові (табл. 2), інші показники лейкоцитарного ряду, а саме, загальна кількість лейкоцитів і лейкоцитарний склад не змінюються після 5, 10 і 15 введень досліджуваної речовини у вказаній дозі (табл. 2).

Таким чином, гематотоксичний вплив KL447 у дозі 100 мг/кг, яка перевищує за вмістом заліза терапевтичну дозу у 4 рази, а міді – майже у 200 разів, пов'язана з істотним зменшенням концентрації гемоглобіну, кількості еритроцитів, концентрації гемоглобіну в еритроцитах, кількості

ретикулоцитів і середній об'єм еритроцитів істотно збільшуються. Такі зміни свідчать про гемоліз еритроцитів під впливом даної речовини, що, ймовірно, обумовлено іонами заліза і міді, які входять до складу даної сполуки. Вищевказані показники еритроцитів крові мають тенденцію до відновлення на фоні введення KL447 протягом 3-х тижнів, що свідчить про здатність організму компенсувати вплив даної речовини. KL447 призводить до збільшення кількості еозинофілів в крові після 3-х тижнів введення даної сполуки, інші показники лейкоцитів (загальна кількість і лейкоцитарний склад) не змінюються. Необхідно зазначити, що комплексні сполуки металів є менш токсичними (показано в наших попередніх дослідженнях [1, 2]), в порівнянні з їх солями, що надає перевагу їх використання в медицині.

Таблиця 2

Вплив KL447 в дозі 100 мг/кг на кількість лейкоцитів і показники лейкограми щурів (M±m)

Група	Лейкоцити, x10 ⁹ /л	Еозинофільні гранулоцити,		Паличкоядерні нейтрофільні гранулоцити		Сегментоядерні нейтрофільні гранулоцити		Лімфоцити		Моноцити	
		%	x10 ⁹ /л	%	x10 ⁹ /л	%	x10 ⁹ /л	%	x10 ⁹ /л	%	x10 ⁹ /л
Контрольна група	19,34±2,06	0,44 ±0,20	0,09 ±0,04	0,31 ±0,13	0,07 ±0,03	13,94 ±0,96	2,64 ±0,23	78,56 ±1,35	15,26 ±1,75	6,75 ±0,51	1,29 ±0,14
KL447 5 введень	23,99±3,14	0,94 ±0,29	0,22 ±0,07	0,44 ±0,32	0,12 ±0,09	18,00 ±5,23	4,66 ±1,62	76,31 ±5,20	17,96 ±2,61	4,31 ±0,37	1,03 ±0,15
KL447 10 введень	22,11±2,22	1,38 ±0,30	0,30 ±0,07	0,31 ±0,13	0,06 ±0,03	17,25 ±1,39	3,87 ±0,54	73,38 ±1,56	16,23 ±1,73	7,69 ±1,16	1,66 ±0,23
KL447 15 введень	19,28±2,14	2,56 ±0,61**	0,48 ±0,12**	0,31 ±0,16	0,06 ±0,03	13,19 ±1,33	2,50 ±0,33	78,94 ±1,63	15,31 ±1,94	5,00 ±0,61	0,93 ±0,10

Примітка: ** p<0.01 у порівнянні з контрольною групою.

Список літератури

- Белінська І.В. Гематотоксичність хлоридного комплексу Cu/Zn з етилендіаміном при однократному введенні / І.В. Белінська, Т.В. Рибальченко, В.М. Козозей [та ін.] // Совр. Пробл. Токсикологии. – 2008. – №2. – С.20–25.
- Белінська І.В. Параметри гострої токсичності хлоридного комплексу Cu/Zn з етилендіаміном при одноразовому введенні per os / І.В. Белінська, Т. Рибальченко, В. Козозей, О. Нестерова // Вісник Київського національного університету. Біологія. – 2008. – Вип.51–52. – С.48–49.
- Герасимова Г.К. Новые подходы к поиску соединений с противоопухолевой активностью / Г.К. Герасимова, Г.Н. Апрышко, В.В. Решетникова [и др.] // Вестник Российской Академии медицинских наук, 2007. – N 11. – С.15-20.
- Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник / А.И. Карпищенко – Санкт-Петербург : Интермедика, 2002. – 408 с.
- Козозей В.М. Патент України на корисну модель № 36261, С01G 1/00, А61К 31/13, А61К 31/30. Застосування ацетатного комплексу міді та кадмію з етилендіаміном як протипухлинного та антиметастатичного засобу / В.М. Козозей, Л.В. Гарманчук, О.В. Нестерова [та ін.]. – Бюл. № 20, 2008.
- Надинская М.Ю. Болезнь Вильсона–Коновалова / М.Ю. Надинская // Справ. Поликл. Врача. – 2005. – Т.5, №6. – 10 с.
- Рибальченко В.К. Дія гетерометалічних комплексів Cu (II) та Co (III) з диетаноламіном на процеси секреції жовчі та структури печінки in vitro та in vivo / В.К. Рибальченко, О.Д. Синельник, Н.О. Карпезо [та ін.] // ДАН України. – 2004. – №6. – С. 181–183.
- Скопенко В.В. Патент України № 48544 А, С01G 1/00 / В.В. Скопенко, А.Л. Бойко, В.М. Козозей [та ін.]. – Бюл. № 8, 2002.
- Филинская Е.М. Мембранотропная активность гетерополиядерных комплексов Cu(II)/Co(II) с диетаноламином / Е.М. Филинская, Т.В. Рибальченко, Г.В. Островская [та ін.] // Доповіді НАН України. – 2008. – №7. – С.179-183.

10. Фурзікова Т.М. 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.
11. Benntez J. Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: new achievements / J. Benntez, L. Becco, I. Correia [et al.] // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2011. – V.105, Is.2. – P. 303-312.
12. Byelinska I. Influence of the mixed-metal Cu/Fe complex [Cu(dmen)₂][Fe(CN)₅(NO)] (dmen=N,N-dimethyl-ethylene-diamine) on serum iron and copper levels in experimental anemia of rats / I. Byelinska, T. Rybalchenko, V.Kokozay [et al.] // Annales universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Lublin-Polonia. – 2010. – Sectio DDD. – Vol. XXIII, N3. – P.221-225.
13. Chohan Z.H. Metal binding and antibacterial activity of ciprofloxacin complexes / Z.H. Chohan, C.T. Supuran, A. Scozzafava [et al.] // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. – 2005. – V. 20, N.3. – P.303-307.
14. Chohan Z.H. Organometallic-based antibacterial and antifungal compounds: transition metal complexes of 1,1'-diacetylferrocene-derived thiocarbonylhydrazone, carbonylhydrazone, thiosemicarbazone and semicarbazone / Z.H. Chohan, H. Pervez, K.M. Khan, C.T. Supuran // J. Enzyme Inhib. Med. Chem. – 2005. – V.20, N1. – P.81-88.
15. Kharina A.V. Antiviral activity of Heterometallic Complexes Obtained by Direct Synthesis / A.V. Kharina, I.G. Budzanivska, V.P. Polischuk // Abstracts of The39th IUPAC Congress and the 86th Conf. of The Canadian Society for Chemistry. – August 10–15, 2003 – Ottawa. – Canada. – p. 209.
16. Lichtman M.A. Williams Hematology / M.A. Lichtman, T.J. Kipps, U. Seligsohn [et al.] – [8-th edition]. – USA: The McGraw-Hill Companies, 2010. – 2297 p.
17. Gielen M. Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: The Use of Metals in Medicine / M. Gielen, E.R. Tiekink. – John Wiley & Sons, 2005 – 561 p.
18. 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.
19. Reeves P.G. Repletion of copper-deficient rats with dietary copper restores duodenal hephaestin protein and iron absorption / P.G. Reeves, C.S. DeMars // Exp. Biol. Med. – 2005. – V. 230. – P.320 – 325
20. Rybalchenko T. The influence of heteropolynuclear complex compounds on ion-transporting ATPase of rat hepatocytes plasma membrane / T. Rybalchenko, G. Ostrovska, O. Filinska [et al.] // Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio DDD. Pharmacia. – Lublin (Poland): Wschod, 2006. – Vol. 19. – № 2. – P. 183–185.
21. Schümann K. Hohenheim Consensus Workshop: Copper / K. Schümann, H.G. Classen, H.H. Dieter [et al.] // Eur. J. Clin. Nutr. – 2002. – V. 56, N. 6. – P. 469–483.
22. Wang J. Sodium nitroprusside promotes IRP2 degradation via an increase in intracellular iron and in the absence of S nitrosylation at C178 / J. Wang, C. Fillebeen, G. Chen [et al.] // Moll. Cell. Bioll. – 2006. V.26, N5. – P. 1948-1954.

УДК 576.31+616.11+616.112

ДИНАМІКА ГЕМАТОТОКСИЧНОГО ВПЛИВУ РІЗНОМЕТАЛІЧНОГО Cu/Fe КОМПЛЕКСУ [Cu(dmen)₂][Fe(CN)₅(NO)]

Белінська І.В., Рыбальченко Т.В., Козкозей В.М., Врещ О.В., Рыбальченко В.К.

Резюме. Різнометалічний комплекс [Cu(dmen)₂][Fe(CN)₅(NO)] (код KL447) містить іони міді (II) і заліза (II). Гематотоксичність KL447 у дозі 100 мг/кг, яка перевищує за вмістом заліза терапевтичну дозу у 4 рази, а міді – майже у 200 разів, протягом 3-х тижнів введення пов'язана з істотним зменшенням концентрації гемоглобіну, кількості еритроцитів, концентрації гемоглобіну в еритроцитах, кількість ретикулоцитів і середній об'єм еритроцитів змінюється в протилежному напрямку - істотно збільшуються. Такі зміни свідчать про гемоліз еритроцитів під впливом даної речовини, що, ймовірно, обумовлено іонами заліза і міді, які входять до її складу. Вищевказані показники еритроцитів крові мають тенденцію до відновлення на фоні введення KL447 протягом 3-х тижнів, що свідчить про здатність організму компенсувати вплив даної сполуки. KL447 призводить до збільшення кількості еозинофілів в крові після 3-х тижнів введення даної сполуки, інші показники лейкоцитів (загальна кількість і лейкоцитарний склад) не змінюються.

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

УДК 576.31+616.11+616.112

ДИНАМИКА ГЕМАТОТОКСИЧНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ РАЗНОМЕТАЛЛИЧЕСКОГО Cu/Fe КОМПЛЕКСА [Cu(dmen)₂][Fe(CN)₅(NO)]

Белинская И.В., Рыбальченко Т.В., Козкозей В.Н., Врещ О.В., Рыбальченко В.К.

Резюме. Разнометаллический комплекс [Cu(dmen)₂][Fe(CN)₅(NO)] (dmen= N,N'-диметилэтилендиамин, код KL447) содержит ионы меди (II) и железа (II). Гематотоксичность KL447 в дозе 100 мг/кг, которая превышает по содержанию железа терапевтическую дозу в 4 раза, а меди – в 200 раз, на протяжении 3-х недель введения проявляется существенным снижением концентрации гемоглобина в крови, количества эритроцитов, концентрации гемоглобина в эритроцитах, количество ретикулоцитов и средний объем эритроцитов значительно увеличиваются. Такие изменения свидетельствуют о гемоллизе эритроцитов под воздействием данного соединения, что, вероятно, обусловлено ионами железа и меди, которые входят в его состав. Указанные показатели эритроцитов крови имеют тенденцию к восстановлению на фоне введения KL447 на протяжении 3-х недель, что свидетельствует о способности организма компенсировать влияние данного соединения. KL447 приводит к увеличению количества эозинофилов в крови после 3-х недель введения, другие показатели лейкоцитов (общее количество и лейкоцитарный состав) не изменяются.

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

UDC 576.31+616.11+616.112

DYNAMICS OF HEMATOTOXICITY OF MIXED-METAL Cu/Fe COMPLEX [Cu(dmen)₂][Fe(CN)₅(NO)]

I.V. Byelinska, T.V. Rybalchenko, V.M. Kokozay, O.V. Vreshch, V.K. Rybalchenko

Summary. The mixed-metal Cu/Fe complex [Cu(dmen)₂][Fe(CN)₅(NO)] (dmen= N,N'-dimetiletilediamin, code KL447) contains copper (II) and iron (II). 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 over 3 weeks of the introduction shows a significant decrease in the concentration of hemoglobin in the blood, red blood cell count, hemoglobin in red blood cells, the number of reticulocytes and the mean volume of red blood cells significantly increased. Such changes suggest hemolysis of red blood cells under the influence of this compound, which is probably due to ions of iron and copper, which are part of it. These indicators are red blood cells tend to recover during the introduction of KL447 for 3 weeks, indicating that the body's ability to compensate for the effect of this compound. KL447 leads to an increase in the number of eosinophils in the blood after 3 weeks administration, other parameters of leukocytes (total and leukocyte composition) do not change.

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

Стаття надійшла 31.03.2011 р.