

**ВПЛИВ РІЗНОМЕТАЛІЧНОГО  $\text{Cu/Fe}$  КОМПЛЕКСУ  
 $[\text{Cu}(\text{DMEN})_2][\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$  НА ВІДНОВЛЕННЯ  
ЕРИТРОЦИТАРНИХ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ ПІСЛЯ  
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ АНЕМІЇ У ЩУРІВ**

**І.В. Белінська, Т.В. Рибальченко, В.М. Кокозей,  
О.В. Вреш, І.С. Дягіль, З.В. Мартіна, В.К. Рибальченко**  
*Київський національний університет ім.Тараса Шевченка  
ДУ Науковий центр радіаційної медицини НАМН України*

**Вступ**

Різнometалічний комплекс  $[\text{Cu}(\text{dmen})_2][\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$  (код KL447, dmen N,N-диметилетилендіамін) містить іони міді (II) і заліза (II), синтезований в науково-дослідній лабораторії "Біологічно активні речовини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Відомо, що двовалентне залізо входить до складу білка гемоглобіну еритроцитів крові [1,2], а іони міді - до складу білків, які беруть участь в транспорті і зберіганні іонів заліза в організмі [3-7]. Тому дослідження впливу даного комплексу на стан, який пов'язаний з дефіцитом гемоглобіну внаслідок дефіциту іонів заліза (експериментальна анемія) може продемонструвати здатність сполуки впливати на метаболізм вищевказаного іону. Мідь, яка входить до складу цього комплексу, може покращити транспорт іонів заліза в організмі.

**Матеріали та методи досліджень**

Досліди проведені на безпородних білих самках щурів з початковою масою 170-200 г. Щурів утримували при стандартному світловому дні на нормальному харчовому раціоні. Піддослідних тварин поділили на такі групи: контрольна, експериментальна анемія, експериментальна анемія при введенні різнометалічного комплексу KL447 (в кожній групі по 8 щурів). Експериментальну анемію створювали за допомогою крововтрат. П'ять крововилучень у дослідних групах здійснювали з судин хвоста в об'ємі 10 мл/кг маси тіла (20% від об'єму циркулю-

ючої крові) протягом 10 діб [8]. Досліджуваний комплекс KL447 розчиняли у дистильованій воді і вводили *per os* в дозі 25 мг/кг щоденно протягом 20 днів, починаючи з наступної доби після останнього крововилучення. Доза 25 мг/кг KL447 містить 3 мг/кг в перерахунку на залізо, що відповідає терапевтичній дозі, яку призначають людям при лікуванні анемії, і 3,5 мг/кг міді [2]. Щурам контрольної групи і групи з експериментальною анемією вводили *per os* дистильовану воду.

Показники крові визначали перед дослідом (вихідні показники), на піку розвитку експериментальної анемії (на наступний день після останнього крововилучення) та на 6, 10, 15 та 20 добу відновного періоду загальноприйнятими методами [9].

### Отримані результати та їх обговорення

На початку досліді були проаналізовані вихідні показники еритроцитів і еритроцитарні індекси експериментальних груп тварин (контрольна, експериментальна анемія і експериментальна анемія при введенні різнометалічного комплексу KL447) для створення однорідних груп за цими параметрами. Як видно з рис.1-5 еритроцитарні показники крові експериментальних груп істотно не відрізняються між собою і контрольною групою, і знаходяться в межах фізіологічних значень.

На піку розвитку експериментальної анемії у групах експериментальної анемії і експериментальної анемії при введенні KL447 еритроцитарні показники крові істотно не відрізняються (рис.1-5), в порівнянні з показниками контрольної групи вірогідно зменшені ( $p < 0,001$ ) гемоглобін, кількість еритроцитів, гематокрит, вміст та концентрація гемоглобіну в еритроцитах (рис.1-4), а кількість ретикулоцитів істотно збільшена ( $p < 0,001$ ) (рис.5). Дослідження впливу різнометалічного комплексу KL447 на відновлення показників крові після створення експериментальної анемії показало, що на 6-й день відновного періоду вміст гемоглобіну в крові істотно не відрізняється від даного показника в групі з експериментальною анемією (рис.1). Цей показник в обох експериментальних групах залишається істотно меншим ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з показниками контрольної групи. Показано вірогідне збільшення гемоглобіну

( $p < 0,05$ ) на фоні введення KL447 на 10-й та 15-й дні відновного періоду в порівнянні з групою експериментальної анемії. KL447 призводить до відновлення гемоглобіну до контрольних значень на 15-й день відновного періоду, а в групі з експериментальною анемією він залишається вірогідно меншим ( $p < 0,05$ ). На 20-й день відновного періоду ця різниця зникає.

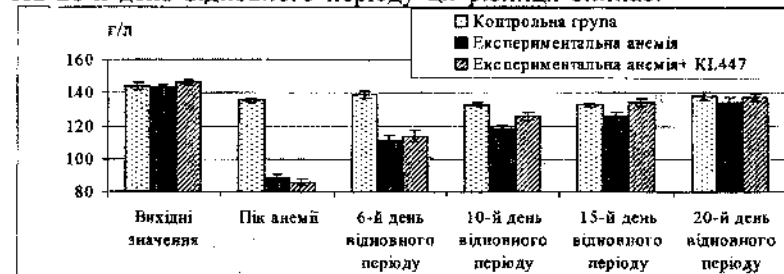


Рис. 1. Відновлення концентрації гемоглобіну в крові після експериментальної анемії та на фоні введення KL447.

Кількість еритроцитів на фоні введення KL447 істотно не відрізняється від показників групи експериментальної анемії на 6-й день відновного періоду (рис.2). На 10-й та 15-й день відновного періоду спостерігається тенденція до збільшення ( $p = 0,06$  та  $p = 0,09$ , відповідно) даного показника під впливом KL447. Ця різниця між групами зникає на 20-й день відновного періоду.

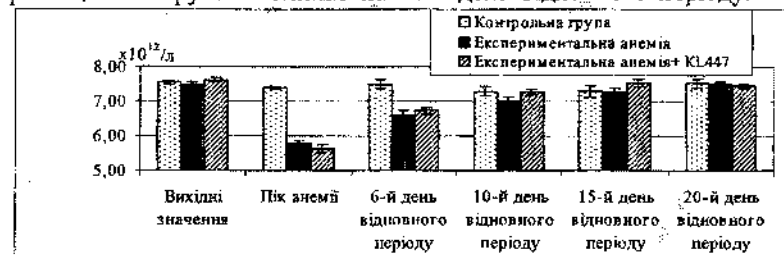


Рис. 2. Відновлення кількості еритроцитів після експериментальної анемії та на фоні введення KL447.

Динаміка відновлення гематокриту наведена на рис. 3. Не виявлено різниці між даними показниками експериментальних груп на 6-й день відновного періоду, але він вірогідно нижчий ( $p < 0,001$ ) в обох групах у порівнянні з показниками конт-

рольної групи. Під впливом KL447 зникає різниця даного показника на 10-й день відновного періоду в порівнянні з контрольною групою, а в групі з експериментальною анемією залишається тенденція до його зниження ( $p=0,07$ ). На 15-й та 20-й дні відновного періоду не виявлено різниці між гематокритом експериментальних і контрольної груп.

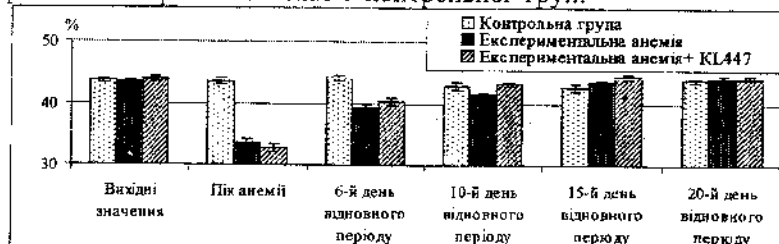


Рис. 3. Відновлення гематокриту після експериментальної анемії та на фоні введення KL447.

Динаміку відновлення еритроцитарних індексів наведено на рис. 4.

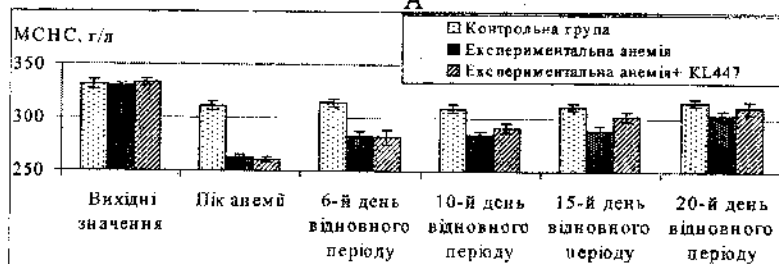


Рис. 4. Відновлення еритроцитарних індексів після експериментальної анемії та на фоні введення KL447 (MCH (вміст), MCHC (концентрація) гемоглобіну в еритроцитах).

KL447 призводить до вірогідного збільшення вмісту гемоглобіну в еритроцитах (MCH) на 10-й та 15-й дні відновного періоду ( $p<0,05$ ) в порівнянні з показниками групи експериментальної анемії (рис. 4, А). В порівнянні з показниками контрольної групи різниця в MCH зникає на 15 день відновного періоду. В групі експериментальної анемії MCH залишається вірогідно нижчим протягом 20-ти днів відновного періоду в порівнянні з показниками контрольної групи.

Концентрація гемоглобіну в еритроцитах не відрізняється в експериментальних групах протягом відновного періоду (рис. 4Б). В той же час зникає різниця між даним показником під впливом KL447 на 15-й день відновного періоду в порівнянні з контрольною групою, а в групі з експериментальною анемією він залишається істотно меншим ( $p<0,05$ ).

Динаміка кількості ретикулоцитів під час відновлення після експериментальної анемії представлена на рис. 5. Як видно з рис. 5 під впливом KL447 кількість ретикулоцитів істотно вища, в порівнянні з показниками групи експериментальної анемії протягом всього відновного періоду, що свідчить про більш ефективне відновлення еритроцитів.

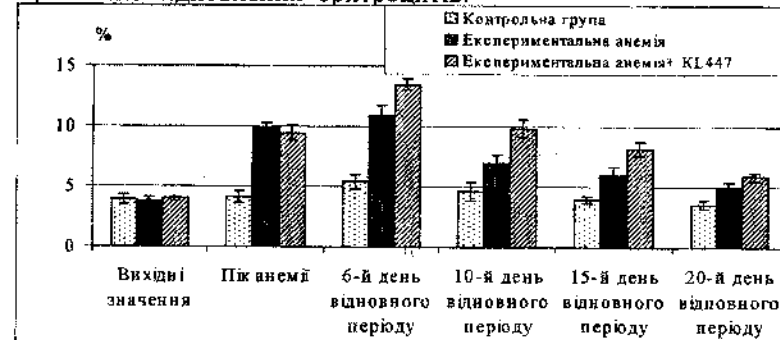


Рис. 5. Динаміка кількості ретикулоцитів крові під час відновлення після експериментальної анемії та на фоні введення KL447.

Для співставлення отриманих результатів з літературними даними ми звернулися до ефектів речовин, які мають спільні риси з дослідженим комплексом KL447  $[\text{Cu}(\text{dmen})_2][\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$ . Дослідження біологічної активності гетерополіядерних комп-

лексних сполук показали, що ці сполуки мають протипухлинні [10], антимікробні і фунгіцидні властивості [11], проявляють мембранотропну активність [12], змінюють кислотну та лужну резистентність еритроцитів [13,14], при цьому чинять незначний токсичний вплив [15,16], що обумовлює вивчення їх як потенційно лікувальних речовин. KL447 одержаний з нітропрусида натрію ( $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), який використовують в медицині як судинорозширюючий препарат (при внутрішньовенному введенні), завдяки здатності бути донором оксиду азоту [17]. Дослідження останніх років показали, що нітропрусид є донором не тільки оксиду азоту, а й іонів заліза [18-20]. Введення нітропрусида призводить до збільшення концентрації заліза в плазмі крові і печінці [21]. Нітропрусид підвищує внутрішньоклітинну концентрацію заліза [18] і експресію білка гемоксигенази-1 в культурі макрофагів миші саме за участю іонів заліза [19]. Гемоксигеназа-1 є ключовим ферментом в гомеостазі заліза в організмі (рощеплює гем з вивільненням монооксиду вуглецю, іонів заліза і білівердину), запобігає руйнуванню клітин вільними радикалами (антиоксидантні властивості) [22]. Підвищена експресія гена гемоксигенази-1 в клітинах епітеліальної колоректальної аденокарциноми людини призводить до підвищення внутрішньоклітинної концентрації іонів заліза, підвищеного поглинання гемового заліза апікальною і активного виведення заліза базолатеральною поверхнями клітин [23], що свідчить про активацію транспорту заліза епітеліальними клітинами шлунково-кишкового тракту. Відомо, що активація гемоксигенази-1 печінки призводить до підвищення концентрації заліза в сироватці крові, блокування синтезу гема запобігає активації цього ферменту [24]. Тобто цей фермент пов'язаний із синтезом гемоглобіну, але його роль в нормальному еритропоезі потребує вивчення [25]. Виходячи з вище викладеного, нітропрусид впливає на метаболізм заліза в організмі.

Токсичною складовою комплексу KL447 і нітропрусида натрію може бути ціанідний аніон, який взаємодіє з залізом(III) цитохрому  $a_3$  і цитохром-С-оксидазою, кінцевим ферментом дихального ланцюга. Ціанід запобігає поглинання кисню тканинами. Гемоглобін бере участь в детоксикації ціаніду. Спочатку

гемоглобін окиснюється нітритом до метгемоглобіну (в якому залізо має ступінь окиснення +3), який зв'язує ціанід з утворенням малотоксичного ціанметгемоглобіну [26]. В той же час, дослідження токсичності червоної  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  і жовтої кров'яних  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  солей, до складу яких входять координовані ціанідні групи, показало (при введенні в шлунок), що ці сполуки є помірно небезпечними речовинами ( $\text{LD}_{50}=4520$  і  $4470$  мг/кг відповідно, 3-й клас токсичності) і навіть у високих дозах ( $1/2 \text{LD}_{50}$ ) не призводять до утворення метгемоглобіну [27].

### Висновки

Таким чином, під впливом KL447 відбувається відновлення еритроцитарних показників крові, що підтверджується вищою концентрацією гемоглобіну, збільшеним вмістом гемоглобіну в еритроцитах, активним утворенням ретикулоцитів у порівнянні з групою експериментальної анемії. Даний ефект обумовлений впливом різнометалічної сполуки на метаболізм заліза і міді в організмі, які беруть активну участь в еритропоезі. Відсутність позитивної різниці на 20-й день відновного періоду може свідчити про токсичний вплив даної речовини і потребує подальшого вивчення.

### Література

1. Гусева С.А. Анемии / С.А. Гусева, Я.П. Гончаров. - Київ : Логос, 2004. - 408 с.
2. De Benoist B. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005 / B. De Benoist, E. McLean, I. Egli, M. Cogswell. - WHO global database on anaemia. Geneva : WHO Press, 2008. - 41 p.
3. The Role of Copper in Anemia: the Work of Edwin B. Hart // The Journal of Biological Chemistry. - 2008. - V.283, № 11. - P. e6-e7.
4. 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.
5. Harris Z.L. Actrulo plasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impaired of iron homeostasis / Z.L. Harris, L.W.J. Klomp, J.D. Gitlin // Am. J. Clin. Nutr. - 1998. - V. 67(supl.). - P.972S-977S.

6. Schumann K. Hohenheim Consensus Workshop: Copper / K. Schumann, Y.G. Classen, H.H. Dieter [et al.] // *Eur. J. Chem. Nutrition*. - 2002. - V.56, № 6. - P.469-483.
7. Gregg X.T. Copper deficiency masquerading as myelodysplastic syndrome / X.T. Gregg, V. Reddy, J.T. Prchal // *Blood*. - 2002. - V.100, № 4. - P.1493-1495.
8. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / О.В. Стефанов. - Київ: Авіцена, 2001. - 527 с.
9. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник / А.И. Карпищенко. - Санкт-Петербург: Интермедика, 2002. - 408 с.
10. 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.
11. Фурзікова Т.М. Формування резистентності грамнегативних та грампозитивних тест-культур до ацетатного комплексу  $\text{Cu}/\text{Cd}$  з етилендіаміном / Т.М. Фурзікова, Н.В. Яворська, В.В. Позур [та ін.] // *Буковинський медичний вісник*. - 2008. - Том 12, № 2. - С.82-83.
12. Филинская Е.М. Мембранотропная активность гетерополиядерных комплексов  $\text{Cu(II)}/\text{Co(II)}$  с диэтанолламином / Е.М. Филинская, Т.В. Рыбальченко, Г.В. Островская [та ін.] // *Доповіді НАН України*. - 2008. - № 7. - С.179-183.
13. Белінська І.В. Резистентність еритроцитів як показник мембранотропності ацетатного комплексу  $\text{Cu}/\text{Cd}$  з етилендіаміном - потенційного лікувального засобу / І.В. Белінська, Т.В. Рыбальченко, О.В. Нестерова [та ін.] // *Український журнал гематології та трансфузіології*. - 2009. - №1 (9). - С. 39-44.
14. Белінська І.В. Вплив ацетатного комплексу  $\text{Cu}/\text{Cd}$  з етилендіаміном на лужну резистентність еритроцитів / І.В. Белінська // *Вісник морфології*. - 2009. - Том 15, № 1. - С. 12-18.

15. Белінська І.В. Параметри гострої токсичності хлоридного комплексу  $\text{Cu}/\text{Zn}$  з етилендіаміном при одноразовому введенні per os / І.В. Белінська, Т. Рыбальченко, В. Кокозей, О. Нестерова // *Вісник Київського національного університету. Біологія*. - 2008. - Вип. 51-52. - С. 70-71.
16. Белінська І.В. Гематотоксичність хлоридного комплексу  $\text{Cu}/\text{Zn}$  з етилендіаміном при однократному введенні / І.В. Белінська, Т.В. Рыбальченко, В.М. Кокозей [та ін.] // *Совр. пробл. токсикології*. - 2008. - № 2. - С. 20-25.
17. 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, № 1. - P.H308-H315.
18. 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.] // *Mol. Cell. Biol.* - 2006. V.26, № 5. - P. 1948-1954.
19. Kim H. J. Iron Released by Sodium Nitroprusside Contributes to Heme Oxygenase-1 Induction via the cAMP-Protein Kinase A Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in RAW 264.7 Cells / H. J. Kim, I. Tsoy, M. K. Park [et al.] // *Mol. Pharmacol.* - 2006. - V.69, № 5. - P.1633-1640.
20. Olabe J.A. The coordination chemistry of nitrosyl in cyanoferates. An exhibit of bioinorganic relevant reactions / J.A. Olabe // *RSC / Dalton Trans.* - 2008. - P. 3633-3648.
21. Engeser P. Effects of long term infusion of sodium nitroprusside on iron and thiocyanate in rabbits / P. Engeser, R. Roebble, J. Pill // *Arch. Toxicol.* - 1982. - V. 51. - P. 323-328.
22. Schroder H. No Nitric Oxide for HO-1 from Sodium Nitroprusside / H. Schroder // *Mol. Pharmacol.* - 2006. - V.69, № 5. - P. 1507-1509.
23. Mendiburo M. J. Heme oxygenase 1 overexpression increases iron fluxes in Caco-2 cells / M. J. Mendiburo, S. Flores, F. Pizarro, M. Arredondo // *Biol Res.* - 2006. - V. 39. - P.195-197.

24. Mostert V. Serum iron increases with acute induction of hepatic heme oxygenase-1 in mice / V. Mostert, A. Nakayama, L.V. Austin [et al.] // *Drug metab. Rev.* - 2007. - V.39. - P. 619-626.

25. Mendel A. Investigation of the role of heme oxygenase-1 in  $\beta$ -thalassemia pathophysiology / A. Mendel, D.-Santos, P. Ponka // *MSURJ.* - 2009. - V. 4, Is. 1. - P. 21-24.

26. Cummings T.F. The treatment of cyanide poisoning / T.F. Cummings // *Occupational Medicine.* - 2004. - V.54. - P.82-85.

27. Талакин Ю.Н. Первичная токсикологическая оценка и характер биологического действия красной и желтой кровяных солей / Ю.Н. Талакин, Л.В. Черных, Л.А. Иванова [et al.] // *Гигиена труда и профессиональные заболевания.* - 1986. - №5. - С. 49-50.

#### Резюме

Белінська І.В., Рибальченко В.К., Рибальченко Т.В., Кокозей В.М., Врещ О.В., Дягіль І.С., Мартина З.В. Вплив різнометалічного Cu/Fe комплексу  $[Cu(dmen)_2][Fe(CN)_5(NO)]$  на відновлення еритроцитарних показників крові після експериментальної анемії щурів.

Різнometалічний комплекс  $[Cu(dmen)_2][Fe(CN)_5(NO)]$  (dmen N,N-диметилетилендіамін, код KL447) містить іони міді (II) і заліза (II). Дослідження впливу даної речовини на експериментальну анемію, яка обумовлена дефіцитом іонів заліза в організмі, показало більш ефективне відновлення еритроцитарних показників крові, що підтверджується вищою концентрацією гемоглобіну, збільшенням вмісту гемоглобіну в еритроцитах, активним утворенням ретикулоцитів у порівнянні з групою експериментальної анемії. Такий ефект може бути пов'язаний із впливом даної сполуки на метаболізм заліза і міді в організмі, які беруть активну участь в еритропоезі. Відсутність позитивної різниці на 20-й день відновного періоду може свідчити про токсичний вплив даної речовини і потребує подальшого вивчення.

**Ключові слова:** різнометалічний Cu/Fe комплекс, експериментальна анемія, еритроцити, щури.

#### Резюме

Белинская И.В., Рыбальченко В.К., Рыбальченко Т.В., Кокозей В.Н., Врещ О.В., Дягиль И.С., Мартина З.В. Влияние разнометаллического Cu/Fe комплекса  $[Cu(dmen)_2][Fe(CN)_5(NO)]$  на

восстановление эритроцитарных показателей после экспериментальной анемии крыс.

Разнометаллический комплекс  $[Cu(dmen)_2][Fe(CN)_5(NO)]$  (dmen N,N-диметилендиамин, код KL447) содержит ионы меди (II) и железа (II). Исследование влияния данного вещества на экспериментальную анемию, которая обусловлена дефицитом ионов железа в организме, показало более эффективное восстановление эритроцитарных показателей крови, что подтверждается повышенной концентрацией гемоглобина и содержанием гемоглобина в эритроцитах, активным образованием ретикулоцитов по сравнению с группой экспериментальной анемии. Такой эффект может быть связан с влиянием данного соединения на метаболизм железа и меди в организме, которые берут активное участие в эритропоезе. Отсутствие положительной динамики на 20-й день восстановительного периода может быть связано с токсическим воздействием данного вещества и требует дальнейшего изучения.

**Ключевые слова:** разнометаллический Cu/Fe комплекс, экспериментальная анемия, эритроциты, крысы.

#### Summary

Byelinska I.V., Rybalchenko V.K., Rybalchenko T.V., Kokozay V.N., Vreshch O.V., Dyagil I.S., Martina Z.V. The influence of mixed-metal Cu/Fe complex  $[Cu(dmen)_2][Fe(CN)_5(NO)]$  on recovery of red blood cells parameters after the experimental anemia of rats.

The mixed-metal Cu/Fe complex  $[Cu(dmen)_2][Fe(CN)_5(NO)]$  (dmen N,N-dimethylethylenediamine, code KL447) contains copper (II) and iron (II). There was investigated KL447 effect on red blood cells parameters under the experimental anemia in rats. It was shown KL447 causes to recovery of hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin and increasing reticulocytes count. These effects could be due to influence on metabolism of iron and copper in organism. The absence differences between parameters at the 20th day of the recovery period could be related with toxic action and require future investigation.

**Key words:** mixed-metal Cu/Fe complex, experimental anemia, erythrocytes, rats.

Рецензент: д.біол.н., проф.Б.П.Романюк