

І.В. Белінська к.б.н., Т.В. Рибальченко к.б.н., О.В. Нестерова к.х.н., В.М. Кокозей д.х.н., В.К. Рибальченко д.б.н.

ВПЛИВ АЦЕТАТНОГО КОМПЛЕКСУ CU/CD З ЕТИЛЕНДІАМІНОМ НА КИСЛОТНИЙ ГЕМОЛІЗ ЕРИТРОЦИТІВ

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Гетерометалічні або гетерополімерні комплекси, які містять кілька різних за природою металів в одній молекулі, можуть проявляти ряд практично корисних властивостей, зокрема біологічну активність [1,2]. Раніше було показано, що ацетатний комплекс Cu/Cd з етилендіаміном має антимікробні, фунгіцидні [3] та протипухлинні властивості [4]. Також відомо, що сполуки міді та кадмію, а також гетерополімерні комплекси міді, впливають на показники крові, тобто проявляють гематотоксичність [5-8]. Дія сполук обох металів призводить до гемолітичної анемії, а саме до внутрішньосудинного руйнування еритроцитів внаслідок порушень плазматичної мембрани цих клітин. Дослідження мембранотропної активності гетерополімерних комплексів Cu/Co з діетаноламіном показали мембраномодуючий вплив цієї речовини [9]. Виходячи з вищевикладеного, дослідження впливу гетерополімерних сполук на стійкість мембран еритроцитів є актуальним. Тому метою нашої роботи було вивчення впливу ацетатного комплексу Cu/Cd з етилендіаміном на стійкість еритроцитів за швидкістю кислотного гемолізу цих клітин.

Матеріали та методи досліджень

Комплекс $[Cu(en)_2][Cd_2(CH_3COO)_6]$ (шифр PO244) синтезований за методикою [4].

Щоб вивчити вплив PO244 та його складових на еритроцити, кров набирали з антикоагулянтом ЕДТА з судин хвоста щурів. Моделювання взаємодії еритроцитів з досліджуваними речовинами *in vivo* проводили шляхом інкубації суспензії цих клітин при 37°C протягом однієї го-

дини *in vitro*. Для цього готували суспензію еритроцитів у розведенні в 3500 разів в 0,9% розчині NaCl безпосередньо перед проведенням годинної інкубації. В дослідні проби додавали розчин PO244 або його складові (хлорид міді або кадмію, етилендіамін, ацетат натрію) в 0,9% розчині NaCl в досліджуваній концентрації, в контрольні проби — відповідний об'єм 0,9% розчину NaCl.

Для визначення стійкості еритроцитів після впливу PO244 та його складових вивчали реакцію цих клітин на дію 7,5 мМ HCl. За основу взяли методику, яка викладена в роботі І.В.Малюка у співав. [10]. Для цього до суспензії еритроцитів додавали розчин 150 мМ HCl, яку готували на 0,9% розчині NaCl. Досліджували зміну оптичної густини суспензії після додавання кислоти, що відображає кількість лізованих еритроцитів за певний проміжок часу.

Статистичну обробку даних проводили з використанням програми Excel. Вірогідною вважали різницю середніх значень при $p \leq 0,05$ за критерієм Стюдента.

Результати досліджень та їх обговорення

Як видно з рис. 1, інкубація суспензії еритроцитів з PO244 в концентрації 10^{-4} М призводить до зменшення стійкості цих клітин до впливу 7,5 мМ HCl. Про це свідчить збільшення кількості лізованих еритроцитів, яке підтверджується більш швидкою зміною оптичної густини суспензії клітин. Слід зазначити, що суспензія еритроцитів є неоднорідною і складається як із "старих" еритроцитів, життєвий шлях яких добігає кінця, так і "молодих" клітин, які утворилися нещодавно.

Найбільш чутливими до гетерополімерного комплексу PO244 є "старі" еритроцити, оскільки вірогідне збільшення гемолізованих еритроцитів відбувається безпосередньо після дії кислоти. Це твердження ґрунтується на даних Леонової В.Г. [11], у роботі якої показано, що саме "старі" еритроцити є менш стійкими до дії кислоти, тобто вони лізують у першу чергу.

Для з'ясування ролі складових PO244 в ефектах впливу на мембрану клітин ми провели дослідження дії хлоридів міді або кадмію, етилендіаміну та ацетату натрію на стійкість еритроцитів. Як видно з рис.1, найбільший пошкоджуючий вплив на мембрану еритроцитів чинять іони Cu(II) в концентрації 10^{-4} М, про що свідчить 100% зміна оптичної густини суспензії клітин безпосередньо після додавання кислоти, що відображає лізис 100% еритроцитів. Такі "катастрофічні" події не розвиваються після впливу інших складових і власне самого комплексу PO244.

Для з'ясування дозових залежностей впливу іонів міді (II) ми дослідили кислотний гемоліз еритроцитів при їх менших концентраціях. Як видно з рис.2, при концентрації іонів міді (II) 10^{-5} М зберігається їх вірогідний пошкоджуючий вплив на еритроцити, за інтенсивністю подібний до впливу цих іонів у концентрації 10^{-4} М, про що свідчить гемоліз майже 100% клітин безпосередньо після додавання кислоти. Збільшення оптичної густини суспензії еритроцитів після інкубації з іонами Cu(II) в концентрації 10^{-4} та 10^{-5} М (до введення соляної кислоти) потребує подальшого вивчення. При менших концентраціях іонів міді (II) (10^{-6} М, 10^{-7} М) кінетика кислотного гемолізу еритроцитів відбувається подібно до контрольних значень, але відсоток лізованих клітин залишається збільшеним. Спостерігається зменшення стійкості як "старих", так і "молодих" еритроцитів в порівнянні з контролем. Ймовірно, іони міді чинять свій вплив як ззовні, так і зсередини клітини, оскільки вони активно взаємодіють з ліпідами і білками як мембран, так і цитоплазми.

Ацетат натрію чинить незначний вплив на еритроцити, що підтверджується неістотним зменшенням

стійкості еритроцитів до дії кислоти. Не зареєстровано істотного збільшення кількості лізованих еритроцитів після впливу іонів кадмію і етилендіаміну в концентрації 10^{-4} M, про що свідчить відсутність змін оп-

тичної густини суспензії клітин до дії кислоти в порівнянні з контролем (рис.1).

З вищевикладеного видно, що ацетатний комплекс Cu/Cd з етилендіаміном зменшує стійкість

еритроцитів до дії кислоти. Серед його складових найбільший вплив справляють іони міді (II). Як показано в попередніх дослідженнях, гематотоксичність сполук міді (II) проявляється зниженням резисте-

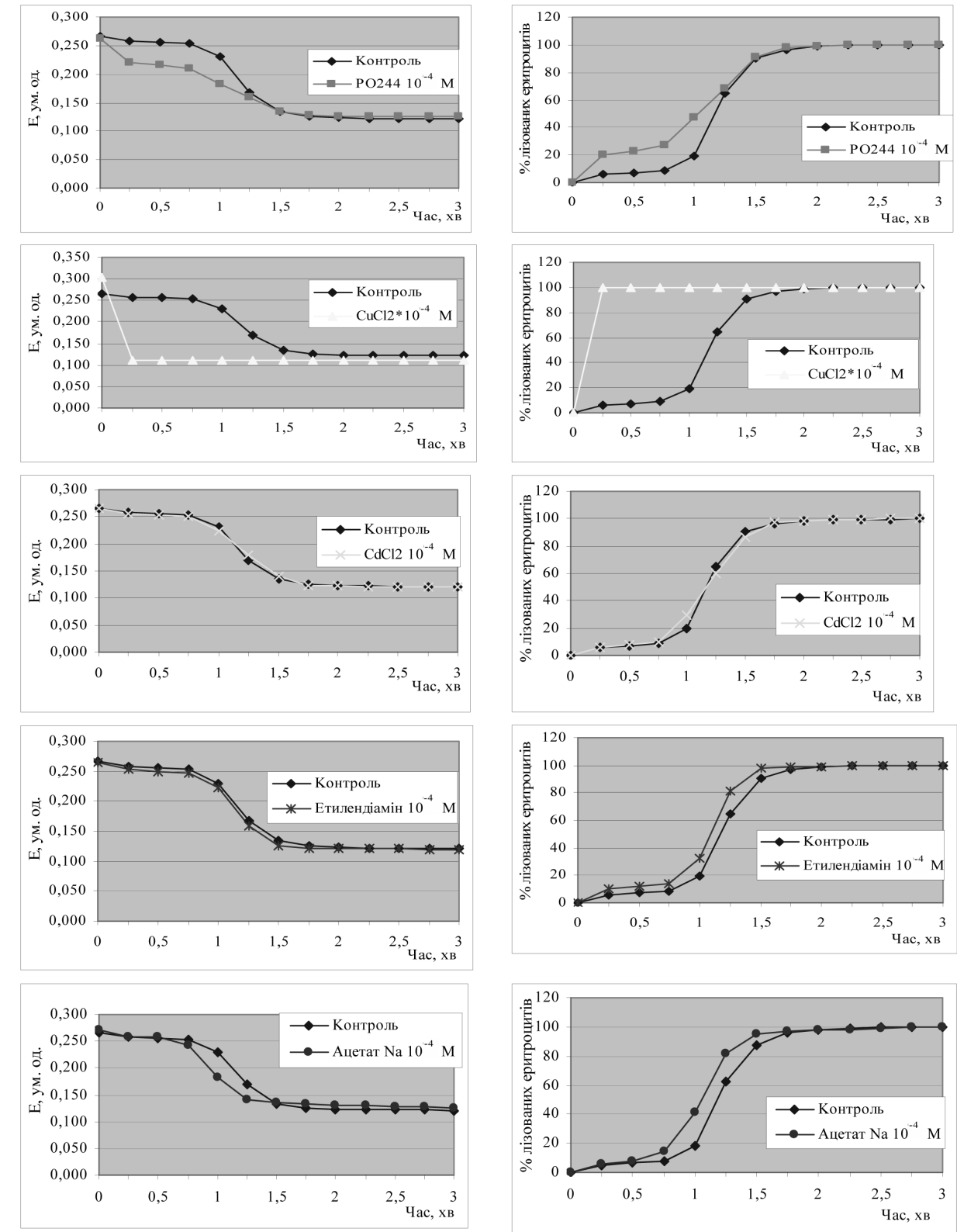


Рис. 1. Зміна оптичної густини (А) суспензії еритроцитів і відсоток лізованих еритроцитів (Б) за умов впливу 7,5мМ НСІ після дії досліджуваних речовин.

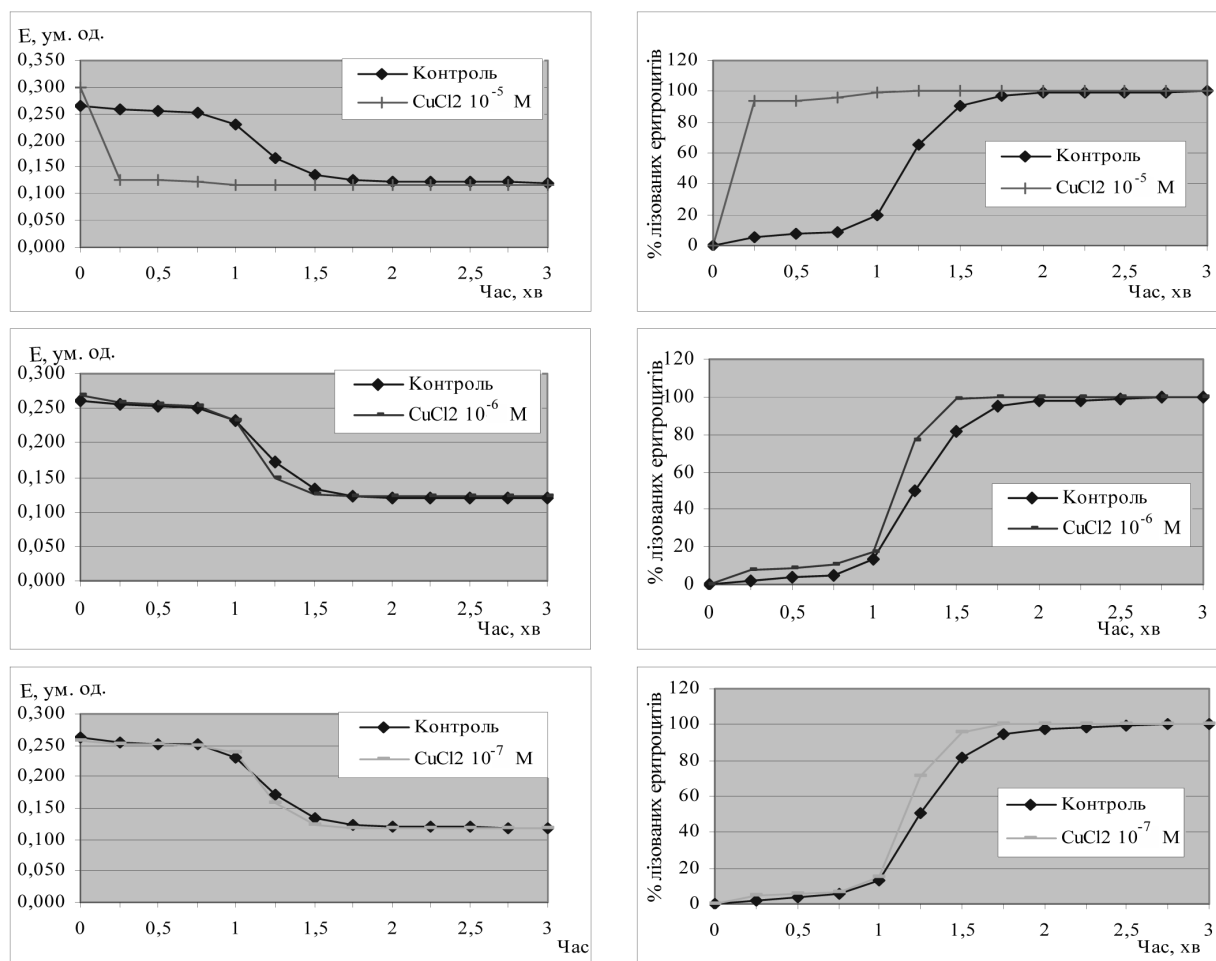


Рис. 2. Зміна оптичної густини (А) суспензії еритроцитів і відсоток лізованих еритроцитів (Б) за умов впливу 7,5 мМ НСІ після дії CuCl₂ в різних концентраціях

тності еритроцитів через посилення перекисного окиснення ліпідів мембран, появою гемоглобіну в плазмі крові, гемолітичною анемією [5]. Ці дані підтверджуються дослідженнями захворювання Вільсона-Коновалова, при якому відбувається надмірне накопичення (через порушення екскреції) міді в організмі та в еритроцитах зокрема, що призводить до гемолізу еритроцитів, тобто гемолітичної анемії [5,6]. Дослідження впливу хлоридного комплексу міді та цинку з етилендіаміном (найближчий аналог до PO244) показали його меншу гематоксичність [8] у порівнянні з простими солями цих металів, тобто високі концентрації комплексної сполуки викликають зміни показників крові меншої інтенсивності. Вплив цього комплексу на еритроцитарні показники крові проявляється збільшенням гематокриту і змен-

шенням вмісту гемоглобіну в еритроцитах, що, ймовірно, є наслідком гемолізу еритроцитів. Вивчення впливу гетерополімерних комплексів Cu/Co з діетаноламіном (більш далекий аналог до PO244) на штучні модельні мембрани показало зміну структурної цілісності ліпідного бішару та активності мембранозв'язаних ферментів. Іони міді (II) впливають на вказані показники в концентрації 10⁻⁸ М і більше [9], що співпадає з нашими дослідженнями про зменшення стійкості еритроцитів після впливу солі міді (II) в зазначених концентраціях. Наслідком таких змін може бути зменшення стійкості мембран еритроцитів до впливу кислоти, що показано в наших дослідженнях.

Отже, узагальнюючи отримані результати, необхідно зазначити: – ацетатний комплекс Cu/Cd з етилендіаміном (PO244) взаємодіє з

мембранами еритроцитів, що проявляється зменшенням стійкості цих клітин до пошкоджуючого впливу кислоти;

- серед складових PO244 найбільш активно взаємодіють з мембранами еритроцитів іони міді (II) в концентрації 10⁻⁴М, що підтверджується гемолізом 100% еритроцитів безпосередньо після додавання кислоти;
- пошкоджуючий вплив іонів міді (II) переважає такий для PO244 більше, ніж у чотири рази;
- взаємодія з мембранами еритроцитів PO244 є результатом дії вихідної речовини, а не продуктів її розкладу, що підтверджується різним впливом на стійкість еритроцитів досліджуваного комплексу і його складових: солей міді або кадмію, етилендіаміну і ацетату натрію.

ЛИТЕРАТУРА

1. Деклараційний патент України на винахід № 42462 А, С01G 1/00, А61К 31/13, А61К 31/30. Бромідний комплекс міді (II) та кобальту (III) з діетаноламіном, що виявляє протипухлинну дію / Кокозей В.М., Васильєва О.Ю., Маханькова В.Г., Шляховенко В.О. — Бюл. № 9, 2001.
2. Патент України на винахід № 36684, С01G 3/00, 51/00, С07С 211/65. Бромідний комплекс міді (II) та кобальту (III) з діетаноламіном, що виявляє антифтовірусну дію / Скопенко В.В., Бойко А.Л., Кокозей В.М., Поліщук В.П., Маханькова В.Г., Тивончук Т.П., Васильєва О.Ю., Рижкова А.Є. — Бюл. № 11, 2003.
3. Формування резистентності грамнегативних та грампозитивних тесткультур 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.
4. 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/Кокозей В.М., Гарманчук Л.В., Нестерова О.В., Яворська Н.В., Федорчук О.Г., Сенчило Н.В., Перепелиціна О.М., Позур В.В., Бюл. № 20, 2008.
5. Hohenheim Consensus Workshop: Copper / K. Sch?mann, H.G. Classen, H.H. Dieter [et al.] // Eur. J. Clin. Nutr. — 2002. — V. 56, N. 6. — P. 469 — 483.
6. Надинская М.Ю. Болезнь Вильсона-Коновалова / М.Ю. Надинская // Справ. Полікл. Врача. — 2005. — Т.5, №6. — 10 с.
7. Губський Ю.І. Вивчення компонентів системи гемоглобіну та антиоксидантних ферментів за кадмієвій інтоксикації // Ю.І. Губський, Х.М. Ерстенюк. Укр. Біохім. Журн. — 2002. — Т.74, №5. — С.124-127.
8. Белінська І.В. Гематотоксичність хлоридного комплексу Cu/Zn з етилендіаміном при однократному введенні / І.В. Белінська, Т.В. Рыбальченко, В.М. Кокозей [та ін.] // Совр. Пробл. Токсикологии. — 2008. — №2. — С.20 — 25.
9. Филинская Е.М. Мембранотропная активность гетерополиядерных комплексов Cu(II)/Co(II) с диэтанололамином / Е.М. Филинская, Т.В. Рыбальченко, Г.В. Островская [та ін.] // Доповіді НАН України. — 2008. — №7. — С.179 — 183.
10. Малюк І.В. Роль карбонових кислот у регуляції реактивності плазматичної мембрани / І.В. Малюк, Г.Г. Репецька, В.І. Малюк, В.К. Рыбальченко // Нейрофизиология. — 2000. — Т.32, N3. — С.268 — 271.
11. Леонова В.Г. Анализ эритроцитарных популяций в онтогенезе человека / В.Г. Леонова — Новосибирск: Наука, 1987. — 242 с.

Белинская И.В., Рыбальченко Т.В., Нестерова О.В., Кокозей В.Н., Рыбальченко В.К.

ВЛИЯНИЕ АЦЕТАТНОГО КОМПЛЕКСА CU/CD С ЭТИЛЕНДИАМИНОМ НА КИСЛОТНЫЙ ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ

Ацетатный комплекс Cu/Cd с этилендиамином проявляет антимикробную, фунгицидную и противоопухолевую активность и может быть использован для разработки лекарственных препаратов. Соединения меди и кадмия вызывают гемолиз эритроцитов, поэтому изучение влияния комплексного соединения, которое содержит эти металлы вместе, на стабильность эритроцитов является актуальным. Показано, что ацетатный комплекс Cu/Cd с этилендиамином взаимодействует с мембранами эритроцитов, что проявляется увеличением лизированных эритроцитов при воздействии 7,5 мМ HCl (кислотный гемолиз). Из составляющих комплекса наиболее активно взаимодействует с мембранами эритроцитов ионы меди (II), что проявляется 100% гемолизом эритроцитов непосредственно после добавления кислоты. Повреждающее воздействие соли меди превосходит ацетатный комплекс Cu/Cd с этилендиамином более чем в 4 раза при одинаковой концентрации меди. На эритроциты воздействует PO244 как исходное вещество, а не продукты его разложения, что подтверждается разным воздействием на стойкость эритроцитов самого комплекса и его составляющих: солей меди или кадмия, этилендиамина и ацетата натрия.

Byelinska I.V., Rybalchenko T.V., Nesterova O.V., Kokozay V.N., Rybalchenko V.K.

INFLUENCE OF ACETIC CU/CD COMPLEX WITH ETHYLENDIAMINE ON ACID ERYTHROCYTES HEMOLYSIS

A new Cu/Cd acetate complex with ethylenediamine (PO244) has revealed bactericidal, fungicidal and antitumour activity and has a potential in the development of new medicines. Compounds containing Cu or Cd cause hemolysis of the erythrocytes and a study of the influence of a complex that contains both Cu and Cd on erythrocytes stability is of current interest. The Cu/Cd acetate complex with ethylenediamine has been shown to interact with membranes of erythrocytes what was manifested by increasing of a number of lysed cells under the action of 7,5 mM HCl (acid hemolysis). The most active component of the complex towards membranes of erythrocytes is copper what shows as 100% hemolysis of erythrocytes immediately after an injection of acid. The harmful influence of copper salt exceeds that of PO244 more than four times. The interaction of PO244 with membranes of erythrocytes is a result of the action of the initial compound and not the products of its decomposition. That is confirmed by the different influence on the erythrocytes stability of the complex investigated itself and a mixture of its "components": salts of copper and cadmium, ethylenediamine and sodium acetate.