

УДК 577.118;615.273.2

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕДНОГО ХЕЛАТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПОСТГЕМОМОРРАГИЧЕСКОЙ АНЕМИИ У БЕЛЫХ КРЫС

О.Ф. Денисова

ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет»

Проведено изучение влияния тирозината меди (хелатного комплекса) на показатели красной крови у белых крыс при экспериментальной постгеморрагической анемии. Направленный синтез хелатного комплекса был осуществлен в лабораторных условиях. Экспериментальными животными послужили белые крысы, у которых была моделирована постгеморрагическая анемия. Определяли концентрацию гемоглобина, количество эритроцитов, гематокрит, содержание белка и белковых фракций в сыворотке крови. Под влиянием тирозината меди в сочетании с ферродексом наблюдалось улучшение картины красной крови с прогнозом улучшения резистентности организма.

Ключевые слова: тирозинат меди, крысы, постгеморрагическая анемия, гематокрит, белковые фракции.

Введение. Железодефицитная анемия относится к наиболее распространенным заболеваниям нашего времени [2, 13]. Патогенез алиментарной железодефицитной анемии связан с угнетением кроветворения на фоне ферментативных особенностей организма, в результате чего развивается смешанная гипоксия, влекущая за собой метаболические и функциональные нарушения в клетках, тканях и органах [3, 11, 12]. Неслучайно Gaidos подчеркивал, что «по своей цене железо не является драгоценным металлом. Но оно, безусловно, драгоценно по своей роли в истории и еще более по своему значению для живых существ» [11].

К железодефицитной анемии приводит, наряду с дефицитом железа, необеспеченность организма такими микроэлементами, как медь, йод, кобальт, марганец и др. Из них наиболее важна медь, участвующая в процессах кроветворения, в частности в синтезе гемоглобина, а также способствующая достаточному уровню абсорбции железа из желудочно-кишечного тракта в кровь. Вследствие недостатка меди, железо начинает усваиваться хуже, вызывая дополнительную депрессию синтеза гемоглобина, что ведет к усугублению анемии на фоне гипокупремии и гипоферемии [6]. Важное значение в повышении

биологической доступности минеральных веществ и обеспеченности организма микроэлементами придается хелатным соединениям. В сочетании с органическими соединениями активность микроэлементов возрастает в сотни и тысячи раз по сравнению с их ионным состоянием [4]. Согласно данным ряда авторов, биологическая доступность меди из аминокислотных хелатов значительно выше, чем из сернокислой меди [4, 6]. В данной работе протестирована активность тирозината меди в сочетании с Fe-содержащим соединением при экспериментальной постгеморрагической анемии у белых крыс.

Цель исследования. Исследование биологической активности тирозината меди при экспериментальной постгеморрагической анемии у белых крыс.

Материалы и методы. Проведен направленный синтез хелатного комплексного соединения тирозина с медью. Полученный препарат полностью соответствует теоретическим предпосылкам как по стехиометрическому, так и по структурному строению. Содержание меди в препарате составляет 15,3 %. Структура тирозината меди доказана методом длинноволновой инфракрасной (ИК)-спектроскопии по линиям $357,29 \text{ см}^{-1}$. Полученный хелат представляет собой бле-

стоящие фиолетового цвета кристаллы, мало-растворимые в воде, стойкие в слабощелочной среде и разлагающиеся в кислой [5].

Экспериментальными животными послужили нелинейные белые крысы. Опыты проведены на модели постгеморрагической анемии белых крыс. С этой целью 21 половозрелого самца 180-дневного возраста и массой

180–200 г взвешивали, двукратно (в течение двух дней) обескровливали на 40 % от общего объема крови, используя хвостовую вену. Крыс содержали в теплом помещении, давали обильное питье, кормили по стандартному рациону для лабораторных животных. Схема опыта приведена в табл. 1.

Таблица 1

Схема проведенного эксперимента

| Группа | Количество животных | Инъекции и дозы |
|-------------------------|---------------------|--|
| I (контроль) | 7 | 1. 0,9 % NaCl – 0,5 мл, в/м 2. 0,9 % NaCl – 0,5 мл, в/м |
| II (ферродекс) | 7 | 1. Ферродекс – 0,5 мл, в/м (37,5 мг Fe) 2. Ферродекс – 0,5 мл, в/м (37,5 мг Fe) |
| III (тирозинат меди) | 7 | 1. Ферродекс – 0,5 мл, в/м (37,5 мг Fe) 2. Тирозинат меди – 0,5 мл 0,16 % р-р, в/м (0,03 мг Cu) |

В течение трех дней инъекции были сделаны двукратно. Животным контрольной группы вводили внутримышечно физиологический раствор по 0,5 мл во внутреннюю часть бедра; крысам второй группы – двукратно ферродекс по 0,5 мл; животным третьей группы вторую инъекцию ферродекса заменяли инъекцией тирозината меди, используя 0,16 % раствор.

В течение экспериментального периода наблюдали динамику содержания в крови гемоглобина, эритроцитов, величины гематокрита. Гематологические показатели определяли по общепринятым методикам. Содержание гемоглобина определяли гемометром типа Сали (ГС-2). Для подсчета количества эритроцитов кровь набирали в смесители для эритроцитов в разведении 1:200 на изотоническом растворе NaCl и считали в камере Горяева. Величину гематокрита определяли в капиллярах после центрифугирования при 3000 об/мин в специальном считывающем устройстве.

Кровь для исследования брали из хвостовой вены в следующие периоды: в начале опыта (до каких-либо воздействий), спустя три дня после обескровливания, на 10-й день после проведенных инъекций, в конце эксперимента (на 30-й день после инъекций).

Кровь брали утром перед кормлением и исследовали немедленно.

В сыворотке крови определяли активность церулоплазмينا по методу Х. Ревина (1961) в различные сроки: в начале опыта, после второго кровопускания, на 10-й и 30-й дни после инъекций препаратов. Общий белок в сыворотке крови определяли рефрактометрическим методом. Расчет содержания белка проводили по таблице, разработанной Д.Ф. Пресняковым. Определение содержания белка и белковых фракций в сыворотке крыс на 10-й день после введения препаратов производилось по методу С.А. Карнюка.

Исследования проведены в лабораториях кафедры химии Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии им. П.А. Столыпина, кафедры биохимии Казанского научно-исследовательского ветеринарного института, кафедры спектроскопии УлГУ, кафедры морфологии УлГУ, кафедры спектрального анализа НИИ атомных реакторов (г. Димитровград), кафедры общей патологии ВНИВИПФиТ (г. Воронеж).

Результаты и обсуждение. Для синтеза тирозината меди с целью его дальнейшего изучения разработаны технологический регламент производства и технические условия на препарат [5].

Полученные кристаллы тирозината меди исследовались методом ИК-спектроскопии на спектрофотометре Specord M-80 в таблетках КВт.

Полученные нами результаты подтверждают предположения о хелатной природе связи тирозина и меди в комплексе. ИК-спектроскопия является одним из информативных методов в изучении биологических соединений. Анализ литературных данных по исследованию спектров аминокислот позволяет судить о малой изученности соединений металлов с аминокислотами методом ИК-спектроскопии [7, 9, 12]. Ценность инфракрасной спектроскопии обусловлена тем, что вид колебаний каждой функциональной группы очень чувствителен к малейшим изменениям химической структуры, конформации и окружения.

С целью подтверждения биологической активности полученного соединения нами исследовались показатели красной крови в группах контрольных и опытных животных. Вторым контролем послужила группа белых крыс, которым на фоне постгеморрагической анемии вводили железосодержащий препарат ферродекс.

Гематологические показатели крови крыс до применения и на фоне применения различных препаратов представлены в табл. 2. В результате кровопускания картина красной крови изменилась. Уровень гемоглобина снизился во всех трех экспериментальных группах: в I – на 2,5 %, во II – на 3,4 %, в III – на 3,3 %. Аналогично снизилось количество эритроцитов и показатель гематокрита. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о вызванной постгеморрагической анемии у животных.

В III группе животных с постгеморрагической анемией, получающих тирозинат меди и ферродекс, количество гемоглобина к 10-му дню возросло на 8,4 %, число эритроцитов – на 2 %, гематокритный показатель – на 14,3 %.

Восстановительная активность организма крыс, получающих медный хелат, превышала в среднем таковую контрольных животных

второй группы в 3 раза. Полученные данные свидетельствуют о стимулирующем влиянии меди в сочетании с железом на эритро- и гемопоз и согласуются с данными литературы [1, 3, 6].

На 10-й день от начала кровопускания количество общего белка в крови животных второй контрольной группы, которым дважды вводили ферродекс, и третьей опытной группы, инъецированных ферродексом и тирозинатом меди, было приблизительно одинаковым ($8,28 \pm 0,01$ и $8,25 \pm 0,01$ г% соответственно). Достоверность различий в содержании альбуминов и глобулинов статистически не установлена (табл. 3). Альбуминовая фракция опытной группы превосходила контрольную на 15,1 %. Содержание альфа-глобулинов опытной группы составило $20,23 \pm 4,64$ % ($2,16 \pm 0,38$ г%), что на 4 % меньше количества этой фракции в контрольной группе. По бетта-глобулинам к 10-му дню после введения препаратов различий между экспериментальными группами выявлено не было ($28,68 \pm 6,59$ и $28,77 \pm 11,36$ %). Более высокий уровень гамма-глобулинов отмечен у крыс второй контрольной группы ($22,07 \pm 5,29$ %) в сравнении с опытной группой ($19,73 \pm 8,04$ %). Альбуминово-глобулиновый коэффициент имел обратно пропорциональную зависимость от гамма-глобулинов и составил для второй контрольной группы 0,28, для опытной – 0,34. Отсюда следует, что тирозинат меди нормализует общее состояние животных и общую неспецифическую реактивность организма.

Изучение содержания цирулоплазмينا в сыворотке крови крыс с постгеморрагической анемией позволило установить, что инъекции тирозината меди способствуют его повышению с 1-го по 30-й день эксперимента (табл. 4). Так, к 10-му дню количество цирулоплазмينا у опытных крыс составило $42,4 \pm 5,1$ мг%, что на 6,8 % больше, чем во II группе, и на 4,7 % больше, чем в I. К концу наблюдения активность фермента становится приблизительно одинаковой и составляет соответственно группам $51,5 \pm 6,87$, $50,9 \pm 6,9$ и $52,4 \pm 4,77$ мг%.

Таблица 2

Гематологические показатели крыс на фоне применения различных препаратов

| Группа животных | Гемоглобин, г% | | | | Эритроциты, млн/мм ³ | | | | Гематокрит, % | | | |
|-------------------------------------|----------------|-----------|-----------------------|-----------|---------------------------------|----------------|---------------|-----------|---------------|----------------|-----------------|-----------------------------|
| | Начало | 3-й день | 10-й день | 30-й день | Начало | 3-й день | 10-й день | 30-й день | Начало | 3-й день | 10-й день | 30-й день |
| I (без введения препаратов) | 13,7±1,18 | 11,2±0,52 | 13,3±0,83 | 16,1±0,69 | 6,61±0,49 | 4,93±0,13 | 6,27±0,12 | 7,67±0,68 | 40,8±0,25 | 30,8±0,24 * | 44,8±0,25 | 50,0±1,48 |
| II (ферродекс + ферродекс) | 14,7±0,30 | 11,3±0,29 | 15,4±0,32 | 15,6±0,14 | 6,64±0,27 | 4,47±0,16 | 6,87±0,14 | 7,01±0,23 | 41,3±0,27 | 28,4±0,25 | 55,9±0,34 | 45,4±2,28 |
| III (ферродекс + тирозинат меди) | 14,6±0,34 | 11,3±0,48 | 16,7±0,43 * +++ | 16,0±0,46 | 6,72±0,25 | 4,28±0,14 * | 7,0±0,19 * | 7,6±0,38 | 40,9±0,26 | 26,6±0,24 | 52,1±1,26 ** | 51,9±1,21 * ** +++ |

Примечание. * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,001$ при сравнении I и III групп; +++ – $p < 0,05$ при сравнении II и III групп.

Таблица 3

Показатели белковых фракций крови крыс на фоне применения различных препаратов

| Группа животных | Общий белок, г% | Альбумины | | Глобулины | | | | | | Альфа-глобулиновый индекс |
|-------------------------------------|-----------------|------------|-----------|------------|-----------|-------------|-----------|------------|-----------|---------------------------|
| | | % | г% | альфа- | | бета- | | гамма- | | |
| | | | | % | г% | % | г% | % | г% | |
| II (ферродекс + ферродекс) | 8,28±0,01 | 21,96±0,7 | 1,82±0,01 | 27,29±1,74 | 2,26±0,14 | 28,68±6,29 | 2,37±0,56 | 22,07±5,29 | 1,83±0,44 | 0,28 |
| III (ферродекс + тирозинат меди) | 8,25±0,01 | 25,27±4,41 | 2,09±0,37 | 26,23±4,64 | 2,16±0,38 | 28,77±11,36 | 2,37±0,94 | 19,73±8,04 | 1,63±0,67 | 0,34 |

Таблица 4

**Активность церулоплазмينا в сыворотке крови крыс
на фоне применения различных препаратов**

| Группа животных | Количество церулоплазмينا, мг% | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | на 3-й день после кровопускания | на 10-й день после кровопускания | на 30-й день после кровопускания |
| I (физ. раствор) | 36,11±6,16 | 40,51±7,29 | 51,50±6,87 |
| II (ферродекс + ферродекс) | 35,83±4,73 | 36,32±4,68 | 50,91±6,90 |
| III (ферродекс + тирозинат меди) | 42,62±7,56 | 42,45±5,11 | 52,41±4,77 |

Результаты исследования показали, что при постгеморрагической анемии наблюдается повышение активности церулоплазмينا. Наши данные по этому вопросу полностью согласуются с результатами, полученными Э.В. Тен [10]. Однако, по данным других авторов, введение хелатных соединений меди вызывает снижение активности церулоплазмينا в сыворотке крови крыс [8].

Заключение. Разработанный способ высокотемпературного синтеза хелаткомплекса меди с тирозином позволяет получить препарат, являющийся стимулятором кроветворения в организме животных. Структура комплекса доказана методом длинноволновой ИК-спектроскопии. При изучении биологической активности полученного препарата выявлено, что под влиянием тирозината меди в сочетании с ферродексом в крови анемичных животных наблюдается активное повышение уровня гемоглобина. Улучшение картины красной крови неизменно сопровождается повышением резистентности организма, что отражается на содержании белковых фракций крови и альбумино-глобулинового показателя. Активность основного медьпротеина крови церулоплазмينا при введении тирозината меди повышается на 4,7 % к 10-му дню после инъекции.

1. *Абдурахманов Г. М.* Экологические особенности содержания микроэлементов в организме животных и человека / Г. М. Абдурахманов, И. В. Зайцев. – М. : Наука, 2004. – 280 с.

2. *Анохин Б.* Опыт лечения телят-молочников при алиментарной анемии / Б. Анохин,

Н. Макринова, В. Шушлебин // Молочное и мясное скотоводство. – 2003. – № 2. – С. 32–33

3. *Воробьев П. А.* Анемический синдром в клинической практике / П. А. Воробьев. – М. : Ньюдиамед, 2001. – 168 с.

4. *Денисова О. Ф.* Исследование антианемических свойств хелатного соединения меди с тирозином при клинической железодефицитной анемии поросят-сосунов / О. Ф. Денисова // Материалы Первого съезда ветеринарных фармакологов России / Всерос. науч.-исслед. ветеринар. ин-т патологии, фармакологии и терапии. – Воронеж, 2007. – С. 234–237.

5. *Денисова О. Ф.* Исследование комплексов тирозината меди методом ИК-спектроскопии / О. Ф. Денисова, А. С. Хромов // Научные труды Ульяновского политехнического ин-та. Вещество и поле. – Ульяновск, 1991. – С. 52–57.

6. *Завалишина С. Ю.* Дефицит железа у телят и поросят / С. Ю. Завалишина, Е. Г. Краснова, И. Н. Медведев // Вестн. Оренбургского гос. ун-та. – 2011. – № 15 (134). – С. 55–58.

7. *Маркин А. В.* Возможности спектроскопии комбинационного рассеяния применительно к анализу наноструктурированных объектов : автореф. дис. ... канд. хим. наук / А. В. Маркин. – Саратов, 2013. – 19 с.

8. *Николаев М. Г.* Диагностика и профилактика анемии и иммунной недостаточности у поросят : автореф. дис. ... канд. вет. наук / М. Г. Николаев. – Витебск, 2002. – 32 с.

9. *Сильверстейн Р.* Спектрометрическая идея идентификация органических соединений / Р. Сильверстейн, Г. Басслер, Т. Морри. – М. : Мир, 1997. – 590 с.

10. *Тен Э. В.* Биохимические показатели у животных в эксперименте с хелатными комплексами меди / Э. В. Тен // Профилактика и ликвидация болезней домашних животных и птиц. – Ульяновск : УСХИ, 1980. – С. 68–72.

11. *Casassus P.* Iron-deficiency anemia. Etiology. Physiopathology / P. Casassus // Rev. prof. – 2001. – № 2. – P. 209–213.

12. Clark S. F. Iron deficiency anemia / S.F. Clark // Nutr Clin. Pract. – 2008. – № 23 (2). – P. 128–141.

13. Killi P. S. Iron Deficiency Anemia / P. S. Killi, M. D. Bennett // American Family Physician. – 2007. – № 75 (5). – P. 671–678.

THE STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITY THYR-CU CHELATE IN WHITE RATS WITH EXPERIMENTAL POSTHAEMORRAGIC ANEMIA

O.F. Denisova

Ulyanovsk State University

A study of the Thyr-Cu chelate on the indices of red blood in white rats with experimental posthaemorrhagic anemia. Directed synthesis of chelate complex compound of Thyrozone with copper were performed under laboratory conditions. Animals served as white rats, which was modeled posthaemorrhagic anemia. Determining the concentration of haemoglobin, the amount of Er, haemotokritis, the protein fractions indexes in serum. Under the influence of Thyr-Cu in combination with ferrodex there was an improvement in picture of red blood with the projected increase resistance to infections etc.

Keywords: Thyr-Cu chelate, rats, thyrozone, posthaemorrhagic anemia, haemotokritis, protein fractions, resistance to infections.