

Н. О. Карпезо, І. В. Бєлінська, Т. В. Рибальченко, В. М. Кокозей,
В. К. Рибальченко, О. В. Врещ

**Вплив різнометалічного комплексу
[Cu(dmen)₂][Fe(CN)₅(NO)]
(dmen=N,N-диметилетилендіамін)
на морфофункціональний стан печінки**

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Ю. Євтушенком)

Досліджено вплив різнометалічного комплексу [Cu(dmen)₂][Fe(CN)₅(NO)] (dmen = N, N-диметилетилендіамін, код KL447) на морфофункціональний стан печінки щурів при субхронічному пероральному введенні його в організм. Встановлено, що KL447 викликає дозозалежну реакцію печінки. Доза 2,5 мг/кг є неефективною. При дозі 25 мг/кг відбувається збільшення розміру гепатоцитів та розширення синусоїдних гемокапілярів. Така доза за вмістом заліза порівнянна з терапевтичною, що використовується при лікуванні анемії. KL447 у цій дозі впливає на морфофункціональний стан печінки, проте не пошкоджує її. При дії KL447 у дозі 100 мг/кг з'являються осередки запалення навколо судин та жовчних протоків, значних змін зазнає мікроциркуляторна система печінки (нерівномірне значне розширення та звуження синусоїдних гемокапілярів), максимально збільшується розмір гепатоцитів. Виявлено відмінності в реакції ядер гепатоцитів центрлобулярної і перипортальної зон печінкової часточки. Збільшення розміру ядер гепатоцитів центрлобулярної зони вказує на активацію процесів детоксикації в печінці.

Різнometалічний комплекс [Cu(dmen)₂][Fe(CN)₅(NO)] (dmen = N, N-диметилетилендіамін, код KL447), синтезований на хімічному факультеті Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, завдяки наявності в його складі атомів міді та заліза є потенційним стимулятором кровотворення, зокрема синтезу гемоглобіну, оскільки залізо є складовою частиною останнього, а мідь входить до складу білків, які беруть участь у зв'язуванні і транспорті іонів заліза та синтезі молекули гемоглобіну.

Вивчення впливу будь-якої хімічної сполуки на організм потребує детального дослідження реакції печінки, яка відіграє провідну роль у метаболізмі і біотрансформації більшості речовин і водночас є найбільш чутливим до дії шкідливих факторів органом. Саме в ній відбувається детоксикація ксенобіотиків. Відомо, що різнометалічні комплекси, зокрема комплекси міді та кобальту, впливають на штучні ліпідні мембрани [1], на екто-АТФазну та Mg²⁺, Ca²⁺-АТФазні активності плазматичних мембран гепатоцитів щурів [2], на жовчосекреторну функцію печінки [3]. Використовуючи поведінкові реакції як інтегральний показник фізіологічного стану організму та впливу на нервову систему хімічних сполук, ми показали, що різнометалічний комплекс KL447 сприяє зниженню тривожності та зростанню орієнтовно-дослідницької активності щурів, тобто не має токсичної дії на ЦНС [4]. Проте особливо доцільним є аналіз морфофункціонального стану печінки при дії KL447,

оскільки печінка — основний орган, що депонує і виводить з жовчю залізо і мідь [5, 6], які містять ця сполука.

У даній роботі наведено результати дослідження впливу різнометалічного комплексу KL447 на морфофункціональний стан печінки щурів при субхронічному пероральному введенні його в організм. Досліди проводили на самках нелінійних білих щурів з початковою масою 160–190 г. Щурів утримували при стандартному світловому дні на нормальному харчовому раціоні. KL447, розведений у дистильованій воді, вводили протягом місяця інтрагастрально за допомогою зонда щоденно вранці до годування тварин у дозах 2,5, 25 та 100 мг/кг. Контрольні тварини у вищезазначений спосіб отримували дистильовану воду.

Для гістологічного аналізу шматочки печінки фіксували в рідині Буена, після стандартної гістологічної обробки заливали в парафін, робили зрізи завтовшки 5–7 мкм та забарвлювали їх гематоксиліном Б'ємера з дофарбуванням еозином та оранжем G. Функціональний стан печінки оцінювали, базуючись на візуальному аналізі препаратів та морфометричних вимірах. У печінці вимірювали площу (мкм²) поперечного перерізу гепатоцитів та їх ядер у централобулярній та перипортальній зонах печінкової часточки окремо, оскільки гепатоцити різних зон печінкової часточки можуть по-різному реагувати на вплив хімічних речовин у зв'язку з гетерогенністю їх ферментативної активності, а саме: гепатоцити периферії печінкової часточки пов'язані перш за все з білково-синтетичною функцією печінки, а гепатоцити центрів часточок — з антиоксидантною її функцією. Враховували ядерно-цитоплазматичне відношення, що є показником функціональної активності клітин. Для характеристики мікроциркуляторного русла печінки вимірювали діаметр (мкм) синусоїдних гемокапілярів, які впадають у центральні вени. Морфометричні дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопа Olympus BX-41 та програми Image J. Статистичну обробку результатів виконували з використанням стандартного пакета програм статистичного аналізу Microsoft Excel 97 для персонального комп'ютера. Вірогідною вважалась різниця при значенні $p \leq 0,05$ за t -критерієм Стьюдента.

Гістологічні дослідження показали, що у щурів контрольної групи печінка має типovu для цього виду тварин будову. Печінкова часточка у щурів нечітко виражена. Гепатоцити мають округло-полігональну форму, містять округле ядро з ядерцями, утворюють тяжі, які галузяться і сходяться до центральної вени. Синусоїдні гемокапіляри, які впадають у центральні вени, добре виражені, містять формені елементи крові. Гепатоцити централобулярної та перипортальної зон печінкової часточки не відрізняються за своєю будовою.

Площа поперечного перерізу гепатоцитів централобулярної зони печінкової часточки становить $(227,6 \pm 8,9)$ мкм², а їх ядер — $(38,3 \pm 2,1)$ мкм². Площа поперечного перерізу гепатоцитів та їх ядер у перипортальній зоні становить відповідно $(224,4 \pm 10,4)$ мкм² і $(33,2 \pm 1,6)$ мкм². Ядерно-цитоплазматичне відношення у централобулярній зоні дорівнює $0,20 \pm 0,02$, а у перипортальній зоні — $0,17 \pm 0,01$. Діаметр синусоїдних гемокапілярів дорівнює $(1,79 \pm 0,36)$ мкм.

KL447 у дозі 2,5 мг/кг не викликає помітних структурних змін у печінці щурів. Гепатоцити зберігають округло-полігональну форму, містять округле ядро з ядерцями. В поодиноких гепатоцитах обох зон печінкової часточки в цитоплазмі з'являється невелика кількість дрібних вакуолей. Розміри гепатоцитів та їх ядер не змінюються. Площа поперечного перерізу гепатоцитів централобулярної зони становить $(232,2 \pm 9,1)$ мкм², а їх ядер — $(39,1 \pm 2,0)$ мкм². У перипортальній зоні площа поперечного перерізу гепатоцитів та їх ядер

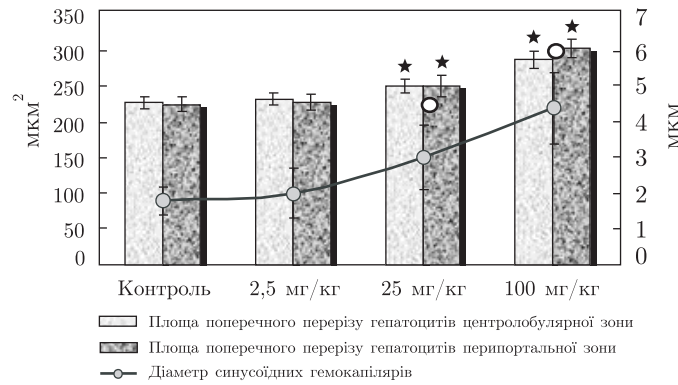


Рис. 1. Вплив різних доз KL447 на гепатоцити та синусоїдні гемокапіляри.

★ — різниця вірогідна між дослідом і контролем для значень площі поперечного перерізу гепатоцитів при $p \leq 0,05$;

○ — різниця вірогідна між дослідом і контролем для значень діаметра синусоїдів при $p \leq 0,05$

дорівнює відповідно $(228,1 \pm 11,2)$ мкм² та $(33,5 \pm 1,9)$ мкм². Ядерно-цитоплазматичне відношення як у центролобулярній, так і у перипортальній зонах не змінюється і становить відповідно $0,20 \pm 0,02$ та $0,17 \pm 0,02$. Мікроциркуляторне русло печінки залишається без помітних змін. Діаметр синусоїдних гемокапілярів дорівнює $(2,09 \pm 0,69)$ мкм (рис. 1).

Після дії KL447 у дозі 25 мг/кг печінка щурів зазнає певних змін. Серед переважної більшості майже незмінених печінкових часточок є такі, що мають гепатоцити з вакуолізованою цитоплазмою. Розмір вакуолей варіює від дрібних до середніх. Розмір гепатоцитів в обох зонах печінкової часточки вірогідно збільшується відносно контролю та попередньої серії дослідів. Площа поперечного перерізу гепатоцитів центролобулярної зони становить $(250,8 \pm 8,8)$ мкм², а перипортальної — $(250,1 \pm 14,8)$ мкм². Площа поперечного перерізу ядер гепатоцитів не змінюється і становить у центролобулярній та перипортальній зонах відповідно $(38,9 \pm 1,7)$ мкм² та $(34,7 \pm 2,6)$ мкм². Ядерно-цитоплазматичне відношення має тенденцію до зменшення: у центролобулярній зоні дорівнює $0,18 \pm 0,02$, а у перипортальній — $0,16 \pm 0,01$. Відмічено реакцію мікроциркуляторного русла. Синусоїдні гемокапіляри місцями мають розширення, в яких іноді зосереджуються лейкоцити. З'являються лейкоцити і в деяких навколосудинних зонах. Діаметр синусоїдних гемокапілярів збільшується до $(3,09 \pm 0,86)$ мкм (див. рис. 1).

KL447 у дозі 100 мг/кг призводить до істотних змін у печінці щурів. З'являються невеликі осередки запалення, локалізовані як навколо центральних вен, так і в перипортальній зоні печінкової часточки, де вони займають не тільки периваскулярну зону, а й охоплюють жовчні протоки. Переважна більшість гепатоцитів збільшується в розмірах. Цитоплазма їх містить різного розміру, часто великі, неправильної форми оптично пусті вакуолі, які займають значну частину об'єму клітини. Ці вакуолі локалізовані переважно на периферії клітин або поширюються і в центральну їх частину. Окремі гепатоцити або групи гепатоцитів, які оточують центральні вени, а також поодинокі клітини перипортальної зони мають підвищену еозинофілію і менші розміри. Вони містять дрібні вакуолі або зовсім не вакуолізовані. Ядра значної більшості гепатоцитів набувають неправильної форми, часто стають темними, зрідка — фрагментовані. Серед гепатоцитів спостерігаються невеликі осередки без'ядерних клітин, що свідчить про початок некротичного процесу. Треба відзначити різний ступінь пошкодження гепатоцитів як у різних печінко-

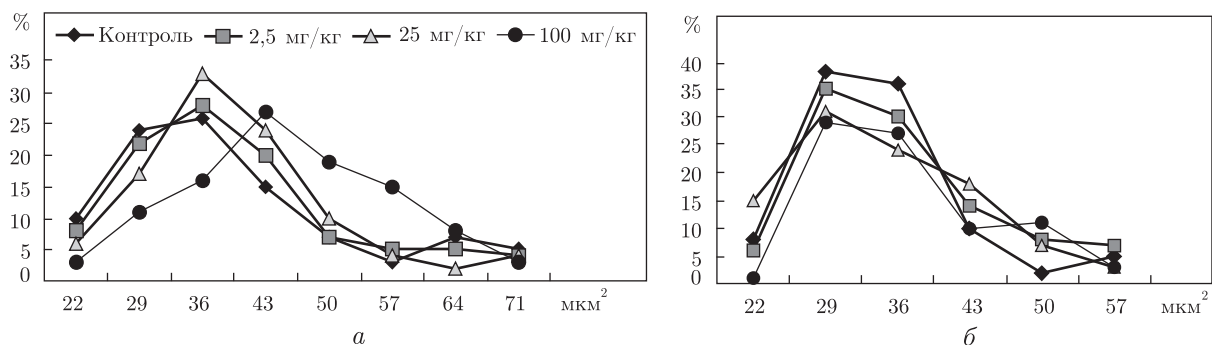


Рис. 2. Варіабельність значень площі ядер гепатоцитів централобулярної (а) та перипортальної (б) зон після дії KL447

вих часточках у межах однієї печінки, так і в печінці різних особин. Площа поперечного перерізу гепатоцитів централобулярної та перипортальної зон збільшується відповідно до $(287,3 \pm 12,4)$ μm^2 та $(302,9 \pm 13,1)$ μm^2 (див. рис. 1). Площа поперечного перерізу ядер гепатоцитів централобулярної зони збільшується до $(45,0 \pm 2,0)$ μm^2 . На графіку (рис. 2, а) видно зсув праворуч кривої варіабельності значень площі ядер гепатоцитів централобулярної зони тільки при дії KL447 у максимальній дозі. При цьому зменшується кількість ядер розміром від 22 до 43 μm^2 і зростає кількість ядер, розмір яких більший за 43 μm^2 . Появи ядер меншого чи більшого розміру, ніж у контрольній серії, не виявлено. Площа поперечного перерізу ядер гепатоцитів перипортальної зони не змінюється (див. рис. 2, б) і дорівнює $(33,3 \pm 1,6)$ μm^2 . Ядерно-цитоплазматичне відношення в централобулярній зоні залишається практично без змін $(0,19 \pm 0,02)$, а у перипортальній зоні зменшується до $0,12 \pm 0,02$, що свідчить про зниження функціональної активності гепатоцитів цієї зони печінкової часточки. Зазнає помітних змін і мікроциркуляторне русло печінки. Синусоїдні гемокапіляри нерівномірно розширені і звужені. Часто вони утворюють лакуни, заповнені лейкоцитами. Діаметр синусоїдних гемокапілярів збільшується до $(4,4 \pm 0,97)$ μm (див. рис. 1).

Аналіз отриманих даних показав, що різнометалічний комплекс KL447 викликає дозозалежну реакцію печінки щурів. Найменша доза KL447 (2,5 мг/кг) є неефективною. При збільшенні дози KL447 до 25 мг/кг у цитоплазмі частини гепатоцитів з'являються дрібні та середніх розмірів вакуолі, що призводить до збільшення об'єму клітин приблизно на 10 %. Істотних змін у ядерному апараті гепатоцитів не виявлено. Із збільшенням дози KL447 до 100 мг/кг істотно підвищується вакуолізація гепатоцитів (кількість та розміри вакуолей у цитоплазмі гепатоцитів). Розміри гепатоцитів зростають у централобулярній і перипортальній зонах печінкової часточки відповідно на 26 та 35%. Відбуваються зміни і в ядерному апараті клітин. Ядра гепатоцитів часто втрачають правильну форму, стають темними. Збільшуються розміри ядер гепатоцитів централобулярної зони. Оскільки відомо, що антиоксична функція печінки забезпечується переважно гепатоцитами цієї зони печінкової часточки і саме в них виявлена висока активність ферменту метаболізму ксенобіотиків — цитохрому P-450 [7], збільшення розмірів ядер гепатоцитів централобулярної зони свідчить про активацію процесів детоксикації ксенобіотика. У перипортальній зоні розміри ядер гепатоцитів не змінюються.

З підвищенням дози KL447 поглиблюються зміни у мікроциркуляторному руслі печінки від незначних поодиноких розширень синусоїдних гемокапілярів при мінімальній дозі

до збільшення просвіту капілярів в 1,7 раза при середній і в 2,5 раза при максимальній дозі. Водночас посилюється нерівномірність розширення синусоїдних гемокапілярів і зростає кількість лакун та вміст у них лейкоцитів. Значні нерівномірні розширення є ознакою токсичної дії на печінку KL447, особливо, у максимальній дозі. Накопичення лейкоцитів в утворених лакунах є передумовою або, навіть, початком лобулярного гепатиту. Про наявність гепатиту свідчить також поява осередків запалення [8, 9].

Важливо підкреслити, що сполуки заліза і, особливо, міді є досить токсичними речовинами [10, 11], а печінка в першу чергу зазнає їх ушкоджуючого впливу. Так, перевантаження залізом призводить до активації клітин Купфера, посилення синтезу колагену, некрозу поодиноких гепатоцитів та перипортального фіброзу; надлишок міді викликає стеатоз, а потім некроз гепатоцитів, розвиток хронічного гепатиту і надалі фіброз та цироз печінки [8, 9]. Досліджуваний комплекс у дозі 25 мг/кг, порівнянній за вмістом заліза з терапевтичною дозою, яка використовується при лікуванні анемії, хоча і викликає певні структурні та функціональні зміни в печінці щурів, не призводить до незворотних її пошкоджень. А значні морфофункціональні зміни в печінці щурів відбуваються лише при дії KL447 у максимальній дозі 100 мг/кг.

1. Філінська О. М., Бичко А. В., Рибальченко Т. В. та ін. Вплив гетерополіядерних сполук міді (II) та кобальту (III) з діетаноламіном на штучні ліпідні мембрани // Пробл. екол. та мед. генетики і клініч. імунології. Зб. наук. праць. – 2004. – Вип. 10 (63). – С. 35–41.
2. Філінська О. М., Рибальченко Т. В., Островська Г. В. та ін. Екто-АТФазна та Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазна активності плазматичних мембран гепатоцитів щурів за умов дії гетерополіядерних $Cu(II)/Co(III)$ комплексів з діетаноламіном // Доп. НАН України. – 2006. – № 3. – С. 173–175.
3. Синельник Т. Б., Весельський С. П., Козозей В. М., Маханькова В. Г., Рибальченко Т. В. Гальмівні ефекти гетерополіядерних комплексів $Cu(II)/Co(III)$ з діетаноламіном на секрецію жовчі у щурів // Там само. – 2008. – № 9. – С. 163–166.
4. Карпезо Н. О., Белінська І. В., Козозей В. М., Врещ О. В., Линчак О. В., Гурняк О. М., Рибальченко В. К. Вплив різнометалічного комплексу $[Cu(dmen)_2][Fe(CN)_5(NO)]$ ($dmen=N,N'$ диметилетилендіамін) на поведінкові реакції щурів // Пробл. екол. та мед. генетики і клініч. імунології. Зб. наук. праць. – 2009. – Вип. 8 (95). – С. 36–42.
5. Хендерсон Д. М. Патологія органів травлення. – Москва: Изд-во БИНОМ, 2005. – 272 с.
6. Schumann K., Classen H. G., Dieter H. H. et al. Hohenheim Consensus Workshop: Copper // Eur. J. Chem. Nutrit. – 2002. – 56. – С. 469–483.
7. Секамова С. М., Бекетова Т. П. Функціональна морфологія печені // Морфологіческая диагностика захворювань печені. – Москва: Медицина, 1989. – С. 8–37.
8. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей: Практич. руководство / Пер. с англ. под ред. З. Г. Апроксеевой, Н. А. Мухана. – Москва: ГЕОТАР-МЕД, 2002. – 864 с.
9. Подымова С. Д. Болезни печени. Руководство для врачей. – 3-е изд. – Москва: Медицина, 2005. – 767 с.
10. Вредные вещества в промышленности. Справочник для химиков, инженеров и врачей. Т. III. Неорганические и элементарноорганические соединения / Под ред. Н. В. Лазарева, И. Д. Гадаскиной. – Ленинград: Химия, 1977. – 608 с.
11. Блошанский Ю. М., Geisser P., Хасабов Н. Н. Анемия беременных // Гинекология. – 2006. – 8, № 2. – С. 47–50.

N. O. Karpezo, I. V. Byelinska, T. V. Rybalchenko, V. M. Kokozyay,
V. K. Rybalchenko, O. V. Vreshch

**Influence of the mixed-metal complex $[\text{Cu}(\text{dmen})_2][\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$
(dmen=N,N-dimethylethylenediamine) on the morpho-functional
condition of rat liver**

The influence of the mixed-metal complex $[\text{Cu}(\text{dmen})_2][\text{Fe}(\text{CN})_5(\text{NO})]$ (dmen=N,N-dimethylethylenediamine, code KL447) on the morpho-functional condition of rat liver after the subchronic peroral introduction during a month is studied. It is established that KL447 has the dose-dependent action on liver. In the dose of 2.5 mg/kg, it wasn't effective. KL447 in the dose of 25 mg/kg led to hepatocytes enlargement and sinusoid hemocapillars dilatation. This dose by the Fe content is comparable to the therapeutic one in anemia treatment. KL447 in this dose had the influence on the morpho-functional condition of liver, but didn't damage it. KL447 in the dose of 100 mg/kg provoked the appearance of inflammation focuses around vessels and bile ducts. KL447 caused the significant changes in the liver microcirculatory system such as the irregular significant dilatation and the constriction of sinusoid hemocapillars. The enlargement of hepatocytes was the greatest. The differences of hepatocytes nuclei reactions in periportal and centrolobular zones were ascertained. The increase of centrolobular zone hepatocytes nuclei indicates the activation of the hepatic detoxication function.