

УДК 619:616.155.194:616—092

Г. С. ГРИГОРЬ'ЄВА¹, д.х.н.,
Н. Ф. КАНАХОВИЧ¹, к.х.н.,
С. О. ШАПОВАЛОВ², к.б.н.,
М. М. ДОЛГАЯ², к.б.н.,
Н. Є. УЗЛЕНКОВА³, к.б.н.

¹Інститут фармакології та токсикології АМН України

²Інститут тваринництва НААН України

³Інститут медичної радіології АМН України

ІТ НААНУ, вул. 7-ї Гв. Армії, 3, смт. Кулиничі, Харківська обл., 62404, Україна,

e-mail: shapovalov73@rambler.ru

ГЕМОПРОТЕКТОРНА ТА ГЕМОСТИМУЛЮЮЧА АКТИВНОСТІ ЕСМІНУ ПРИ ГЕМОЛІТИЧНІЙ АНЕМІЇ У ЩУРИВ

Нова залізовмісна поліядерна композиція мікроелементів має високу протианемічну активність. Її застосування призводить до нормалізації показників периферичної крові, позитивно впливає на процеси кістковомозкового кровотворення. Підібране співвідношення активних компонентів забезпечує високу біодоступність заліза, що дозволяє застосовувати препарат в досить низьких дозах.

Ключові слова: анемія, мікроелементи, кров, еритроцити, червоний кістковий мозок, щури.

Вступ

Питання дослідження підтримки гомеостазу системи еритроноу є одним з найбільш актуальних в вивченні адаптаційних можливостей організму людини та тварин [2, 3]. Вирішення цього завдання представляє можливість оцінки діапазону безпеки пошкоджуючих впливів, що надаються тим чи іншим зовнішнім фактором. У зв'язку із зростанням техногенних навантажень принциповим є дослідження впливу токсичних агентів на організм людини і тварин. Дослідження впливу гемолітичної отрути — фенілгідазину, що належить до ароматичних сполук, на систему кровотворення та пошук фізіолого-активних адаптогенів є актуальною проблемою [4, 6, 7]. Фенілгідазинова анемія призводить до гемічної гіпоксії та має спільні риси з метгемоглобінемією. В той же час вона має й істотні відмінності, основна з яких полягає в тому, що фенілгідазин, являючи собою гемолітичну отруту, призводить до руйнування еритроцитів [6]. Це і є головним фактором розвитку анемічного (гіпоксичного) стану організму [8, 10]. Фенілгідазин — продуцент супероксидних радикалів, які, взаємодіючи з мембранами еритроцитів, підсилюють перекисне окиснення ліпідів, що призводить до гемолізу. Як і для інших анемічних станів, для перебігу фенілгідазинової анемії характерна висока еритропоетична активність крові [2]. Вже на 5–6 добу після введення фенілгідазину основну масу циркулюючої крові (90–95%) складають ретикулоцити, які мають вдвічі більші

розміри, ніж зрілий еритроцит та скорочений термін життя. Незважаючи на активізацію кровотворення, лізис еритроцитів превалює над швидкістю їх утворення, в результаті чого і настає анемія [1, 6]. Внаслідок уведення лабораторним тваринам гемолітичної отрути фенілгідазину (ФГ) розвивається анемія, що супроводжується сильним оксидативним стресом [2, 10] і може служити адекватною моделлю для апробації препаратів з антиоксидантною дією.

Запобіганню розвитку небажаних явищ можна сприяти шляхом створення лікарських форм пролонгованої дії, або ж шляхом підвищення абсорбції Феруму і його внутрішньоклітинного метаболізму, що дозволить використовувати препарати меншими дозами [9, 11]. Згідно з даними літератури, на біодоступність Феруму значний вплив мають деякі органічні кислоти, вітаміни, вуглеводи і мікроелементи [5, 9–11]. Метою дослідження було вивчення гемопротекторної та гемостимулюючої активності Есміну при штучній гемолітичній анемії у щурів змодельованої за допомогою фенілгідазину.

Матеріали і методи дослідження

В експерименті були використані статевозрілі білі щури масою тіла 180–210 г, що утримувались на стандартному харчовому раціоні. Їх було розподілено на 4 групи: – група негативного контролю, яким щоденно внутрішньом'язово раз на добу протягом 4-х діб вводили фенілгідазин дозою 20 мг/кг; I – дослідна група тварин, яким, починаючи з другого дня після першого введення фенілгідазину щоденно внутрішньошлунково вводили композицію Есмін у вигляді завису в крохмальному клейстері в дозі 25 мг/кг (умовно терапевтична доза, встановлена для статевозрілих щурів) протягом двох тижнів; II – дослідна група тварин, які одержували препарат порівняння – краплі Береша (що має аналогічний мікроелементний склад) за тією ж схемою, що і Есмін – щоденно внутрішньошлунково в дозі 0,2 мл/кг, що відповідає вказаній дозі Есміну по залізу; III – інтактні тварини, які щоденно внутрішньошлунково одержували крохмальний клейстер в однакових об'єм-дозах. Всі групи були розподілені на три підгрупи кожна в залежності від терміну дослідження – на 5, 10 та 15 добу від початку введення ФГ. У відповідні терміни тварин декапітували, відбирали кров, кістковий мозок із стегнової кістки, робили мазки та визначали їх морфологічний склад стандартними методами. Стан системи крові при лікуванні ФГ анемії Есміном та препаратом порівняння оцінювали за кількісними та морфологічними показниками периферичної крові (кількість еритроцитів, тромбоцитів, вміст гемоглобіну та рівень ШОЕ (швидкості осідання еритроцитів), морфологічний склад лейкограми та клітинний склад кісткового мозку). Вміст гемоглобіну (Hb), кількість еритроцитів, гематокритне число (Ht) визначали на гематологічному аналізаторі «Sysmex» (Японія).

Результати дослідження та обговорення

Згідно з отриманими даними (табл. 1), на 5 добу після початку введення фенілгідазину (під анемії) у всіх групах тварин в периферичній крові спостерігається достовірне зниження вмісту гемоглобіну та кількості еритроцитів, підвищення вмісту лейкоцитів за рахунок лімфоцитозу.

Необхідно відзначити, що ступінь негативних змін цих показників у лікуваних Есміном щурів менша, ніж за живання крапель Береша. Так, якщо в контролі та при лікуванні останніми гемоглобін знижується під впливом фенілгідазину на 38%, а кількість еритроцитів – на 48% та 44% відповідно, то при лікуванні Есміном вміст гемоглобіну знижується всього на 26%, а кількість еритроцитів – на 40%. Необхідно зауважити, що на максимумі розвитку

Таблиця 1

**Динаміка показників морфологічного складу периферичної крові шурів
при фенілгідазинній анемії (М ± m, n = 6)**

Інтактні тварини	Контроль			Фенілгідазин + Есмін			Фенілгідазин + Краплі Береша		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Доба після першого введення фенілгідазину									
Гемоглобін, г/л									
145,0±9,0	90,1±6,0*	118,2±7,0*	130,4±9,0*	107,2±5,0 a, b	135,5±7,0*	150,1±9,0	90,8±5,0	120,5±6,0*	135,4±8,0
Еритроцити, млн/мкл									
6,8±0,4	3,6±0,2*	5,5±0,3*	5,8±0,3*	4,2±0,2*, a	6,8±0,3 a	6,9±0,3	3,9±0,2*	6,1±0,2	6,5±0,3
Лейкоцити, тис/мкл									
9,0±0,2	13,3±0,5*	8,0±0,3	8,4±0,3	12,4±0,5*	9,0±0,4	8,6±0,3	13,0±0,4*	9,2±0,4	7,9±0,3
Лімфоцити, %									
58,5±4,0	37,0±4,0*	61,0±0,2	57,0±2,0	76,4±3,0* a	58,0±2,0	57,2±3,0	75,0±4,0*	62,0±3,0*	51,0±3,0*
Тромбоцити, 109/л									
400,0±9	300,0±10,0*	310,0±10,0*	380,0±8,0	540,0±12,0 a, b	450,0±10,0*, a	400,0±10,0	380,0±10,0*	400,0±8,0	410,0±9,0
ШОЕ, мм/год									
4,0±0,1	4,3±0,3	4,2±0,2	4,1±0,2	4,0±0,2	4,2±0,2	4,0±0,2	4,1±0,2	4,2±0,2	4,0±0,2

Примітка: * – $p < 0,05$ відносно групи інтактних тварин; a – відносно контролю; b – відносно препарату порівняння.

анемії (5 доба) у вилікуваних Есміном щурів підвищення вмісту лейкоцитів. Введення фенілгідразину призводило також до достовірного зменшення вмісту тромбоцитів у крові тварин контрольної групи від 400 до 300 г/л, тоді як при введенні Есміну кількість тромбоцитів збільшувалося 400 до 540 г/л.

На 10-ту добу після введення фенілгідразину проходило поступове відновлення показників периферичної крові, хоч у контрольній групі тварин та при лікуванні краплями Береша вміст гемоглобіну все ще залишався меншим у порівнянні з інтактними тваринами. У щурів же, яких лікували препаратом Есмін, усі показники периферичної крові досягали нормальних величин. На 15-ту добу дослідження, на фоні загальної стабілізації картини периферичної крові під впливом Есміну збільшення кількості еритроцитів та рівню гемоглобіну було більш виражене.

Одночасно з дослідженням складу периферичної крові у всіх групах тварин аналізували клітинний склад центральної ланки кровотворення кісткового мозку. Крім підрахунку клітин мієлограми, визначали індекси визрівання клітинних елементів еритроїдного і мієлоїдного типу, лейкоеритроцитарне співвідношення, яке віддзеркалювало стан системи гемопоезу. При цьому встановлено (табл. 2), що на 5-ту добу від початку введення фенілгідразину в контролі достовірно знижувалась кількість молодих форм еритроїдних клітин (базофільних і поліхроматофільних еритробластів) – на 34,4 та 60,0% відповідно. Спостерігалось також підвищення рівня лімфоцитів у порівнянні з інтактними тваринами.

При лікуванні щурів Есміном на 5-ту добу спостереження вміст молодих форм еритроїдних клітин залишався в межах норми та був вищим, ніж у контролі, та при лікуванні краплями Береша. Характерно, що введення Есміну попереджувало підвищення вмісту лімфоцитів у кістковому мозку. Кістковомозкові індекси також залишалися в межах нормальних величин. Фенілгідразин, як свідчать отримані результати, не впливав на кількість молодих та зрілих клітин мієлоїдного ряду. На 10-ту добу в контрольній групі тварин вміст молодих клітин еритроїдного ряду залишався все ще дещо зниженим відносно вихідних даних, а при введенні крапель Береша цей показник нормалізувався. В групі тварин, яких лікували Есміном, кількість молодих еритроїдних клітин перевищувала їх вміст у інтактних тварин, та тих що отримували препарат порівняння краплі Береша.

На 15-ту добу в контролі та при лікуванні краплями Береша показники мієлограми нормалізувалися. Таким чином, отримані дані свідчать про те, що застосування Есміну при гемолітичній анемії попереджає зниження кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну в периферичній крові, а також зниження кількості еритроїдних клітин в кістковому мозку. Збільшення молодих форм еритроїдних клітин в кістковому мозку при введенні Есміну, можливо, пов'язане не лише з його гемопротекторними, але й гемостимулюючими властивостями. Есмін вірогідно позитивно відрізняється за своєю дією від препарату порівняння, при введенні якого не спостерігалось стимуляції еритропоезу в кістковому мозку та попередження зниження в периферичній крові кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну.

Таким чином, застосування Есміну при гемолітичній анемії попереджує зниження кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну в периферичній крові, а також зниження кількості еритроїдних клітин в кістковому мозку. Збільшення молодих форм еритроїдних клітин в кістковому мозку при введенні Есміну, очевидно, пов'язане не лише з його гемопротекторними, але і з гемостимулюючими властивостями. Есмін вигідно відрізняється за своєю дією від препарату порівняння, при введенні якого не спостерігається стимуляції еритропоезу в кістковому мозку та попередження зниження в периферичній крові кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну. Встановлено, що гемолітична анемія супроводжується закономірним

Таблиця 2

Динаміка показників клітинного складу кісткового мозку щурів при фенілгідразинній анемії, (M ± m, n = 6)

Показники мієлограми	Інгактні тварини	Контроль					Фенілгідразин + Есмін					Фенілгідразин + Краплі Береша				
		Доба після першого введення фенілгідразину														
		5	10	15	5	10	15	5	10	15	5	10	15			
Мієлоїдні клітини	29,1±1,4	29,2±1,5	30,2±1,5	31,2±1,5	33,3±1,5	30,3±1,4	31,3±1,6	33,2±1,6	31,3±1,5	33,3±1,5	30,3±1,4	31,3±1,6	33,2±1,6	31,2±1,3		
Нейтрофіли	30,1±2,0	27,1±1,5	28,0±1,6	30,1±1,1	29,2±1,1	30,1±1,1	28,2±1,3	28,1±1,4	29,2±1,1	29,2±1,1	30,1±1,1	28,2±1,3	28,1±1,4	29,2±1,2		
Еозинофіли	1,5±0,05	2,0±0,1	2,2±0,1	2,1±0,1	2,1±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	2,1±0,1	2,1±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	2,0±0,1	2,1±0,1		
Лімфоцити	13,0±0,9	16,0±0,8	7,0±0,5*	14,0±0,7	8,0±0,6*	15,2±0,5a	8,0±0,6*	7,2±0,4a	14,0±0,7	8,0±0,6*	15,2±0,5a	10,1±0,4*	7,2±0,4a	8,5±0,2*		
Еритроblastи базофільні	6,1±0,2	2,1±0,1*	6,0±0,6	3,0±0,1*	6,1±0,2	6,0±0,2	2,1±0,5*	5,1±0,3a	3,0±0,1*	6,1±0,2	6,0±0,2	2,1±0,5*	5,1±0,3a	7,0±0,1*		
Еритроblastи поліхроматофільні	5,0±0,3	3,0±0,1*	5,1±0,2	4,1±0,1*	5,0±0,2*	4,3±0,1	4,1±0,1*	4,5±0,1a	4,1±0,1*	5,0±0,2*	4,3±0,1	5,0±0,2*	4,5±0,1a	6,2±0,2*		
Еритроblastи оксифільні	4,2±0,5	4,0±0,2	5,0±0,2	4,0±0,15	4,2±0,2	4,2±0,2	4,0±0,15	4,2±0,2	5,0±0,2	4,2±0,2	4,2±0,2	4,2±0,2	4,2±0,2	4,2±0,2		
Нормобласти поліхроматофільні	5,0±0,5	4,1±0,2	6,2±0,4	4,1±0,2	6,1±0,2	6,0±0,1	4,1±0,2	5,1±0,1	4,1±0,2	6,1±0,2	6,0±0,1	6,0±0,3	5,1±0,1	5,0±0,1		
Нормобласти оксифільні	6,0±0,3	5,0±0,5	6,1±0,3	5,0±0,4	6,0±0,2	6,1±0,3	6,1±0,4	6,3±0,2	5,0±0,4	6,0±0,2	6,1±0,3	6,1±0,2	5,3±0,4	6,3±0,2		
Індекс дозрівання еритроцитарного ряду	0,77±0,01	0,88±0,01*	0,79±0,02	0,76±0,01*	0,80±0,01	0,80±0,02	0,81±0,02*	0,72±0,01*	0,88±0,01*	0,80±0,01	0,80±0,02	0,80±0,02*	0,72±0,01*	0,72±0,01*		
Кістково-мозковий індекс дозрівання нейтрофілів	0,97	1,07	1,07	1,93	0,96	0,96	1,07	1,93	0,96	0,96	0,96	1,0	1,1	1,0		
Лейко-еритроїдне співвідношення	2,25:1	3,5:1,0*	3,0:1,0	2,3:1,0	2,3:1	2,3:1	2,5:1,0	2,3:1,0	2,3:1,0	2,3:1	2,3:1	2,2:1,0	2,2:1,0	2,1:1,0		

Примітка: * – $p < 0,05$ відносно групи інгактних тварин; a – відносно контролю (фенілгідразинна анемія); b – відносно препарату порівняння.

розвитком специфічної реакції системи кровотворення, характерної для стадії мобілізації і резистентності. Слід зазначити, що під час лікування Есміном практично не спостерігалось його побічної дії. Препарат не викликав ніяких ускладнень при застосуванні у рекомендованих дозах.

Висновки

На підставі даних експериментальних досліджень можна зробити висновок, що новий залізовмісний препарат Есмін має високу протианемічну активність. Його застосування призводить до нормалізації показників периферичної крові, позитивно впливає на процеси кістково-мозкового кровотворення, сприяє відновленню співвідношення формених елементів крові навіть у гострому експерименті. Співвідношення фармакологічно активних компонентів у препараті Есмін забезпечує високу біодоступність як Феруму, так і інших мікроелементів, що дозволяє застосовувати препарат в досить низьких дозах.

Список літератури

1. *Выяснение роли слюнных желёз в функциональном состоянии системы красной крови* / М. А. Медвед, Ю. А. Коноваленко, Н. М. Кротенко // Физиология организмов в нормальных и экстремальных состояниях: сборник статей. – Томск: ТГУ, 2001. – С. 100–103.
2. *Иванкова Ж. Е. Влияние 20-гидроксиэкидизона на регенерацию красной крови крыс линии Вистар на фоне фенилгидразиновой анемии* / Ж. Е. Иванкова, Н. А. Мойсеенко / Вестник СГУ. – Сыктывкар, 2003. – Серия 4 «Биология». – С. 61–65.
3. *Иванкова Ж. Е. Влияние экидистероидов серпухи венценосной (Serratula coronata L.) на некоторые реологические параметры крови крыс линии Вистар при гемолитической анемии* / Ж. Е. Иванкова, М. Б. Пономарёв / Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике: Тезисы докладов IV Молодежной научной конференции Института физиологии Коми НЦ УрО РАН. – Сыктывкар, 2005. – С. 102–104.
4. *Калиман П. А. Метаболизм гема и оксидативный стресс* / П. А. Калиман, Т. В. Баранник / Укр. биохим. журн. – 2001. – Т. 73, № 1. – С. 5–15.
5. *Стальная М. Д. Современные методы в биохимии* / М. Д. Стальная / – М.: Медицина, –1977. – С. 63–64.
6. *Улитко М. В. Особенности реакции моноцитарного ростка кроветворения на кровопотерю* / М. В. Улитко / Эколого-физиологические проблемы адаптации/ Материалы XI международного симпозиума. – М., – 2003. – С. 557–558.
7. *Улитко М. В. Роль моноцитов костного мозга в адаптивных реакциях кроветворной ткани при стимуляции эритропоэза* / М. В. Улитко, Б. Г. Юшков / Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. – 2004. – Т. 90, № 8. – Ч. 2. – С. 242–243.
8. *Hortobagyi G. N. Current status of adjuvant systemic therapy for primary breast cancer. Progres sand controversy* / G. N. Hortobagyi, A. Burdar / Cancer J Clin. – 1995. – P. 199–226.
9. *Membrane differentiation in human erythroid cells. Unique profiles of cell surface glycoproteins – expressed in erythroblasts in vitro from three autogenic stages* / M. Fukuda, M. N. Fukuda, T. Papeyannopoulou et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci. – 1980. – V. 77, № 6. – P. 3474–3478.
10. *Membranes and Transport* / Ed. A. N. Martenesi / N. Y., London: Plenum Press, 1982. – V. 1. – P. 688–696.
11. *Molenaar W. H. Growth factors immediately raise cytoplasmic free Ca²⁺ in human fibroblasts* / W. H. Molenaar, L. C. I. Tertoolen, S. W. Leat de. / J. Biol. Chem. – 1984. – V. 259. – P. 8066–8069.
12. *Ohkawa H. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction* / H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi // Anal. Biochem. – 1979. – V. 95. – P. 351–358.

А. С. Григорьева¹, Н. Ф. Канахович¹, С. О. Шаповалов², М. М. Долгая², Н. Е. Узленкова³

¹Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины

²Институт животноводства НААН Украины

³Институт медицинской радиологии АМН Украины

Институт животноводства НААНУ, ул. 7-й Гв. Армии, 3, пгт. Кулинич, Харьковская обл., 62404, Украина

ГЕМОПРОТЕКТОРНАЯ И ГЕМОСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТИ ЭСМИНА ПРИ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АНЕМИИ У КРЫС

Резюме

Новая железосодержащая полиядерная композиция микроэлементов имеет высокую противоанемическую активность. Ее применение приводит к нормализации показателей периферической крови, положительно влияет на процессы костномозгового кроветворения. Подобранный соотношения активных компонентов обеспечивает высокую биодоступность железа, что позволяет применять препарат в достаточно низких дозах.

Ключевые слова: анемия, микроэлементы, кровь, эритроциты, красный костный мозг, крысы.

A. S. Grigor'eva¹, N. F. Kanakhovich¹, S. O. Shapovalov², M. M. Dolgaya², N. E. Uzlenkova³

¹ Institute of pharmacology and toxicologies of AMN of Ukraine

² Institute animal sciens of NAAN of Ukraine

³ Institute of medical radiology of AMN of Ukraine

Institute animal sciens of NAANU, 3, str. of 7-i of Gv. Armies, smt. Kulinichi, Kharkiv rg., 62404, Ukraine

GEMAPROTEKTOR AND GEMOSTIMUL OF ACTIVITY OF ESMIN AT GEMOLITIC ANAEMIA FOR RATS

Summary

New deficit of iron composition of oligoelements has high antianaemic activity. Its application results in normalization of indexes of peripheral blood, positively influences on the processes of blood production in marrow. Detailed correlation of active components provides high bioavailability of iron, that allows to apply preparation in low enough doses.

Key words: anaemia, oligoelementss, blood, red corpuscles, red marrow, rats.