УДК 615
DOI:10.54503/0514-7484-2023-63.3-55

Сравнительный анализ токсичности $Cu[HC(COO)(pz^{Me2})_2]_2$, $Cu(II)_2(3,5\text{-}DIPS)_4(H_2O)_3$ и $Cu(L^{CH3})_2$ Cu-содержащих комплексов

А.Г. Карапетян [1], К. Сантини [2], М. Пеллеи [2], В.С. Григорян [1,3], А.М. Даллакян [1], Ж.Г. Петросян [1]

[1] Институт физиологии им. Л.А. Орбели НАН РА,
0028, Ереван, ул. Бр. Орбели, 22,
[2] School of Science and Technology, University of Camerino
62032, Camerino (MC), Italy,
[3] Университет традиционной медицины Армении
0038, Ереван, ул. Бабаджаняна, 38

Ключевые слова: медьорганические комплексы, время свертываемости крови, количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, уровень гемоглобина, гематокрита

Одной из приоритетных задач современной медицины является поиск новых эффективных средств, способствующих лечению травм различной природы. Требование, предъявляемое к подобным соединениям, наряду со стабильностью, легкостью в применении, пролонгированным действием, – низкотоксичность [1].

Как известно, токсикология – наука, которая занимается изучением механизма токсического действия химических соединений, диагностикой, профилактикой и лечением отравлений. На сегодняшний день в токсикологии выделяют несколько самостоятельных, но взаимосвязанных направлений: экспериментально-теоретическое, профилактическое (гигиеническое) и клиническое.

Токсичность – это способность химических веществ действовать на биологические объекты, вызывая их нарушение. Чем меньшее количество вещества способно вызвать повреждение организма, тем оно токсичнее. Веществ, не имеющих токсичности, практически нет. В определенных условиях обнаруживается биологический объект, который реагирует на действие вещества при определенных дозах или концентрациях различными нарушениями вплоть до гибели.

В условиях повседневного контакта с химическими веществами и при чрезвычайных ситуациях цель токсикологии заключается в непрерывном совершенствовании мероприятий и методов, которые обеспечивают сохранение жизни и здоровья человека. Для достижения цели

необходимо изучать механизмы токсического действия, диагностику, профилактику и лечение отравлений.

Наряду с новосинтезированными веществами, содержащими различные металлы, интерес представляют металлорганические комплексы, основанные на меди и обладающие высокой антиоксидантной активностью.

Цель работы – определение и сравнение токсичности металлокомплексов $Cu[HC(COO)(pz^{Me2})_2]_2$ (комплекс 1), $Cu(II)_2(3,5\text{-}DIPS)_4(H_2O)_3$ (комплекс 2) и $Cu(L^{CH3})_2$ (комплекс 3) путем выявления выживаемости, средней продолжительности жизни и некоторых показателей крови. Структура комплексов 1,2,3, синтезированных нашими коллегами из Италии [7,8], приведена на рис.1. Согласно полученным данным, все 3 комплекса оказались низкотоксичными соединениями, а по результатам тестирований в случае комплекса 1 при дозе 1450мг/кг мы получили выживаемость в 87,5%, среднюю продолжительность жизни – 26,8 суток, в случае комплекса 2 при той же дозе выживаемость равнялась 75%, а средняя продолжительность 22,9 суток, при применении комплекса 3 получена выживаемость 90%, что свидетельствует о низкой токсичности этих веществ (большей токсичностью из этих трех соединений обладает комплекс 2, так как идентичный результат достигается меньшей дозой). С использованием метода интегрирования по Беренсу в опытах на крысах выявлена среднелетальная доза ЛД $_{50/7}$, которая составляет более 2000мг/кг.

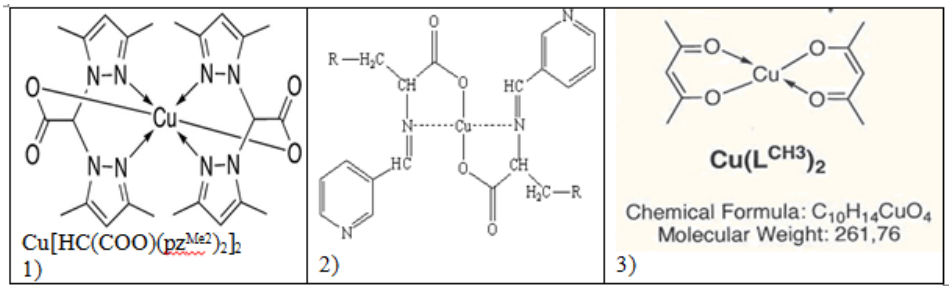

Рис.1. Комплексы 1,2,3

Известно, что кроветворная система, как активно пролиферирующая ткань, чрезвычайно чувствительна к действию различных факторов, в том числе токсичных составляющих [3,4]. Поэтому проблема влияния патогенных факторов на систему крови также может рассматриваться как характеризующая токсичность. Показатели крови могут быть использованы как показатели для выявления токсического эффекта. Весьма существенной является регистрация сроков развития интоксикации и гибели животных.

Что касается показателей крови, то у комплекса 1 на 3-и сутки эксперимента наблюдалось повышение уровня всех исследуемых показателей крови. Далее следовало понижение и на 7-е сутки произошла

нормализация всех показателей крови, кроме количества тромбоцитов. Тем не менее тенденция к нормализации отмечалась и у этого показателя, что привело к нормальному значению уровней тромбоцитов к 21-м суткам.

При подкожном введении комплекса 2 наблюдалось достоверное понижение уровня гемоглобина, который был восстановлен к 7-м суткам. Отмечалось также достоверное снижение ВСК, сохраняющееся до конца исследований. К 7-м суткам обнаружено достоверное уменьшение уровней тромбоцитов и эритроцитов.

Результаты гематологических исследований также подтвердили наименьшую токсичность соединения комплекса 3.

Материал и методы

Серию экспериментов *in vivo* проводили на половозрелых крысах. Так как в зависимости от возраста может измениться фармакокинетика и, в связи с этим, — токсичность вещества, мы использовали животных одного возраста. Разброс по исходной массе не превышал ± 10 %. Учитывается также, что чувствительность животных к веществу может изменяться под влиянием ряда внешних факторов (температура, влажность, освещенность и др.).

Наряду с подопытными животными, получающими исследуемые вещества, в аналогичных условиях содержались контрольные животные.

Определение токсичности соединений проводилось с целью количественной оценки зависимости «доза-эффект». Животные были разделены на 4 группы (на каждую группу отводилось по 10 животных): I – с инъекцией комплекса 1, II – с инъекцией комплекса 2, III – с инъекцией комплекса 3 и IV группа – контрольная (интактные животные).

Для определения токсичности Cu-содержащих комплексов 1, 2 и 3 поставлены эксперименты на белых, беспородных, половозрелых крысах средней массой 185г. Крысам подкожно инъецировался водный раствор данных соединений объемом 2мл.

Токсичность металлокомплексов обычно характеризуется на основе вычисления показателя $ЛД_{50/7}$, т.е. той дозы соединения, при которой наблюдается гибель 50% животных в течение 7 дней после подкожного введения вещества в организм. Для этого металлокомплексы вводятся животным в постепенно возрастающих дозах — от максимально неэффективной до $ЛД_{100/7}$, т.е. до той минимальной дозы, абсолютно смертельной для 100% животных в течение 7 дней. С использованием метода интегрирования по Г.Беренсу [2] в опытах на крысах вычисляется среднелетальная доза — $ЛД_{50/7}$.

В определенные сроки (3,7,14,21,30-е сутки) производился забор крови из хвостовой вены для гематологического анализа.

Гематологические параметры экспериментальных животных, а именно: количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, содержание гемоглобина и гематокрита, а также время свертываемости крови определяли с использованием стандартного лабораторного оборудования [5].

Анализ данных проводился с помощью ряда специализированных статистических пакетов: StatSoft7, SPSS-10.0 и StatGraphicsPlus. Использовали регрессионный и корреляционный методы анализа.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ выживаемости и средней продолжительности жизни показал, что наименьшей токсичностью из 3 исследуемых соединений обладает комплекс 3 Следует отметить, что при подкожном введении крысам комплекса 1 в диапазоне доз от 480 мг/кг до 965 мг/кг не наблюдалось нарушений поведенческих реакций и гибели животных. В случае введения более высокой дозы (1450мг/кг) сразу же после инъекции у некоторых животных наблюдались вялость, заторможенность движений, сниженный аппетит, которые прошли через 2-3 дня. Наблюдалась гибель только 1 животного (12,5%) на 4-е сутки мониторинга, а у остальных животных эти явления прошли и до конца эксперимента поведенческие реакции не отличались от интактных животных. Исходя из того, что предыдущие эксперименты на токсичность с низкотоксичными медьсодержащими химическими соединениями дозой 1450мг/кг показали результат $ЛД_{50/7}$, а та же доза комплекса 1 вызвала только 12,5% гибель животных ($ЛД_{12,5/7}$), можно заключить, что исследуемое вещество довольно низкотоксично, так как требуется доза примерно в 4 раза превышающая нами примененную для получения $ЛД_{50/7}$. Таким образом, при дозе 1450мг/кг мы получили выживаемость в 87,5%, а среднюю продолжительность жизни – 26,8 суток.

Согласно результатам тестирований, металлокомплекс $Cu(II)_2(3,5\text{-}DIPS)_4(H_2O)_3$ также оказался малотоксичным соединением. Следует отметить, что при подкожном введении в диапазоне доз от 100 мг/кг до 800 мг/кг не наблюдались нарушения поведенческих реакций и гибель животных в течение 24 часов. При дозе 800 мг/кг у животных были отмечены преходящие внешние признаки депрессивного действия комплекса 2 на локомоторную активность (гиподинамия), которые через 24 часа уже не обнаруживались.

При введении комплекса 2 в дозе 1450 мг/кг выживаемость составила 75%, а средняя продолжительность жизни – 22,9. Это свидетельствует о том, что оба вещества обладают очень низкой токсичностью, тем не менее по сравнению с показателями комплекса 1 токсичность комплекса 2 была выше и характеризовалась более низкими величинами тех доз, при которых в течение 7 дней после однократного подкожного вве-

дения в организм погибнет 12,5% животных (что характерно для комплекса 1).

Что касается комплекса 3 – он самый низкотоксичный среди испытанных нами веществ (доза, применяемая при инъекции комплексов 1 и 2, в случае с комплексом 3 была превышена в 1,5 раза, но вызвала только 10% гибель животных ($ЛД_{10/7}$), средняя продолжительность жизни 28,1).

На рис. 2 приведена динамика выживаемости животных из 3 групп, которым вводились все 3 комплекса с соответствующими регрессионными кривыми и уравнениями.

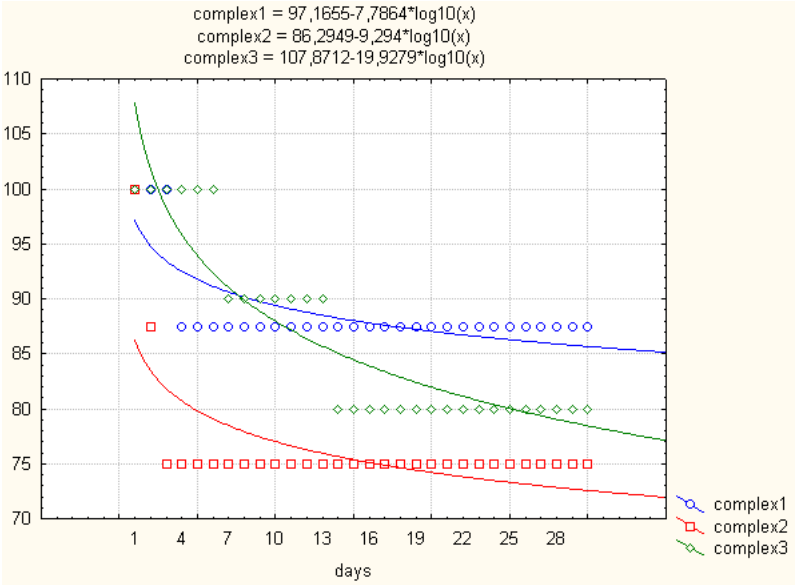

Рис. 2. Динамика выживаемости животных из групп с введенными комплексами l, 2 и 3

Были получены уравнения логарифмической регрессии: y_1=97,16-7,78lg(x), y_2=86,29-9,29lg(x) и y_3=107,87-19,92lg(x) (где y_1 – выживаемость группы с введенным комплексом1, y_2 – с введенным комплексом 2, y_3 – с введенным комплексом 3, а x – количество дней эксперимента), позволяющие не только описывать динамику выживаемости, но и с помощью экстраполяции прогнозировать изменение процента выживаемости в отдаленных сроках эксперимента.

Был проведен анализ показателей крови на 3-е и 7-е сутки после подкожного введения комплексов 1,2,3 в дозе 1450мг/кг. Результаты гематологического анализа приведены в таблице. На 3-и сутки исследований наблюдалось повышение уровней всех исследуемых показателей крови. Далее следовало понижение и, как видно из таблицы, на 7-е сутки произошла нормализация всех показателей крови кроме количества тром-

боцитов. Тем не менее тенденция к нормализации отмечается и у этого показателя.

Иная картина была отмечена в группе с инъекцией комплекса 2. Согласно приведенным в таблице данным, при подкожном введении комплекса 2 наблюдалось достоверное понижение уровня гемоглобина, который был восстановлен к 7-м суткам, достоверное снижение ВСК, сохраняющееся до конца исследований. К 7-м суткам отмечено также достоверное уменьшение уровней тромбоцитов и эритроцитов.

В группе с инъекцией комплекса 3 достоверное повышение показателей ВСК, количества лейкоцитов, гемоглобина и гематокрита к 7-м суткам сменилось значениями, близкими к нормальным.

Таблица

Результаты гематологического анализа

Показатели		ВСК (sec)	Лейкоциты (N/μL)	Тромбоциты (N/μL)	Эритроциты (N/μL)	Гемоглобин (g/L)	Гематокрит (%)
norm		311,0 ±19,00	11500,0 ±420,0	522000,0 ± 10560,0	5823000,0 ±278800,0	138,1 ±5,82	37,2 ±1,75
3-и сутки	(комплекс1)	320,0 ±16,22	14885,71 ±1248,13 (*)	654285,71 ±30945,97 (*)	6175714,29 ±361497,26	144,44 ±3,79	46,28 ±2,9 (*)
	(комплекс2)	200,8 ±9,95 (*)	10233,3 ±1178,04	577500,0 ±33609,27	4941666,7 ±444562,83	102,3 ±7,46 (*)	35,6 ±3,25
	(комплекс3)	380,8 ±24,94 (*)	17000,00 ±1568,44 (*)	307777,78 ±20751,69 (*)	5101000,0 ±255318,76	162,3 ±2,17 (*)	46,24 ±2,2 (*)
7-е сутки	(комплекс1)	283,0 ±12,44	13171,43 ±1790,15	634285,71 ±33263,53 (*)	5235714,29 ±270861,56	141,09 ±8,06	41,60 ±3,02
	(комплекс2)	249,0 ±12,36 (*)	10600,0 ±713,68	425833,3 ±20913,18 (*)	4575000,0 ±405421,37 (*)	139,5 ±3,84	45,4 ±4,18
	(комплекс3)	236,33 ±34,87	12266,67 ±777,46	409500,0 ±19442	5752222,22 ±275301,74	141,78 ±2,89	49,0 ±2,11 (*)

(*) при $p<0,05$ (при сравнении с контрольными значениями, т.е с группой интактных животных)

Таким образом, металлокомплексы 1, 2 и 3 оказались низкотоксичными соединениями. Только в случае введения сверхвысоких доз (более 2000 мг/кг), сразу же после инъекции наблюдались вялость и заторможенность движений животных с наступлением гибели через несколько часов.

Наименьшей токсичностью обладает комплекс 3, так как при дозе 1450мг/кг выживаемость к 7-м суткам составила 90% (в отличие от комплекса 1 – 87,5% и комплекса 2 – 75%), средняя продолжительность жизни 28,1 суток (комплекс 1 – 26,8; комплекс 2 – 22,9).

Несмотря на разнонаправленность изменений показателей крови, которую можно расценить как проявление развития интоксикации и воспалительных процессов [6], наблюдалась тенденция к нормализации у трех групп с введением комплексов. Различие наблюдается в скорости восстановления. Восстановление показателей крови при применении комплекса 3 происходит втрое быстрее, чем в группе с применением комплексов 1 и 2.

Результаты гематологических исследований также подтвердили наименьшую токсичность комплекса 3.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета по науке МОНКС РА в рамках научного проекта № 21T-1F126

Поступила 09.03.23

Cu[HC(COO) (pz^{Me2})$_2$]$_2$, Cu(II)$_2$ (3,5-DIPS)$_4$(H_2O)$_3$ և Cu (L^{CH3})$_2$ Cu- պարունակող կոմպլեքսների թունաբանական հատկությունների համեմատական վերլուծություն

Ա.Գ. Կարապետյան, Կ. Սանտինի, Մ. Պելլեի, Վ.Ս. Գրիգորյան, Ա.Մ. Դալլաքյան, Ժ.Հ. Պետրոսյան

Նոր սինթեզված նյութերը՝ պղնձի վրա հիմնված և բարձր հակաօքսիդանտ ակտիվություն ունեցող օրգանամետաղական համալիրները, ունեն նաև վնասվածքների բուժման համար անհրաժեշտ մի շարք այլ հատկություններ՝ կայունություն, դյուրին կիրառման հնարավորություն, երկարատև ազդեցություն և ցածր թունավորություն:

Այս աշխատանքի նպատակն է որոշել և համեմատել Cu[HC(COO) (pz^{Me2})$_2$]$_2$ (կոմպլեքս 1), Cu(II)$_2$ (3,5-DIPS)$_4$(H_2O)$_3$ (կոմպլեքս 2) и Cu (L^{CH3})$_2$ (կոմպլեքս 3) կոմպլեքսների տոքսիկ հատկությունները՝ ուսումնասիրելով ապրելունակությունը, կյանքի տևողությունը և արյան որոշ ցուցանիշներ՝ էրիթրոցիտների, լեյկոցիտների, թրոմբոցիտների, հեմոգլոբինի մակարդակները և արյան մակարդման ժամանակը: Օգտագործելով ռեգրեսիոն կորեր՝ նկարագրվել է ապրելունակության դինամիկան:

Ստացված տվյալներով 1, 2, 3 կոմպլեքսները ցածր թունավոր միացություններ են: Համաձայն թեստի արդյունքների՝ 1-ին կոմպլեքսի դեպքում 1450 մգ/կգ դոզայով մենք ստացել ենք ապրելունակության ցուցանիշը 87,5%, իսկ կյանքի միջին տևողությունը՝ 26,8 օր, 2-ի դեպքում ապրելունակության մակարդակը 75% է, միջին տևողությունը՝ 22,9 օր, իսկ 3-րդ կոմպլեքսը կիրառելիս ստացվել է ապրելունակության մակարդակը 90%, կյանքի միջին տևողությունը՝ 28,1 օր, ինչը վկայում է այս նյութերի ցածր թունավորության

մասին (կոմպլեքս 2-ն ունի այս երեք միացություններից ամենաբարձր թունավորությունը, քանի որ նույն արդյունքը ձեռք է բերվում ավելի ցածր չափաբաժնով): Կիրառելով ինտեգրման մեթոդը ըստ Բերենսի՝ առնետների վրա կատարված փորձերում հայտնաբերվել է $LD_{50/7}$ միջին մահացու չափաբաժինը, որը կազմում է ավելի քան 2000 մգ/կգ, իսկ 3-րդ կոմպլեքսի դեպքում՝ ավելի քան 3000 մգ/կգ:

Չնայած արյան ցուցանիշների բազմակողմանի փոփոխություններին, որոնք կարելի է համարել թունավորման զարգացման դրսևորում, 3 կոմպլեքսների ներարկման դեպքում երեք խմբերում նորմալացման միտում կար: Տարբերությունը վերականգնման արագության մեջ է: Արյան ցուցանիշների վերականգնումը կոմպլեքս 3-ի կիրառման դեպքում տեղի է ունենում երեք անգամ ավելի արագ, քան 1-ին և 2-րդ կոմպլեքսների կիրառման դեպքում:

Արյունաբանական ուսումնասիրությունների արդյունքները նույնպես հաստատեցին կոմպլեքս 3 միացության նվազագույն թունավորությունը:

Հետազոտության արդյունքները ցույց են տալիս, որ անհրաժեշտ է շարունակել նոր, արդյունավետ, ոչ թունավոր միացությունների որոնումը բժշկական ոլորտներում հնարավոր օգտագործման համար:

Comparative Analysis of the Toxicity of $Cu[HC(COO)(pz^{Me2})_2]_2$, $Cu(II)_2(3,5\text{-}DIPS)_4(H_2O)_3$, and $Cu(L^{CH3})_2$ of Cu-containing Complexes

A. G. Karapetyan, C. Santini, M. Pellei, V. S. Grigoryan, A. M. Dallakyan, Zh. H. Petrosyan

Newly synthesized substances - organometallic complexes based on copper and having a high antioxidant activity, also have a number of other properties necessary for the treatment of injuries: stability, easy application, long-term effect and low toxicity

The aim of this work is to determine and compare the toxicity of $Cu[HC(COO)(pz^{Me2})_2]_2$ (complex 1), $Cu(II)_2(3,5\text{-}DIPS)_4(H_2O)_3$ (complex 2), and $Cu(L^{CH3})_2$ (complex 3) by detecting survival, life expectancy and some blood parameters.

The following blood parameters were studied: levels of erythrocytes, leukocytes, platelets, hemoglobin and blood clotting time. Using regression curves, the dynamics of survival is described

According to the obtained data, complexes 1, 2, and 3 turned out to be low-toxic compounds. According to the test results, in the case of the complex 1 at a dose of 1450 mg/kg, we received a survival rate of 87,5%, and the average life expectancy - 26,8 days. In the case of complex 2, the survival rate was 75% and the average life expectancy - 22,9 days. And when using the complex 3, the survival rate was 90%, an average life expectancy was 28,1 days, which indicates a low toxicity of these substances (complex 2 has the highest toxicity of these three compounds, since an identical result is achieved with a lower dose). The Behrens integration method on rats found an average lethal dose of $LD_{50/7}$, which is more than 2000 mg/kg, and in the case of complex 3 - more than 3000 mg/kg.

Despite the multidirectional changes in blood parameters, which can be regarded as a manifestation of the development of intoxication, there was a tendency to

normalization in three groups with the introduction of complexes. The difference is in the speed of recovery. Restoration of blood parameters with the use of complex 3 occurs three times faster than in the group with the use of complexes 1 and 2.

The results of hematological studies also confirmed the lowest toxicity of the complex 3 compound.

The research results indicate the need to continue the search for new effective, non-toxic compounds for possible use in medical fields.

Литература

1. *Арзамасцев Е.В., Гуськова Е.В., Березовская И.В., Любимов Б.И., Либерман С.С., Верстакова О.Л.* Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2005, с.41-54.
2. *Беренс Г., Клей П.Д.* Микрохимический анализ, ч.1, Научное хим.-техн. Изд. НТУ ВСНХ, 1928.
3. *Карапетян А.Г., Даллакян А.М., Петросян Ж.Г., Арутюнян Н.К., Порчия М., Сантини К.* Оценка показателей периферической крови и цитогенетических показателей при использовании соединений медь-органических комплексов после ожога. Мед.наука Армении НАН РА, 2020, т. LX, 1, с. 46-54, ISSN: 0514-7484.
4. *Карапетян А.Г., Сантини К., Пеллеи М., Григорян В.С., Даллакян А.М., Петросян Ж.Г.* Сравнительный анализ токсичности BIS[BIS(3,5-DIMETHYLPYRAZOL-1-YL)ACETATO]COPPER(II) Cu[HC(COO) (pz^{Me2})2]2, $Cu(II)_2$ (3,5-DIPS)4($H_2O)_3$ Cu-содержащих комплексов. Мед.наука Армении НАН РА, 2022, т. LXII, 4, с. 71-77, ISSN: 0514-7484.
5. *Кишкун А.А.* Руководство по лабораторным методам диагностики, М., 2007.
6. *Сологуб Т. В., Романцова М. Г., Кремень Н. В. и др.* Свободнорадикальные процессы и воспаление (патогенетические, клинические и терапевтические аспекты). М., 2008, — 162 с., ISBN 978-5-98654-030-6; ISBN 978-5-91327-021-4.
7. *Kozlevćar B., Gamez P., de Gelder R., Driessen W. L., Reedijk J.* Unprecedented Change of the Jahn-Teller Axis in a Centrosymmetric CuII Complex Induced by Lattice Water Molecules - Crystal and Molecular Structures of Bis[bis(3,5-dimethylpyrazol-1-yl)acetato]copper(II) and Its Dihydrate. Eur. J. Inorg. Chem., 2003, No. 1, pp. 47-50.
8. *Pellei M., Gandin V., Marchiò L., Marzano C., Bagnarelli L., Santini C*. Syntheses and Biological Studies of Cu(II) Complexes Bearing Bis(pyrazol-1-yl)- and Bis(triazol-1-yl)-acetato Heteroscorpionate Ligands. Molecules 2019, v. 24, No. 9, p. 1761.