

ПЕРСПЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ КОМПОЗИЦІЇ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНИХ АНЕМІЙ

Г.С. Григор'єва, д.хім.н., [Т.С. Клеменцевак, біол.н.], М.А. Мохорт, д.мед.н., проф,
Н.Ф. Конахович, к.хім.н., Н.М. Серединська, д.мед.н., Л.М. Киричок, к.біол.н.,
С.О. Мисливець, к.біол.н, Т.П. Притула, к.біол.н.

Інститут фармакології та токсикології НАМН України, м. Київ

РЕЗЮМЕ. Проведено дослідження нової композиції мікроелементів для запобігання пригніченню гемопоезу у тварин. До складу композиції увійшли життєво важливі мікроелементи, в першу чергу для кровотворення. Завдяки взаємному впливові компонентів композиція сприяє нормалізації процесів еритропоезу і гемоглобіноутворенню, прискоренню дозрівання ретикулоцитів, запобігає розвитку тромбоцитопенії й лейкопенії. Таким чином, композиція сприяла відновленню морфологічного складу периферичної крові та кісткового мозку при залізодефіцитній (десфераловій) анемії.

Ключові слова: інтоксикація, десферал, тварини, композиція мікроелементів, анемія, кров, кістковий мозок.

РЕЗЮМЕ. Проведены исследования новой композиции микроэлементов для предупреждения угнетения гемопоэза у животных. В состав композиции вошли жизненно важные микроэлементы, в первую очередь для кроветворения. Благодаря взаимному влиянию компонентов, композиция способствует нормализации процессов эритропоэза и гемоглобинообразования, ускорению созревания ретикулоцитов, предупреждению развития тромбоцитопении и лейкопении. Таким образом, композиция способствовала восстановлению морфологического состава периферической крови и костного мозга при железодефицитной (десфераловой) анемии.

Ключевые слова: интоксикация, десферал, животные, композиция микроэлементов, анемия, кровь, костный мозг.

SUMMARY. Researches of new microelemets composition for the prevention of oppression of a haemopoiesis at animals are carried out. The structure of the composition included the vital microelements, first of all for bloodformation. Due to mutual influence of components, the composition promotes normalization of processes of an erythrogenesis and gemoglobinofomation, to acceleration of maturing reticulocytes, the prevention of development of a trombocytopenia and a leukopenia. Thus, the composition promoted restoration of morphological structure of peripheric blood and an osteal brain at ferum-deficiency (desferalal) anemia.

Key words: intoxication, desferalal, animals, composition mikroelements, anemia, blood, bone marrow.

Незважаючи на великий арсенал протианемічних засобів, пошук безпечних та ефективних лікарських засобів цієї групи залишається досі актуальним. Накопичений клініко-експериментальний досвід свідчить, що дефіцит заліза — один із найбільш поширених патологічних станів [1], який супроводжується зниженням активності імунної системи та іншими відомими патологіями. Разом з тим його надлишок (у вигляді феритину) обумовлює прооксидантні реакції в організмі, які призводять до широкого спектру патологій, включаючи атеросклероз, інфаркт міокарда, діабет, нейродегенеративні захворювання, карциногенез та ін.[2, 3]. Отже, прийом залізовмісних препаратів, їх всмоктування, засвоєння та екскреція заліза мають знаходитись у діалектичній рівновазі. Для запобігання та лікування залізодефіцитної анемії в медичній практиці використовуються моно- та комбіновані з вітамінами препарати заліза. Їх клінічне застосування (особливо парентеральне у великих дозах) може негативно впливати на перебіг багатьох хронічних захворювань, які супроводжуються анеміями через активацію "окислювального стресу". Тому роботи щодо створення нових і підвищення ефективності та безпеки прийому відомих протианемічних засобів залишаються і досі актуальними [4].

Новий підхід для корекції патологічних змін, які відбуваються в організмі під впливом різноманітних ендогенних чинників, дає біонеорганічна хімія [5-7]. В якості неорганічних інгредієнтів значний інтерес викликають мікроелементи Fe, Zn, Mn, Mo, Cu, Co, Cr, V, Se, оскільки вони входять до активних центрів металоферментів або є кофакторами багатьох ферментативних процесів та ін.[6-8,10].

Виходячи із доведеної специфічності мікроелементів для корекції таких патологій як анемія (Fe, Mn, Zn, Cu, Co, Cr, V) [4,6], порушення імунних функцій (Fe, Zn, Mn, Cu, Se), серцево-судинних захворювань (Zn, V, Se), порушення репродуктивних функцій (Zn, Mn) та вуглеводного обміну (Zn, Cr) [6], перспективним вбачалось створення на їх основі нової мікроелементної композиції. Враховуючи той факт, що біонеорганічна хімія за своєю сутністю є біокоординаційною хімією (іони металів знаходяться в організмі у вигляді комплексних координаційних сполук) [5,9], логічним було створення мікроелементної композиції вибраних металів на основі їх координаційних сполук. На підтвердження цієї тези в ДУ "ІФТ АМН України" створено мікроелементну композицію на основі координаційних сполук Fe, Zn, Mn, Mo, Cu, Co, Cr з

N-2,3-диметилфенілантраніловою (мефенаміною) кислотою та кисеньвмісних натрієвих солей V, Mo та Se [5]. Вибір параметрів для створення композиції мікроелементів був спрямований на їх масове співвідношення при врахуванні добової потреби та балансу мікроелементів для різних вікових груп. У той же час був зроблений акцент на значне (5-20 раз) зниження вмісту заліза в порівнянні з відомими вітамінно-мікроелементними препаратами, до складу яких метали-мікроелементи входять у вигляді іонних сполук [5].

Метою даних досліджень було експериментальне підтвердження ефективності лише однієї ланки широкого спектру фармакологічних властивостей композиції — її здатності, як гемопротектора, запобігати розвитку анемії при інтоксикації десфералом.

Предметом дослідження була композиція мікроелементів зі складом (на 1 г композиції): залізо-12,0 мг, цинк-16,0 мг, марганець-3.2 мг, мідь-2,8 мг, кобальт-0,28 мг, хром-0,28 мг, селен-0,2мг, молібден-0,28 мг, ванадій- 0,04 мг, кислота мефенамінова- 340 мг та допоміжні речовини: крохмаль картопляний, лактоза, цукор-пісок, аеросил, натрію гідроксид, кальцію стеарат, твін-80 або натрію лаурилсульфат. Вибрані мікроелементи дозволили суттєво розширити спектр фармакологічної дії композиції, забезпечивши терапевтичний ефект не лише при лікуванні анемії, а й порушень імунних та репродуктивних функцій, серцево-судинних захворювань, для корекції вуглеводного обміну та ін.[7-11]. Доклінічне вивчення вказаної композиції проведено в ДУ "Інститут фармакології та токсикології АМН України". Після клінічного вивчення під назвою "Есмін" препарат зареєстровано в Україні та випускається ВАТ "Київський вітамінний завод".

Матеріали та методи дослідження. Залізодефіцитну анемію моделювали шляхом внутрішньоочеревинного введення дефероксаміну (десфералу) в дозі 184 мг/кг (20% ЛД50); останній, утворюючи хелатні сполуки з вільним залізом феритину і гемосидерину, сприяє прискореному виведенню заліза з організму і розвитку залізодефіцитної анемії у тварин [12]. Досліди проведені на білих щурах масою тіла 180-210 г, які утримувалися на стандартному харчовому раціоні. Щурів було розподілено на 2 групи (по 6 тварин в кожній): 1 — група негативного контролю із модельною анемією; 2- дослідна група тварин щоденно, починаючи з другої доби після введення десфералу, отримувала внутрішньо композицію мікроелементів (КМ) у дозі, еквівалентній 0,4 мг/кг заліза (умовно терапевтична доза, вста-

новлена для статевозрілих тварин). Вказану добову дозу препарату вводили у вигляді зависі в 2 % крохмальному клейстері на один прийом під час їжі або безпосередньо після неї. Забір крові у щурів цих груп проводився через 1, 6, 10, 15 добу після закінчення введення десфералу. Останнє спостереження проводили на 20 добу після декапітації тварин [11], забирали кров, кістковий мозок із стегнової кістки та визначали їх морфологічний склад. Гемоглобін, еритроцити, лейкоцити, морфологічний склад кісткового мозку визначали за загальноприйнятими методами [11]. Для морфологічних досліджень брали серце, печінку, нирки, надниркові залози, селезінку. Матеріал фіксували у 10 % розчині формолу, виготовляли парафінові зрізи, які фарбували гематоксиліном та еозином. Статистична обробка даних проводилась з використанням критерію Стьюдента

Результати та їх обговорення. Критеріями ефективності лікування залізодефіцитних анемії прийнято вважати, по-перше, відновлення гемопоетичної функції організму, в тому числі: збільшення кількості еритроцитів, кольорового показника крові та показника гематокриту; по-друге, нормалізацію концентрації сироваткового заліза, зниження загальної та латентної залізов'язуючої здатності сироватки, підвищення насичення трансферину залізом, поповнення тканинних резервів заліза, а також зворотній розвиток трофічних порушень епітелію та ендотелію, зумовлених дефіцитом заліза [11].

У роботі представлені експериментальні дані лише щодо впливу металовмісних препаратів на відновлення морфологічного стану периферичної крові, на мієлограму та архітектоніку внутрішніх органів тварин на тлі десфералової анемії.

Отримані результати відносно порушень гемопоезу під впливом десфералу (табл.1) свідчать, що в контрольній групі тварин вже на першу добу дослідження вміст гемоглобіну достеменно знижувався з $165,0 \pm 12,0$ до $128,0 \pm 8,0$ г/л (22,4%), на 10 добу спостереження відзначено найнижчі показники гемоглобіну — $113,0 \pm 5,4$ г/л (31,5%) і лише з 15 доби настає часткове відновлення його вмісту до $133,0 \pm 7,5$ г/л (19,4%), не досягаючи, втім, вихідного рівня до закінчення експерименту (20 доба).

У групі тварин, яких лікували композицією мікроелементів, ці показники суттєво відрізнялися від показників тварин попередніх груп. Так, незначне зниження гемоглобіну (на 9,1% та 11,5%) спостерігалось лише на 6 та 10 добу відповідно, а з 15 доби рівень гемоглобіну повністю нормалізувався.

Показники периферичної крові щурів із залізодефіцитною (десфераловою) анемією (n=6) та при профілактиці її розвитку

Показники крові	Умови досліджу (M±m), n=6	Вихідні дані	Термін дослідження після закінчення введення десфералу (доба)				
			1	6	10	15	20
Гемоглобін, г/л	Анемія (К)	165,0±12,0	128,0±8,0	115,0±6,0	113,0±5,4	133,0±7,5	140,0±7,2
	Анемія + КМ	165,0±12,0	154,0±8,0	150,0±9,2	146±8,0	156,0±8,5	170,0±9,3
Еритроцити, т/л	Анемія (К)	6,1±0,28	5,6±0,5	5,1±0,28	4,8±0,36	4,6±0,3	5,0±0,4
	Анемія + КМ	6,1±0,28	7,2±0,41	6,5±0,31	5,7±0,35	6,3±0,4	6,8±0,34
Лейкоцити, г/л	Анемія (К)	13,8±0,9	15,6±1,2	12,0±0,8	12,3±0,9	13,0±1,0	14,6±0,9
	Анемія + КМ	13,8±0,9	15,0±0,9	14,2±0,72	15,0±0,8	14,6±0,64	15,4±0,85
Паличкоядерні нейтрофіли, г/л	Анемія (К)	0,28±0,01	0,3±0,01	0,12±0,01	0,12±0,01	0,28±0,01	0,29±0,01
	Анемія + КМ	0,28±0,01	0,30±0,014	0,28±0,014	0,30±0,02	0,30±0,02	0,31±0,012
Сегментоядерні нейтрофіли, г/л	Анемія (К)	5,52±0,4	3,6±0,3	3,1±0,3	2,76±0,26	2,8±0,15	5,23±0,31
	Анемія + КМ	5,52±0,4	6,3±0,4	5,4±0,41	6,3±0,4	5,7±0,38	6,3±0,4
Еозинофіли, г/л	Анемія (К)	0,14±0,01	0,08±0,001	-	0,12±0,008	0,14±0,01	0,15±0,01
	Анемія + КМ	0,14±0,01	0,15±0,01	0,14±0,01	0,15±0,01	0,15±0,01	0,15±0,01
Моноцити, г/л	Анемія (К)	0,69±0,02	0,80±0,02	0,36±0,01	0,49±0,02	0,56±0,02	0,73±0,03
	Анемія + КМ	0,69±0,02	0,75±0,02	0,71±0,03	0,75±0,03	0,74±0,03	0,76±0,02
Лімфоцити, г/л	Анемія (К)	7,18±0,61	10,82±0,7	8,42±0,41	8,81±0,4	9,22±0,7	8,2±0,62
	Анемія + КМ	7,18±0,61	7,50±0,57	7,67±0,35	7,5±0,35	7,71±0,54	7,90±0,44
Тромбоцити, г/л	Анемія (К)	420±24	500±25	520±27	600±41	530±15	470±25
	Анемія + КМ	420±24	430±26	450±23	450±27	430±15	410±28

Динаміка зміни кількості еритроцитів у щурів з десфераловою анемією (негативний контроль) спочатку (1-10 доба) була аналогічною зміні гемоглобіну з максимальним зниженням на 15 добу. На 20 добу рівень еритроцитів все ще залишався зниженим до рівня 6 доби дослідження.

Використаний в досліді препарат Есмін був достатньо ефективним на тлі десфералу, про що свідчила його здатність попереджувати закономірне падіння вмісту в крові еритроцитів уже в перші терміни дослідження та сприяло збереженню вихідного рівня впродовж всього експерименту.

Потрібно зауважити, що кількість лейкоцитів в умовах десфералу на 1 добу зростала, а на 6 та 10 — дещо знижувалась, не виходячи при цьому за межі фізіологічних показників. У ці строки у зазначеної групи щурів знижувався вміст паличкоядерних нейтрофілів і моноцитів. Кількість сегментоядерних нейтрофілів у контролі на 1, 6, 10 та 15 доби знижується з 5,52±0,4 до 3,6±0,3; 3,1±0,3; 2,76±0,26 та 2,8±0,15 % відповідно, а еозинофіли на 6 добу зникали.

Кількість лімфоцитів в умовах десфералової анемії у тварин контрольної групи достеменно збільшувалась, починаючи з 1 доби розвитку

патології і до кінця експерименту. При застосуванні ж Есміну в умовах даної патології попереджувалися будь-які порушення вмісту лімфоцитів.

Відомо, що при анеміях, насамперед залізодефіцитних, суттєво підвищується вміст тромбоцитів. Це відображено і в результатах досліджень морфологічного складу крові на тлі десфералової анемії: у тварин контрольної групи рівень тромбоцитів протягом всіх термінів спостереження відчутно зростає максимально на 10 добу — з 420±24 до 600±41 10⁹ г/л. Беручи до уваги, що лікування анемії потребує тривалого застосування стимуляторів еритропоезу, стає очевидною перспективність препаратів, котрі не впливали б на рівень тромбоцитів.

Згідно з отриманими результатами, введення створеної композиції мікроелементів попереджує зростання вмісту тромбоцитів у всі досліджувані строки.

Наприкінці терміну спостереження, тобто на 20 добу після закінчення введення десфералу, одночасно з вивченням впливу композиції мікроелементів на морфологічний склад периферичної крові у тварин з модельною анемією проводилося вивчення морфологічного складу кісткового мозку.

Результати досліджень мієлограми, зазначені у табл. 2, свідчать, що у тварин контрольної групи впродовж вказаного терміну залишаються зміненими деякі її показники. Зокрема, дещо зниженою була кількість еритробластів та молодих форм мієлоїдного ряду, що призводить до зниження індексу дозрівання нейтрофілів з 1 до 0,92.

У щурів, яким вводили композицію мікроелементів, кількість еритробластів ще залишалась підвищеною, що призводило до зниження індексу дозрівання клітин еритроїдного ряду з 0,6 до 0,55. Підвищувалась також кількість молодих форм мієлоїдного ряду з 27% до 30%, в зв'язку з чим зріс й індекс дозрівання нейтрофілів з 1 до 1,2.

Необхідно зазначити, що в кістковому мозку щурів, які одержували композицію мікроелементів, спостерігалось підвищення кількості стовбурових клітин, що мітотично ділилися, та молодих форм еритроїдного ряду.

Підтвердженням позитивного впливу композиції мікроелементів при залізодефіцитній анемії є і результати морфологічних досліджень внутрішніх органів тварин, які проводилися наприкінці експерименту. Встановлено, що під дією десфералу у тварин спостерігаються серйозні зміни архітекtonіки внутрішніх органів, зокрема (рис.1):

- у серці: осередкове, нерівномірне забарвлення м'язових волокон еозином. Саркоплазма гомогенна, структурна смугастість невиразна.

Таблиця 2

Вплив комплексу мікроелементів на показники мієлограми щурів в умовах десфералової анемії

Показники мієлограми, %	Вихідні дані (норма)	Негативний контроль (десферал)	Комплекс мікроелементів
1	2	3	4
Гемоцитобласти	—	—	—
Промієлоцити	1	1	2
Мієлоцити нейтрофільні	15	13	17
Мієлоцити еозинофільні	2	1	2
Мієлоцити базофільні	—	—	—
Метамієлоцити (юні)	11	10	11
Паличкоядерні нейтрофіли	13	12	11
Сегментоядерні нейтрофіли	16	15	16
Еозинофіли	1	1	2
Моноцити	1	1	1
Базофіли	—	2	—
Лімфоцити	12	17	8
Ретикулярні клітини	—	—	—
Плазматичні клітини	1	3	1
Проеритробласти	—	—	—
Еритробласти базофільні	6	4	6
Еритробласти поліхроматофільні	5	5	6
Еритробласти оксифільні	5	5	5
Нормобласти поліхроматофільні	5	5	5
Нормобласти оксифільні	6	5	6
Індекс дозрівання елементів еритроцитарного ряду	0,6	0,62	0,55
Кістково-мозковий індекс дозрівання нейтрофілів	1	0,92	1,2
Лейко-еритроїдне відношення	2,2 : 1	2,3 : 1	2,1 : 1

М'язові проміжки місцями набряково розширені, в них дещо підвищена кількість клітинних елементів (рис. 1а);

- у селезінці: пульпа значною мірою повнокривна, на окремих ділянках — різко. Фолікули різних розмірів, деякі з них мають ушкодження у виг-

ляді розчленованості внаслідок повнокрив'я судин. У таких місцях, а також у фолікул невеликих розмірів помітна дезорганізованість лімфоцитарного шару. В окремих місцях спостерігається гіперплазія фолікул, що свідчить про активацію лімфоїдної тканини. Фолікули

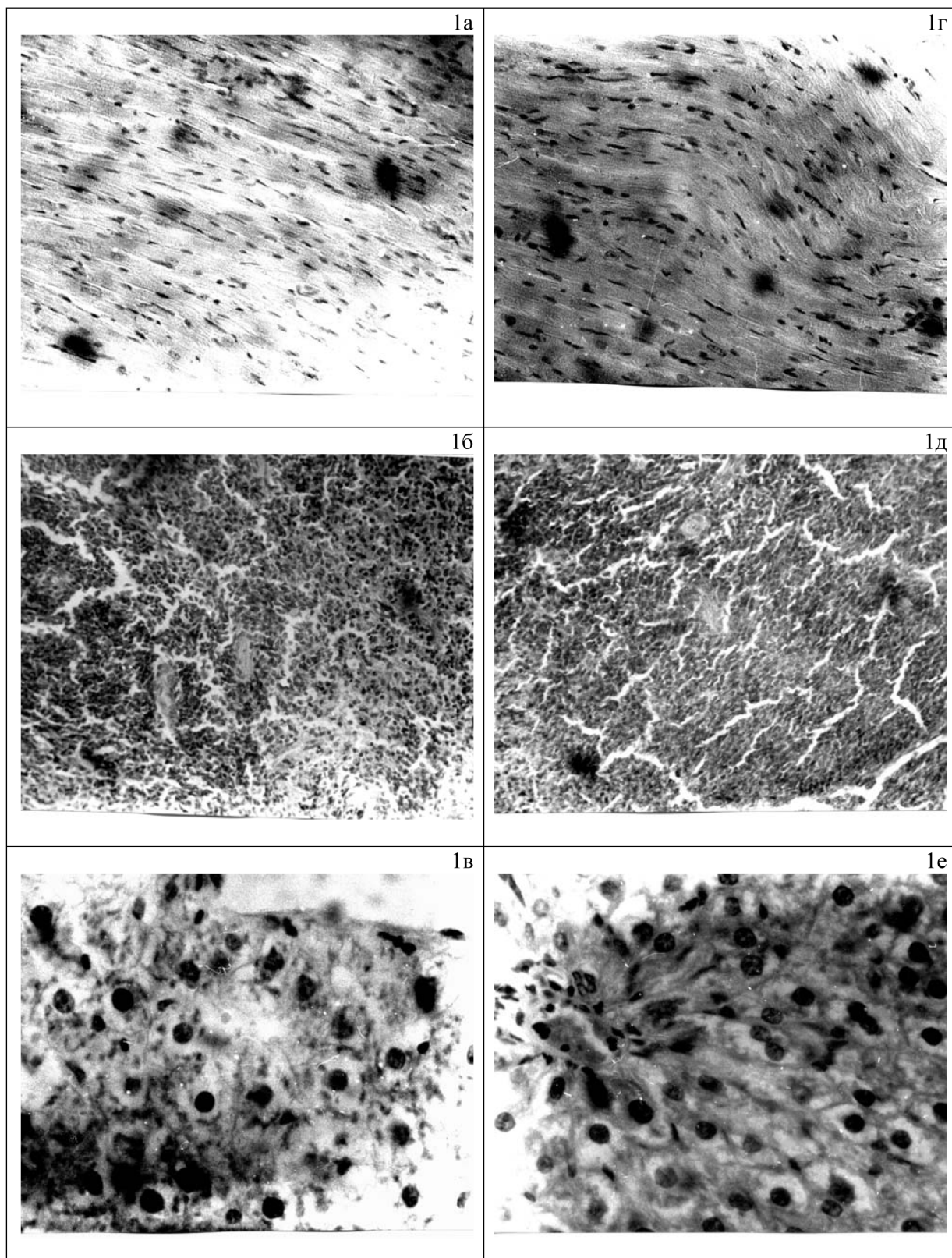


Рис. 1. Вплив композиції мікроелементів на структуру внутрішніх органів в умовах десфералової анемії. Позначки: контроль 1а, 1б, 1в; лікування - 1г, 1д, 1е відповідно міокард, селезінка, печінка. Гематоксилин-еозин x200.

збільшені у розмірах, мають чітко окреслений реактивний центр (рис.1б);

- печінка характеризується наявністю органічних змін у вигляді білкової дистрофії; в центрі часточок у окремих гепатоцитів спостерігається набряк, зернистість цитоплазми, ядра в основному поліморфні, контуруються невиразно зі зменшеним вмістом хроматину. Деякі гепатоцити у стані загибелі. Одночасно зустрічаються і продуктивні прояви, зокрема наявність в гепатоцитах ядер збільшених розмірів, які виразно контуруються, зі значним вмістом зерен хроматину, інколи великого розміру; судини в таких зонах повнокрівні, по ходу окремих гілок ворітної вени помітна невелика клітинна інфільтрація (рис.1.в).

Отже, на тлі залізодефіцитної анемії у тварин контрольної групи до 20-ї доби в серці, печінці та нирках зустрічаються осередкові зміни у вигляді білкової дистрофії. У селезінці патологічні відхилення більш значущі, характеризуються в основному гемодинамічними змінами з наступним порушенням структурної цілісності фолікул.

При лікуванні композицією комплексів мікроелементів властиві анемії, морфологічні зміни суттєво зменшені. Отже, архітектоніка міокарда, печінки, нирок практично відповідає аналогічній внутрішніх органів інтактних тварин. Забарвлення еозином міофібрил міокарда в основному рівномірне, структурна смугастість задовільнопомітна, в деяких місцях зустрічається незначне розгалуження між'язових просторів з невеликим збільшенням формених елементів (рис.1г). Основна маса гепатоцитів у центрі часточок печінки не змінена, вони мають звичайну фор-

му та розмір, круглясте ядро з незначним поліморфізмом та виразно окресленими дрібними зернами хроматину; судини печінки повнокрівні, по ходу окремих гілок ворітної вени клітинна інфільтрація незначна (рис.1д). Істотне зменшення негативного впливу десфералу під впливом композиції мікроелементів виявлено і на структурі селезінки (рис.1е), хоча для повного попередження специфічного пошкодження органа, курс терапії варто продовжити. Таким чином, композиція комплексів мікроелементів при залізодефіцитній анемії практично повністю запобігає появі дистрофічних порушень у серці, печінці та нирках, а у селезінці істотно їх знижує.

Висновки.

1. Створена композиція мікроелементів [Fe, Zn, Mn, Cu, Co, Cr, Se, Mo, V] — препарат Есмін на тлі залізодефіцитної анемії запобігає стрімкому зниженню еритроцитів, сегменто- та паличко-ядерних нейтрофілів, лімфоцитів, нормалізує вміст гемоглобіну, стимулює кістково-мозкову еритропоетичну активність на рівні недиференційованих клітин і молодих форм еритробластичного ряду, запобігає або знижує дистрофічні порушення у внутрішніх органах.
2. Суттєвою перевагою Есміну над іншими протианемічними засобами є властивість в умовах тривалого застосування запобігати зростанню рівня тромбоцитів у крові. Позитивний вплив Есміну на систему крові, мієлограму та архітектоніку серця, печінки, селезінки та його здатність запобігати зростанню вмісту тромбоцитів у крові, враховуючи тривалість застосування стимуляторів еритропоезу, обґрунтовує перспективність їх використання при анеміях, зокрема, залізодефіцитних.

ЛІТЕРАТУРА

1. Воробьев П.А. Анемический синдром в клинической практике / П.А. Воробьев. — М. — 2001. С.36—94.
2. Lauffer R.B. Iron, ageing and human disease: historical background and new hypotreses / R.B. Lauffer // Iron and human disease / Ed. R.B.Lauffer. — Florida: CRC Press Inc., 1992. — P.1—20.
3. Лубянова И.П. Роль повышенного содержания железа в организме в развитии патологии (обзор) / И.П. Лубянова // Журн.АМН Украины. —1998. — Т.4. — № 3. — С.514—529.
4. Горохова С.Г. Лечение железодефицитных состояний. Все ли решено? / С.Г. Горохова / Рус. Мед.журн. — 2004. — № 7. — С.1006-1009/
5. Григорьева А.С. Оптимизация фармакологической активности биометаллов при комплексообразовании с НПВС / А.С. Григорьева // Микроэлементы в медицине. — 2001. — Т.2. № 1 — С.17—22.
6. Скальный А.В. Химические элементы в физиологии и экологии человека / А.В. Скальный/ М.: ОНИКС 21 век: Мир. — 2004. — 215 с.
7. Иммунофармакология микроэлементов / А.В. Кудрин, А.В. Скальный, А.А. Жаворонков [и др.]// М.: КМК. — 2000. — 537 с.
8. Витамины и микроэлементы в клинической фармакологии./[под ред. В.А.Тутельяна]. -М.: Палей-М. -2001. -560с.
9. Корекція токсичного впливу ембіхіну на гемопоез композицією мікроелементів і вітамінів / Г.С. Григор'єва, М.А. Мохорт, Т.С. Клеменцева [и др.] //Соврем.проблемы токсикол. — 2001. — №1. — С.53—56.
10. Довідник лікарських засобів у 2-х томах/[за ред В.Т.Чумак] — К.: Моріон, — 2007. 1216 с.
11. Руководство по клинической лабораторной диагностике / [под ред.Базарновой М.А.] -Киев:Вища школа. — 1982. — Ч.2. — С.30—48.
12. Доклиническое изучение антианемических, средств, антикоагулянтов и фибринолитиков. Методичні рекомендації / Ю.Н.Максимов, И.И.Лановенко — Київ: Фармакологический комитет МЗ Украины —1995. — 12 с.

Надійшла до друку 6.10.2011 р.