



Сравнительное исследование токсических свойств комплекса оксованадия и его металлохелатного лиганда

**Н.М. Воробьева¹, Е. В. Федорова¹, А.В. Бурякина¹, Е.К. Вишневская¹,
Т.В. Горбачева², А.Е. Аладышкина²**

¹ – ГОУ ВПО Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия,

² – Судебно-химическое отделение государственного учреждения здравоохранения
“Бюро судебно-медицинской экспертизы, Санкт-Петербург

Контактная информация: Федорова Елена Викторовна,
elena.fedorova@pharminnotech.com.

Ключевые слова: средняя полумлетальная доза, коэффициент кумуляции, ванадил сульфат.

Цель работы состояла в сравнительном изучении острой токсичности, кумулятивной активности нового органического комплекса оксованадия *бис{трет-бутил[амино(имино)метил]карбамато}оксидованадия (IV) (БАМК)* и его лиганда *трет-бутоксикарбонилгуанидином (БКГ)* и оценке их влияния на морфологию внутренних органов по сравнению с ванадил сульфатом.

Величина ЛД₅₀ для БАМК составила 178 мг/кг, для БКГ – 1003 мг/кг и для ванадил сульфата – 407 мг/кг. Согласно градации Hodge и Sterner БАМК и

БКГ можно отнести к веществам с умеренной токсичностью, а БКГ – к малотоксичным соединениям.

В результате исследования кумуляции было показано, что БАМК и ванадил сульфат обладают высокой кумулятивной активностью, а БКГ не кумулирует в органах животных.

Введение

В настоящее время установлено, что ванадий и его органические комплексы обладают гипогликемической активностью [5, 13, 15]. Однако, несмотря на имеющиеся сведения о том, что приме-

нение биологически активных добавок к пище (Редуцил, Глюкобаланс, Витатрим Про, Глюкоз метаболизм саппорт и др.), содержащих ванадил сульфат, улучшает показатели углеводного и липидного обмена у больных сахарным диабетом [11], информация относительно его токсикологических свойств ограничена. В связи с этим изучение возможных повреждающих эффектов ванадия и его соединений как потенциальных лекарственных средств представляется актуальной задачей.

На кафедре неорганической химии СПбХФА был получен новый ванадий-содержащий органический комплекс, бис{*трет*-бутил[амино(имино)метил]карбамато}оксидованадий (IV) (БАМК) с координационным окружением $\text{VO}(\text{N}_2\text{O}_2)$. Синтезированный комплекс оказался более эффективным гипогликемическим агентом как по сравнению с ванадил сульфатом, так и с комплексобразующим лигандом, *трет*-бутоксикарбонилгуанидином (БКГ) [2]. Выбор этого соединения в качестве лиганда был обусловлен тем, что оно относится к бигуанидинам, производные которых широко используются в качестве пероральных противодиабетических средств.

Цель

Изучить острую токсичность, кумулятивные свойства и оценить влияние на морфологию внутренних органов БАМК и БКГ по сравнению с ванадил сульфатом.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 75 беспородных белых половозрелых мышам-самцах массой тела 18-20 г, полученных

из питомника лабораторных животных РАМН “Рапполово” Ленинградской области. При проведении опытов животных содержали в стандартных условиях вивария.

Оксованадиевый комплекс
бис{*трет*-бутил[амино(имино)метил]карбамато}оксидованадий (IV) с координационным окружением $\text{VO}(\text{N}_2\text{O}_2)$ (рис. 1, б) получали при взаимодействии ванадил сульфата с *трет*-бутоксикарбонилгуанидином (рис. 1, а) в молярном соотношении ванадил сульфат: лиганд, равном 1 : 2,2. Поставщик лиганда – ЗАО «Вектон» (Россия).

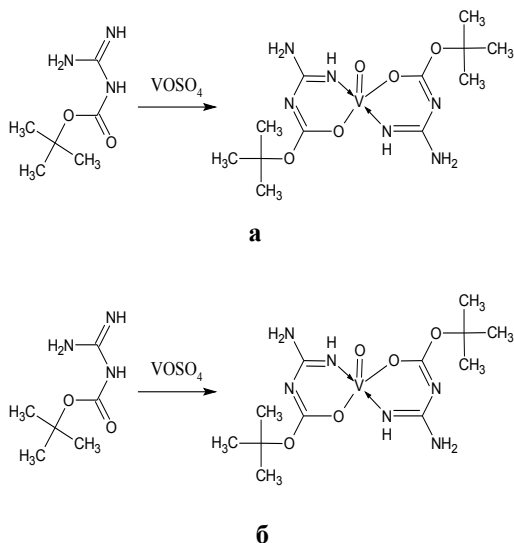


Рис. 1. Химическая структура лиганда (а) и оксованадиевого комплекса (б) с координационным окружением $\text{VO}(\text{N}_2\text{O}_2)$.

Исследование острой токсичности проводили экспресс-методом Прозоровского [4]. Соединения вводили однократно перорально в виде водного раствора металлическим зондом с оливой на конце. Для вычисления LD_{50} ис-

пользовали соотношение погибших и выживших особей в группах животных, получавших соединения в последовательных нарастающих с логарифмическим шагом дозах.

Для исследования кумуляции использовали метод Lim et al [12]. Соединения вводили перорально в виде водного раствора. В эксперименте для каждого из них были использованы группы по 10 животных. Мыши контрольной группы получали воду (ГОСТ «Вода питьевая» 2874–82) в эквивалентных объемах. В каждом опыте учитывали гибель животных при ежедневном введении вещества в дозах, нарастающих каждые 4 дня. Начальная доза составляла 0,1 ЛД₅₀, каждая последующая превышала предыдущую в полтора раза. В соответствии с методикой рекомендованная максимальная продолжительность эксперимента составляет 28 дней, однако возможно его прекращение при достижении показателя гибели животных $\geq 50\%$. Расчет коэффициента кумуляции (K_k) проводили по следующей формуле:

$$K_k = \text{ЛД}_{50(n)} / \text{ЛД}_{50(1)}$$

где ЛД_{50(n)} – полулетальная доза при максимальной для данного вещества кратности введения; ЛД₅₀₍₁₎ – полулетальная доза данного вещества при однократном введении.

Статистическую обработку данных проводили по критерию Стьюдента. Различия определяли при 0,05% уровне достоверности.

Оставшихся в живых животных умертвляли путем дислокации шейных позвонков. Внутренние органы подвергали визуальному осмотру, измеряли массовые коэффициенты (мг/100

г) и забирали образцы для патоморфологического и гистологического исследования, а также эмиссионного спектрального анализа. Материал для гистологических исследований готовили общепринятыми методами [1]. Морфологические изменения органов оценивали с помощью микроскопа «Биолам» (ЛОМО, Россия).

Для качественного определения ванадия в печени, почках и семенниках, их замораживали и использовали метод эмиссионного спектрального анализа. Пробоподготовку проводили согласно методологическим указаниям [3]. В эксперименте использовали следующие группы: группа 1 – интактные животные; группа 2 – животные, получавшие ванадил сульфат; группа 3 – животные, получавшие БАМК. В связи с малым количеством биологического материала для проведения этого анализа объединяли одноименные органы от мышей из группы 1, от мышей из группы 2 и от мышей из группы 3. Органы помещали в фарфоровые тигли, взвешивали на аналитических весах ВЛР-200 и высушивали до постоянной массы, после чего добавляли угольный порошок марки ОСЧ-7-4 пропорционально массе сухих остатков, дважды минерализовали в концентрированной азотной кислоте марки 18-4 ОСЧ с выпариванием до сухого остатка. Далее их озолляли в муфельной печи ПМ-8 и перетирали в тиглях до мелкодисперсного состояния. Спектры снимали в угольных электродах в дуге переменного тока (генератор ИВС Prima AADC) с использованием кварцевого спектрографа ИСП-30 с фотоэлектронной кассетой «Морс». Расшифровка спектрограмм проводилась с помощью программы «SR 303_USB».

Результаты и их обсуждение

Первым этапом эксперимента было определение острой токсичности исследуемых соединений. Было подсчитано, что величина LD_{50} для БАМК составила 178 (160-200) мг/кг, что оказалось на порядок ниже аналогичной рассчитанной величины для БКГ, равной **1003 (910-1170) мг/кг**. Несмотря на то, что полученный комплекс оказался более токсичным по показателю LD_{50} , чем ванадил сульфат, для которого подсчитанная ранее величина LD_{50} составила 407 (310-540) мг/кг, **в соответствии с градацией** Hodge и Sterner [10] оба соединения относятся к одному классу – к веществам с умеренной токсичностью. Согласно этой классификации БКГ представляет собой малотоксичное соединение.

При исследовании кумуляции гибель животных, которые получали БАМК, начиналась с третьих суток. У животных, получавших исследуемые соединения, наблюдались такие признаки интоксикации, как ограничение подвижности, тремор, судороги конечностей, выделения из носовых пазух. Следует отметить, что при введении БАМК эти признаки возникали в более ранние сроки от начала введения, чем у животных, которые получали БКГ. Это свидетельствует о том, что токсические эффекты БАМК проявляются при меньших дозах по сравнению с лигандом.

Больше 50% животных этой группы погибли на третьи-четвертые сутки: 10% – на третьи и 50 % – на четвертые. На основании этих данных коэффициент кумуляции для БАМК составил:

$$K_k = LD_{50(n)} / LD_{50(1)} = 17,8 \times 4 / 178 = 0,4.$$

Полученное значение оказалось < 1 , что свидетельствует о наличии у него

высокой кумулятивной активности. Рассчитанный нами ранее K_k для ванадил сульфата составил 0,4, и, таким образом, по способности к кумуляции эти соединения не отличаются друг от друга.

При изучении кумуляции БКГ гибель мышей начиналась с четвертых суток, после чего больше половины животных умерло в течение 18 суток. Коэффициент кумуляции для этого соединения составил:

$$K_k = 100,3 \times 4 + 150,5 \times 4 + 220,7 \times 4 + 341,02 \times 4 + 501,5 \times 2 / 1003 = 4,24.$$

K_k для БКГ оказался > 1 , таким образом, у него отсутствует кумулятивная активность.

При патоморфологическом исследовании изменений внешнего вида органов выживших животных не наблюдалось, однако массовые коэффициенты тимуса и селезенки мышей, получавших БАМК, были достоверно ниже соответствующих показателей животных контрольной группы, что косвенно свидетельствует о токсическом влиянии ванадийсодержащего комплекса на функции иммунной системы. При введении БКГ у животных наблюдали статистически значимое увеличение массовых коэффициентов почек по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы.

По результатам гистологических исследований тимуса, селезенки и почек мышей, получавших БАМК, и в соответствующих органах животных, которым вводили БКГ, морфологических изменений обнаружено не было. В печени животных обеих опытных групп выявлялись признаки диффузной дистрофии гепатоцитов, очаги лимфоцитарной инфильтрации и некрозы (рис. 2 в, г), однако они были незначительными.

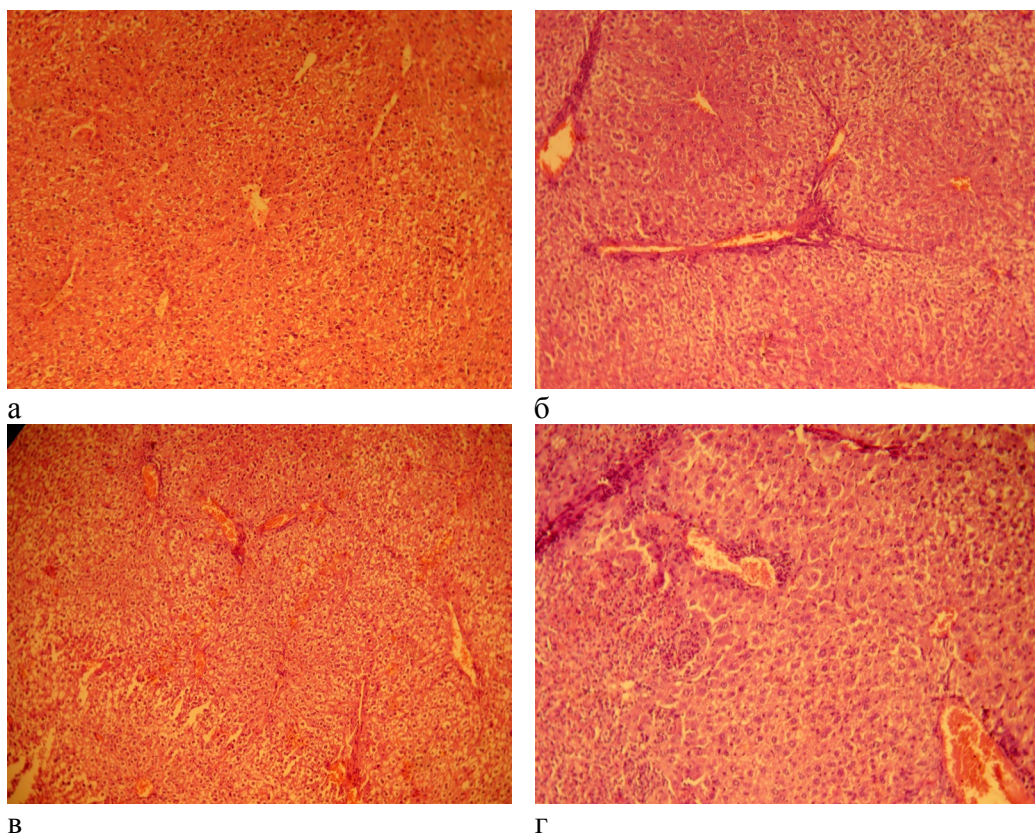


Рис. 2. Гистологическая картина печени животных: а – контроль; б – ванадила сульфат; в – БАМК; г – БКГ.

Наиболее выраженные изменения структуры тканей были обнаружены в семенниках – у мышей, которые получали эти соединения, наблюдали отек и расширение просвета семенных канальцев, а также наличие незрелых элементов сперматогенеза (рис. 3, в, г). Все морфологические изменения, которые отмечали в печени и семенниках у животных обеих опытных групп были выражены в равной степени.

Полученные нами данные свидетельствуют о ярко выраженной способности оксованадиевого комплекса и его лиганда, в отличие от ванадила сульфата, подавлять репродуктивную функцию у мышей при длительном введении в логариф-

мически нарастающих дозах. Влияние БАМК на процессы сперматогенеза, которое обнаружено в наших экспериментах, согласуется с литературными данными для других органических соединений ванадия. Показано, что бидентантные металлоорганические комплексы ванадия IV, содержащие в качестве лигандов 1, 10- фенантролин, 2,2'-бипиридил или 5'-бromo-2'-гидроксиацетофенон и их производные, в экспериментах *in vitro* в концентрациях от 5,5 до 118 мкмоль/л снижали подвижность сперматозоидов человека и проявляли спермицидную активность [16]. Работы, посвященные изучению спермицидной активности ор-

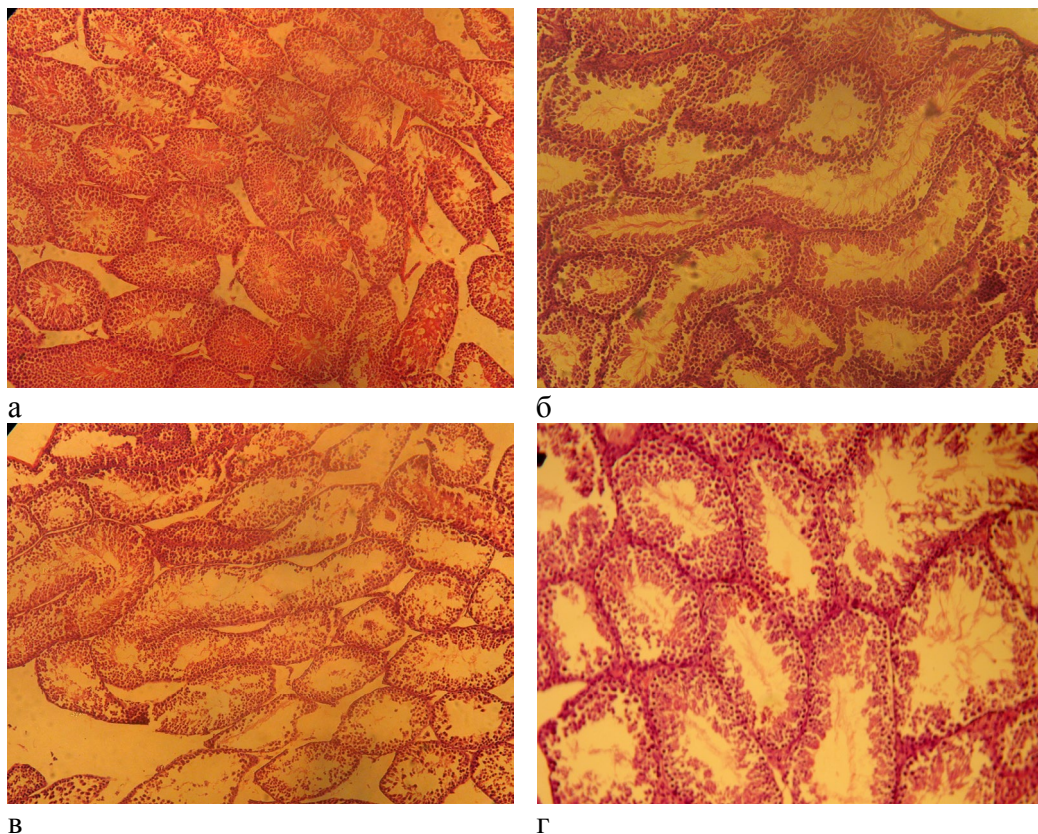


Рис. 3. Гистологическая картина семенников животных: а – контроль; б – ванадила сульфат; в – БАМК; г – БКГ.

ганических комплексов ванадия *in vivo*, в современной литературе отсутствуют. Патологические изменения, которые выявлялись на препаратах семенников мышей, получавших БКГ, но не были обнаружены на срезах соответствующих органов мышей, получавших ванадил сульфат, могут означать, что спермицидное действие БАМК обусловлено его лигандом, но не самим комплексом. Представленные выше данные относительно различного токсического действия комплекса оксованадия и ванадил сульфата требуют проведения дальнейших исследований.

При качественном определении присутствия ванадия во внутренних орга-

нах мышей методом эмиссионного спектрального анализа спектральные линии ванадия были идентифицированы только в зольных остатках печени животных, получавших ванадил сульфат и мышей, получавших БАМК (группы 2 и 3), в отличие от зольных остатков печени контрольных мышей (группа 1) рис. 4. Полученные результаты подтверждают наибольшую вероятность кумуляции и БАМК и ванадил сульфата в печени. В зольных остатках семенников и почек мышей всех используемых групп (как контрольной группы 1, так и опытных групп 2 и 3) спектральные линии этого элемента не были обнаружены.

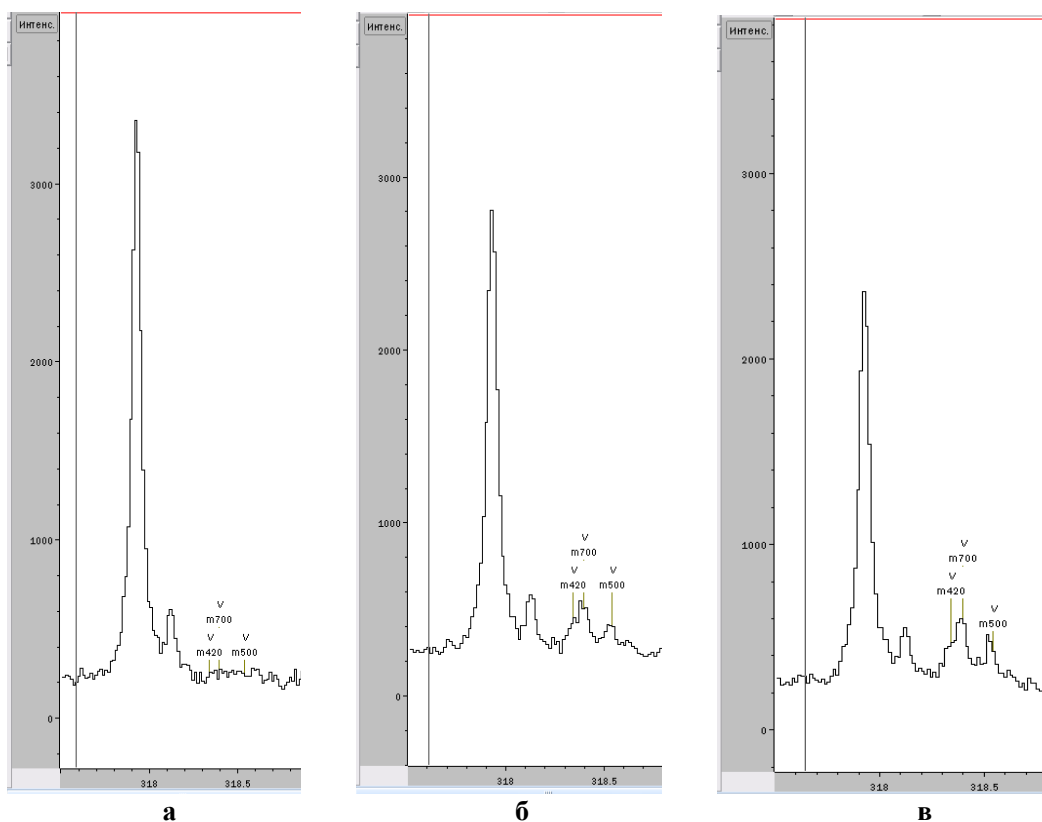


Рис. 4. Эмиссионные спектры золевых остатков печени животных: а – контроль; б – ванадила сульфат; в – БАМК.

По литературным данным [9], у крыс в норме самое большое количество ванадия находится в костях и зубах, которые являются метаболическими депо этого элемента, а меньшие концентрации – в семенниках, печени и почках. Согласно результатам атомной абсорбционной спектрометрии [7] при введении крысам ванадил сульфата в питьевой воде в концентрациях 0,5-1,5 мг/мл (100-300 мг/кг в день) в течение года содержание ванадия в органах убывало в следующем порядке: кости > почки > семенники > печень. Тем не менее, несмотря на кумуляцию, ванадил сульфат не оказывал существенного влияния на морфологию и массу внутренних органов этих животных.

По результатам атомной абсорбционной спектрометрии у человека в норме наибольшая концентрация ванадия, поступающего с пищей, содержится в печени, где она составляет 4,5-19 мкг/кг. Содержание ванадия в почках – 3-7 мкг/кг [6].

Полученные нами данные не противоречат литературным, приводимым выше, так как спектральные линии ванадия были установлены только в печени мышей, получавших ванадил сульфат и БАМК. В нашем эксперименте не удалось обнаружить ванадий в семенниках и почках, так как эти органы имеют значительно меньшую массу по сравнению с печенью и меньшую способность к накоплению ванадия, поэтому чувстви-

тельности используемого метода в данном случае, видимо, недостаточно для его обнаружения.

Результаты токсикологических исследований показали, что при пероральном приеме ванадий и его неорганические соли вызывают ряд сходных побочных эффектов у людей и животных. Так, у добровольцев, которые принимали ванадил тартрат в дозе 0,47–1,3 мг/кг в капсулах в течение 45–68 дней отмечали расстройство желудочно-кишечного тракта, но изменений лейкоцитарной формулы, липидного профиля, содержания гемоглобина, альбумина, остаточного азота и мочевины в крови на протяжении всего эксперимента отмечено не было [8]. В работе других авторов при введении крысам метаванадата натрия в питьевой воде в концентрациях 23–29 мг/кг в течение 2, 4 и 8 недель наблюдали сходные побочные эффекты: диарею, потерю массы тела, ограничение потребления воды и пищи. Однако, в отличие от людей, у животных выявляли изменения некоторых гематологических показателей – происходило снижение гематокрита и концентрации гемоглобина, увеличение количества ретикулоцитов и полихроматофильных эритроцитов периферической крови, что свидетельствует об общем угнетении эритропоэза [17].

Известно, что токсичность и эффективность соединений ванадия меняются в зависимости от степени его окисления и лиганда, с которым он связан в комплексе. Так, наиболее выраженным цитотоксическим действием в культуре фибробластов мыши линии SV 3T3 обладают соединения ванадия (IV) с координационным окружением $\text{VO}(\text{S}_4)$, $\text{VO}(\text{S}_2\text{N}_2)$, $\text{VO}(\text{S}_2\text{O}_2)$ [18]. Токсикологиче-

ские свойства комплексов ванадия с координационным окружением $\text{VO}(\text{N}_2\text{O}_2)$, к которым относится изучаемый нами комплекс, мало исследованы. В ряде экспериментов на клеточной линии Сасо-2 изучали цитотоксичность трех комплексов ванадия III, IV и V с дипиколинатами с таким же координационным окружением [14]. Результаты показали, что, несмотря на различную степень пролиферации и кумуляции в клетках, все три комплекса имеют одинаковую цитотоксичность. В то же время работы, посвященные их токсическим эффектам *in vivo*, практически отсутствуют.

Результаты изучения острой токсичности, кумулятивной активности и влияния БАМК на морфологию внутренних органов свидетельствуют, что синтезированный нами органический комплекс БАМК и ванадил сульфат обладают сходными токсикологическими характеристиками.

Выводы

Ванадил сульфат и новый оксованадиевый комплекс имеют сходные токсические свойства: относятся к веществам с умеренной токсичностью и обладают высокой кумулятивной активностью;

Все исследуемые соединения оказывают выраженное влияние на морфологию семенников, однако БАМК и БКТ, в отличие от ванадила сульфата, вызывают патологические изменения в их ткани, о чем свидетельствует наличие незрелых элементов сперматогенеза.

На основании полученных данных можно предположить, что патологические изменения семенников, вызванные БАМК, обусловлены введением в комплекс лиганда, обладающего спермицидной активностью.

Список литературы

1. **Волкова О.В., Елецкий Ю.К.** Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина. 1971. 271 с.
2. **Воробьева Н.М., Федорова Е.В., Шкляренко А.А.** Сравнительное исследование биологической активности комплекса оксованадия и его лиганда // В кн.: материалы 67-й открытой школы-конференции молодых ученых и студентов с международным участием "Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины". Волгоград. 2009. 202 с.
3. **Назаров Г.Н., Макаренко Т.Ф.** Методы спектрального анализа в судебной медицине. – М.: МНПП «ЭСИ». 1994. 360 с.
4. **Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.М.** Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // Фармакол. и Токсикол. 1978. №4. С. 497-502.
5. **Badmaev V., Prakash S., Majeed M.A.** Vanadium. Review of its Potential Role in the Fight Against Diabetes // The Journal of Alternative and Complementary Medicine. 1999. T. 5. C. 273-291.
6. **Barceloux D.G.** Vanadium. // Clinical Toxicology. 1999. T.37. № 2. C. 265-278.
7. **Dai S., Thompson K.H., Vera E., McNeill J.H.** Toxicity studies on one-year treatment of non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats with vanadyl sulphate // Pharmacol. and Toxicol. 1994. T. 75. C. 265-273.
8. **Dimond et al.,** Vanadium. Excretion, toxicity, lipid effect in man // Am. J. Clin. Nutr. 1963. T. 12. C. 49-53.
9. **Edel J., Sabbioni E.** Vanadium transport across placenta and milk of rats to the foetus and newborn // Biological Trace Element Research. 1989. T. 22. C. 265-275.
10. **Hodge H. C., Sterner J. H.** Tabulation of toxicity classes // Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 1949. T. 10. C. 93-96.
11. <http://shp.by.ru/health/bad/altera/products>.
12. **Lim R. K., Rink G., Glass H. G., Soaje-Echague E.** A method of the evaluation of cumulation and tolerance by the determination of acute and sub chronic median effective dose. // Arch. Int. Pharmacodyn. 1961. T. CXXX. № 3-4. C. 336-353.
13. **Poucheret P., Verma S., Grynepas M.D., McNeill J.H.** Vanadium and diabetes // Molecular and Cellular Biochemistry. 1998. T. 188. C. 73-80.
14. **Rehder D.** In vitro study of the insulin-mimetic behaviour of vanadium (IV, V) coordination compounds // J. Biol. Inorg. Chem. 2002. T. 7. C. 384-96.
15. **Srivastava A.** Anti-diabetic and toxic effects of vanadium compounds // Molecular and Cellular Biochemistry. 2000. T. 206. C. 177-182.
16. <http://www.patents.com/us-6245808.html>.
17. **Zaporowska H., Wasilewski W.** Some selected peripheral blood and haemopoietic system indices in Wistar rats with chronic vanadium intoxication // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1989. T. 75. № 2. C. 83-90.
18. **Zhang Y., et al.** The permeability and cytotoxicity of insulin-mimetic vanadium (III,IV,V)-dipicolinate complexes // J. Inorg. Biochem. 2006. T. 100. c. 80.

A comparative study of toxicological properties of a oxovanadium (IV) complex and his metallohelat ligand

N.M. Vorobyeva, E.V. Fedorova, A.V. Buryakina, E.K. Vishnevskaya,
T.V. Gorbacheva, A.E. Aladyshkina

The purpose of the work has consisted in comparative studying acute toxicity, cumulative activity of a new organic oxovanadium (IV) complex *bis*{*tret*-butyl[amino(imino)methyl]carbamato}oxydovanadium (IV) (BAMK) and his ligand *tret*-butoxycarbonylguanidine (BKG) and to the estimation of their influence on morphology of internals in comparison with vanadyl sulfate.

Values of LD₅₀ for the BAMK, BKG and vanadyl sulfate has averaged 178 mg / kg, 1003 mg / kg and 407 mg / kg correspondingly. According to the scale of Hodge and Sterner it is possible to attribute BAMK and BKG as the compounds with moderately toxic substances, and BKG – as compound with low toxicity. Because of research cumulation activity it has been shown, those BAMK and vanadyl sulfate have high cumulative activity, and BKG does not cumulate in internals of animals.

Key words: medium lethal dose, rate of cumulation, vanadyl sulfate.