

## Determination of the accumulative toxicity parameters of iron (IV) on white mice

V.B. Dukhnitsky<sup>1</sup>, I.M. Derkach<sup>1</sup>, M.O. Plutenko<sup>2</sup>, I.O. Fritsky<sup>2</sup>, S.S. Derkach<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

03041, Kyiv, 15 Heroiv Oborony Street, Kiev, Ukraine

Taras Shevchenko National University of Kyiv

01601 64 Volodymyrska Street, Kiev, Ukraine. E-mail: [irina1215@ukr.net](mailto:irina1215@ukr.net), [derkach\\_im@nubip.edu.ua](mailto:derkach_im@nubip.edu.ua)

Received: 02.03.2018. Accepted: 08.04.2018

Worldwide timely prevention is one of the main tasks in the fight against anemia. Therefore, the development and introduction of new iron preparations does not lose importance in order to provide the pharmaceutical market with anti-anemetics. One of the promising approaches to the development of such drugs may be the creation of highly stable iron compounds. In this context, one of the promising groups of the compounds of the iron is the so-called clathrochelates, or macrobicyclic complexes. The article presents the parameters of acute toxicity of iron (IV) clathrochelate complexes in laboratory animals. Experimental studies were conducted under the conditions of vivarium and the Department of Pharmacology and Toxicology of the Faculty of Veterinary Medicine of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. The indicative experiment was conducted in order to obtain primary information about the range of doses that are close to the average fatal indicator. Then 7 groups of 6 white mice-males in each were formed based on the principle of analogues. Having conducted the indicative experiment in order to obtain primary information about the range of doses that are close to the average fatal indicator, 7 groups of 6 white mice-males in each were formed based on the principle of analogues. Single intravenous solution of iron (IV) clathrochelate complexes was administered to the animals of the experimental groups and they were observed during 14 days. The features of behavior, intake of food and water were noticed, symptoms of intoxication and death of animals were recorded. As a result of the studies, it was found that the average mortality dose of the test substance for internal administration to white mice is  $1258.3 \pm 144.87$  mg/kg body weight. According to the classification of chemicals by the degree of danger (GOST 12.1.007-76), of iron (IV) clathrochelate complexes corresponds to the third class of hazard, and according to the classification of substances for toxicity it belongs to class IV and as for its toxicity it is "low toxic substances".

**Key words:** iron (IV); clathrochelate complexes; dose; white mice; acute toxicity

## Визначення параметрів гострої токсичності феруму (IV) на білих мишах

В.Б. Духницький<sup>1</sup>, І.М. Деркач<sup>1</sup>, М.О. Плутенко<sup>2</sup>, І.О. Фрицький<sup>2</sup>, С.С. Деркач<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування України

03041, Київ, вул. Героїв Оборони, 15

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка

01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64. E-mail: [irina1215@ukr.net](mailto:irina1215@ukr.net), [derkach\\_im@nubip.edu.ua](mailto:derkach_im@nubip.edu.ua)

В усьому світі вчасне проведення профілактичних заходів є одним із основних завдань у боротьбі з анемією, тому не втрачає актуальності розроблення та впровадження у виробництво нових ферумвмісних препаратів з метою забезпечення фармацевтичного ринку протианемічними засобами. У цьому контексті однією з перспективних груп сполук феруму є так звані клатрохелати, або макробіциклічні комплекси. У результаті проведених досліджень встановлено, що середньосмертельна доза клатрохелату феруму (IV) за внутрішнього введення білим мишам складає  $1258,3 \pm 144,87$  мг/кг маси тіла. Згідно класифікації хімічних речовин за ступенем небезпечності (ГОСТ 12.1.007-76), клатрохелат феруму (IV) відповідає III класу небезпечності, а відповідно до класифікації речовин за токсичністю – IV класу і ступеню токсичності – «малотоксичні речовини».

**Ключові слова:** клатрохелат феруму (IV), доза, білі миші, гостра токсичність.

## Вступ

За сучасних умов ведення тваринництва питання профілактики захворювань та лікування тварин, хворих на анемію, не втрачає актуальності (Jiefen et al., 2017; Kim et al., 2018). Анемію, як одну з найбільш поширених незаразних хвороб молодняку, яка завдає значних економічних збитків господарствам, реєструють сьогодні у всьому світі.

Аліментарна анемія є клініко-гематологічним синдромом, що зумовлений порушенням синтезу гемоглобіну та зменшенням кількості еритроцитів у крові. У живому організмі це відбувається як наслідок дефіциту незамінних факторів мінерально-вітамінного живлення, передусім феруму, купруму, кобальту, цинку, вітамінів С і В<sub>12</sub> та ін. (Evans, Abraham, 1973; Bonkovsky, Herbert, 1991; Walter et al., 1997; Killip, Bennett, 2008; Ganz, 2013). Водночас, анемія може бути симптомокомплексом, який супроводжує численні патологічні процеси.

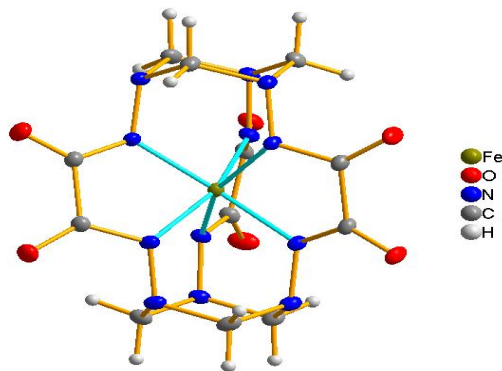
Слід відмітити, що у зв'язку з особливостями біологічного розвитку у поросят-сисунів – це «самостійне захворювання». Адже новонароджені поросята є найбільш незрілими з усіх сільськогосподарських тварин. Їх маса тіла не досягає 1 % маси тіла свиноматки, а інтенсивний ріст молодняку значно випереджає формування кровотворних органів та досконалість їх функціональної діяльності. Хоча в організмі новонародженого поросяти існує певна кількість феруму, який надходив через плаценту у період внутрішньоутробного розвитку, гемоцитопоез відстає від потреб організму, необхідність у ньому з ростом і розвитком поросяти інтенсивно зростає (Walter et al., 1997; Karput' et al., 2003; Batrakov et al., 2005).

Отже, вчасне проведення профілактичних заходів є одним із основних завдань боротьби з анемією. Навіть після лікування тварини не реалізують свою потенційну продуктивність, а м'ясо втрачає поживні якості і має обмеження щодо використання. У тварин відмічають блідість слизових оболонок, зниження маси тіла та імунітету, що, в свою чергу, призводить до інфекційної патології та навіть загибелі, яка може досягати 60–70 % (Gajdukova et al., 2003; Shirinova, 2005).

Зважаючи на вищезгадане, актуальним є розроблення та впровадження у виробництво нових ферумвмісних препаратів з метою забезпечення фармацевтичного ринку протианемічними засобами (Lipiński et al., 2010; Maes et al., 2011; Streyl et al., 2015; Jiefen et al., 2017).

Одним із перспективних підходів до розробки таких препаратів може бути створення високостабільних сполук феруму, в яких іони металу будуть «упаковані» в органічній матриці, з якої метал *in vivo* буде поступово звільнятися по мірі біодеградації препарату. Це дозволило б мінімізувати небажані ефекти, пов'язані з токсичністю акваіонів та аквакомплексів феруму (III), які, зазвичай, утворюються в результаті введення ферумвмісних препаратів.

У цьому контексті однією з перспективних груп сполук феруму є так звані клатрохелати, або макробіциклічні комплекси. В останніх іони металу фактично «упаковані» в нанокapsулу, яка перешкоджає взаємодії з переважною більшістю реагентів, зокрема, біолігандів, а також екранує метал від інших факторів оточуючого середовища. Нещодавно ми повідомляли про синтез унікальних клатрохелатних сполук феруму (IV) (рис. 1), які самочинно утворюються у присутності кисню повітря у водних розчинах (Tomun et al., 2017).



**Рис. 1.** Будова клатрохелатного аніону  $[\text{Fe}(\text{L-6H})]^{2-}$

Комплекси характеризуються дивовижною стабільністю як у твердому стані, так і у розчинах. Так, у водному розчині за величини рН 7 дані клатрохелати можуть існувати необмежено довго (впродовж місяців) без жодних ознак розкладу. Більше того, навіть в агресивних сильноокислих (рН 1) та сильнолужних (рН 13) середовищах дані сполуки зазнають лише незначного розкладу (не більше 5% упродовж одного місяця). Таким чином, можна очікувати, що за внутрішнього застосування клатрохелати феруму (IV) будуть зазнавати лише повільного розкладу, забезпечуючи поступове звільнення йонів феруму з нанокapsули.

Необхідною умовою комплексу доклінічних досліджень нових лікарських засобів є вивчення параметрів їх токсичності. Проведення досліджень з визначення гострої токсичності препарату є першим етапом для одержання інформації щодо безпечності/небезпечності даного лікарського засобу для здоров'я в умовах короткотривалого застосування у високих дозах.

Таким чином, метою даної роботи стало дослідження гострої токсичності клатрохелату феруму (IV), з встановленням параметрів його токсичності.

**Мета наших досліджень** полягала у проведенні токсикологічної оцінки клатрохелатного комплексу феруму (IV)  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{L}-6\text{H})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  за одноразового внутрішнього введення лабораторним тваринам (білим мишам).

## Матеріали і методи досліджень

Визначення параметрів гострої токсичності феруму (IV) проводили згідно з методичними вказівками (Kosenko et al., 1997; Kocjumbas, 2006).

Дослідження проводили на базі кафедри фармакології та токсикології Національного університету біоресурсів і природокористування України та віварію факультету ветеринарної медицини НУБіП України. Об'єктом дослідження був клатрохелат феруму (IV)  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{L}-6\text{H})]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (де L – макробіциклічний гексагідрозидний ліганд), синтезований співробітниками кафедри фізичної хімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Гостру токсичність визначали на білих мишах 3,5-4 міс. віку, масою тіла 20-22 г. Тварин утримували згідно з діючими «Санітарними правилами щодо устрою, обладнання та утримання експериментально-біологічних клінік (віваріїв)» за температури 18-20°C та відносної вологості повітря 50-55 %, природнього світлового режиму "день-ніч", у пластикових клітках. Годівлю здійснювали за стандартною схемою повнораціонним комбікормом, потребу у воді не обмежували. Усі дослідження проводили з дотриманням правил (Commission of the European Communities, 1991).

Тварин перед проведенням досліджень утримували в умовах карантину впродовж 14 діб і мали вільний доступ до корму та води. За 3 год до введення досліджуваної речовини годівлю та напування було припинено.

Досліджуваний препарат вводили у формі водного розчину одноразово внутрішнього за допомогою зонду із розрахунку, щоб об'єм не перевищував 0,5 мл для однієї миші. Дозу обчислювали у мг діючої речовини (ДР) на 1 кг маси тіла.

Спочатку було проведено орієнтовний дослід з метою отримання попередньої інформації про діапазон доз, які близькі до середньосмертельної. Для цього трьом мишам вводили досліджувану речовину у дозах, які відрізнялися на порядок. Після цього проводили розгорнутий дослід, в якому мінімальна доза феруму не спричиняла загибелі мишей, а найбільша – викликала 100% летальність.

Досліди проводили на 42-х білих мишах-самцях, яких за принципом аналогів було розподілено на 7 груп по 6 тварин у кожній. Тваринам дослідних груп вводили розчин феруму у дозах: 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 мг/кг маси тіла. Мишам контрольної групи вводили дистильовану воду в об'ємі 0,5 мл. За лабораторними тваринами проводили ретельні спостереження впродовж 14 діб та відзначали в динаміці зміни їх клінічного стану. У першу добу тварини перебували під безперервним наглядом. Відмічали особливості поведінки, прийому корму та води, реєстрували прояви симптомів інтоксикації та загибель тварин.

Значення середньосмертельної дози розраховували з використанням методів Г. Кербера (1931) та Першина (1939, 1950). Довірчі межі знаходили за методом К. Міллера та М. Тейнтера. Згідно з отриманими результатами, ферум (IV) класифікували за ступенем небезпечності та токсичності (Kocjumbas, 2006).

## Результати досліджень та їх обговорення

У перші хвилини після внутрішнього введення розчину клатрохелату феруму (IV) у мишей усіх груп спостерігали стресову реакцію на проведенне втручання. Відмічали незначне збудження з наступним заспокоєнням.

На 30 хвилину у тварин шостої дослідної групи (ферум (IV) у дозі 2500 мг/кг маси тіла), з'являлися симптоми від дії препарату на загальний стан з ознаками пригнічення. Миші хаотично переміщалися у клітці, стрибали, були згорбленими. На четверту годину після введення препарату в мишей цієї групи спостерігали збудження, яке поступово змінювалося пригніченням, відмічалось прискорення серцевої діяльності та дихання.

Вказані ознаки тривали певний час, потім миші приймали бокове лежаче положення, здійснювали плавальні рухи, повільно піднімали та опускали хвіст.

Через 6 годин 10 хв загинуло 5 мишей шостої дослідної групи (доза феруму (IV) 2500 мг/кг маси тіла).

Через 8 годин загинуло по 2 тварини, яким застосували клатрохелат феруму (IV) у дозах 2000 та 1500 мг/кг маси тіла (п'ята та четверта дослідні групи), та по 1 миші з груп, яким вводили ферум (IV) у дозах 1000 і 500 мг/кг маси тіла (третья та друга дослідні групи). У решти тварин дослідних груп реєстрували ознаки збудження, які тривали впродовж 3 год, що можна пояснити стресом. Вони поступово відновлювалися до нормального стану.

На наступну добу (через 24 год) реєстрували по одній загиблій миші у групах тварин, яким вводили ферум (IV) у дозах 2500, 2000, 1500 і 1000 мг/кг маси тіла. На 4-ту добу загинула одна миша з п'ятої групи (ферум (IV) у дозі 2000 мг/кг маси тіла) та на 5-ту добу – одна тварина з четвертої дослідної групи, (ферум (IV) у дозі 1500 мг/кг маси тіла). Це дає нам можливість припустити про наявність функційної кумуляції у феруму (IV) як представника групи важких металів. Надалі загибелі тварин не спостерігали.

Всі тварини першої дослідної групи, яким задавали ферум (IV) у дозі 100 мг/кг маси тіла, залишилися живими. У них реєстрували лише слабко виражені ознаки пригнічення впродовж перших двох годин, які надалі зникали і тварини цієї групи за поведінкою, споживанням корму і води не відрізнялися від мишей контрольної групи.

Результати визначення гострої токсичності феруму (IV) на білих мишах наведені в табл. 1.

**Таблиця 1.** Протокол результатів гострого дослідження за внутрішнього введення білим мишам феруму (IV)

Доза, мг/кг м. т.	Кількість тварин у групі	Кількість загиблих тварин					
		За добами				Всього	У процентах
		1	2	5	15		
100	6	-	-	-	-	0	0
500	6	1	-	-	-	1	17
1000	6	1	1	-	-	2	33
1500	6	2	1	1	-	4	67
2000	6	2	1	1	-	5	83
2500	6	5	1	-	-	6	100

З наведених у таблиці 1 даних видно, що токсичний вплив феруму (IV) за внутрішнього введення білим мишам проявляється за дози препарату 500 і більше мг/кг маси тіла. За таких умов загибель мишей у дослідних групах становила від однієї до шести (табл. 2), на підставі чого маємо можливість провести розрахунки щодо визначення DL<sub>50</sub>.

**Таблиця 2.** Дослідження гострої токсичності феруму (IV) на білих мишах

Доза, мг/кг	Загинуло/вижило	Доза, мг/кг	Загинуло/вижило
100	0/6	1500	4/2
500	1/5	2000	5/1
1000	2/4	2500	6/0

$$DL_{50} = DL_{100} - \frac{\sum zd}{m};$$

де DL<sub>100</sub> – доза речовини, яка вивчається і спричиняє загибель всіх тварин групи;

d – інтервал між кожними двома суміжними дозами;

z – середньоарифметичне з числа тварин, які загинули під впливом двох суміжних доз;

m – кількість тварин у кожній групі.

Результати цих розрахунків наведені в табл. 3.

**Таблиця 3.** Визначення токсичності феруму (IV) за допомогою методу Г. Кербера

Доза, мг/кг м. т.	100	500	1000	1500	2000	2500
Вижило	6	5	4	2	1	0
Загинуло	0	1	2	4	5	6
z	0,5	1,5	3,0	4,5	5,5	
d	400	500	500	500	500	
zd	200	750	1500	2250	2750	

У нашому випадку m=6; DL<sub>100</sub>=2500 мг/кг;  $\sum zd=200+750+1500+2250+2750=7450$ .

DL<sub>50</sub> = DL<sub>100</sub> -  $\sum zd / m = 2500 - 7450 / 6 = 1258,3$  мг/кг.

Ці ж дані обрахували і за методом Першина (табл. 4).

**Таблиця 4.** Визначення токсичності феруму (IV) за допомогою методу Г. Першина

Доза, мг/кг м. т.	100	500	1000	1500	2000	2500
Результати, що спостерігалися	0/6	1/5	2/4	4/2	5/1	6/0
Відсоток тварин, які загинули	0	17	33	67	83	100
a+b	600	1500	2500	3500	4500	
m-n	17	16	34	16	17	
(a+b)(m-n)	10200	24000	85000	56000	76500	

$$\sum [(a+b)(m+n)] = 10200+24000+85000+56000+76500=251700$$

$$DL_{50} = \sum [(a+b)(m+n)] / 200 = 1258,5 \text{ мг/кг.}$$

Отже, результати DL<sub>50</sub>, підрахованої різними методами майже не відрізняються.

Довірчі межі  $DL_{50}$  знаходимо за методом К. Міллера та М. Тейнтера, де розраховуємо  $\sigma$ , т. При цьому  $2\sigma = DL_{84} - DL_{16}$ , а середня похибка середньосмертельної дози обчислюється за формулою:

$$m = \frac{2\sigma}{\sqrt{N' \times 2}}$$

де  $N'$  – загальна кількість мишей у групах, в яких загинула або вижила хоча б одна тварина.

Згідно з нашими даними  $2\sigma = DL_{84} - DL_{16} = 1749,3 - 749,7 = 999,6$ , тоді  $m = 144,87$ .

Таким чином,  $DL_{50} = 1258,3 \pm 144,87$ .

## Висновки

Експериментально доведено, що клатрохелат феруму (IV), згідно класифікації хімічних речовин за ступенем небезпечності (ГОСТ 12.1.007-76), відповідає III класу небезпечності, а згідно класифікації речовин за токсичністю – IV класу і ступеню токсичності – «малотоксичні речовини».

$DL_{50}$  для лабораторних тварин (білі миші) становить  $1258,3 \pm 144,87$  мг/кг маси тіла.

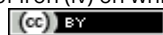
Перспектива подальших досліджень полягає у дослідженнях фармако-токсикологічних властивостей феруму (IV) з використанням отриманих даних.

## References

- Batrakov A. Ja., Travkin O.V., Jakovleva E.V. (2005). Profilaktika alimentarnoj anemii u porosjat. Veterinarija, 12, 44-45. (in Russian).
- Bonkovsky, S., Herbert, L. (1991). Iron and the Liver. The American journal of the medical sciences, 301(1), 32-43. <https://doi.org/10.1097/00000441-199101000-00006>
- Commission of the European Communities: Council Directive of 18 December 1986 on the Laws, regulating the Application of Principles of Good Laboratory Practice and the Verification of Their Applications for Tests on Chemical Substances (87/18/EEC) (1991). The Rules Governing Medicinal Products in the European Community, 1, 145-146.
- Evans, J. L., Abraham, P. A. (1973). Anemia, Iron Storage and Ceruloplasmin in Copper Nutrition in the Growing Rat. The Journal of Nutrition, 103(2,1), 196-201. <https://doi.org/10.1093/jn/103.2.196>
- Gajdukova S.M., Vydyborec S.V., Sivak V.A. (2003). Zhelezodeficitnaja anemija: sovremennye podhody k diagnostike i lecheniju. Tri krapki. Kiev (in Russian).
- Ganz, T. (2013). Systemic iron homeostasis. Physiological Reviews. 93 (4). 1721-1741. doi: [10.1152/physrev.00008](https://doi.org/10.1152/physrev.00008)
- Jiefen, C., Yinping, L., Peng, Y., Qiping, Zh., Jingfeng, W., Yongzhou, Ch., Peng, W. (2017). A novel low molecular weight Enteromorpha polysaccharide-iron (III) complex and its effect on rats with iron deficiency anemia (IDA). International journal of biological macromolecules, 108, 412-418. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac>
- Karput' I. M. Nikoladze M. G. (2003). Diagnostika i profilaktika alimentarnoj anemii porosjat. Veterinarija, 4, 34-37. (in Russian).
- Kim, J.C., Wilcock, P., Bedford, M.R. (2018). Iron status of piglets and impact of phytase superdosing on iron physiology: A review. Animal Feed Science and Technology, 235, 8-14.
- Killip, S., Bennett, M. Iron Deficiency Anemia (2008). American Family Physician, 15, 78(8), 671-678.
- Kocjumbas I.Ja. (2006) Doklinichni doslidzhennja veterynarnyh likars'kyh zasobiv. L'viv. Triada pljus (in Ukrainian).
- Kosenko M.V., Malyk O.G., Kocjumbas I.J. (1997). Toksykologichnyj kontrol' novyh zasobiv zahystu tvaryn. Kyi'v (in Ukrainian).
- Lipiński, P., Starzyński, R., Canonne-Hergaux, F., Tudek, B., Oliński, R., Kowalczyk, P., Dziaman, T., Thibaudeau, O., Gralak, M. A., Smuda, E., Woliński, J., Usińska, A., Zabielski R. (2010). Benefits and Risks of Iron Supplementation in Anemic Neonatal Pigs. American journal of hematology, 177(3), 1233-1243. doi: [10.2353/ajpath.2010.091020](https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091020).
- Maes, D., Steyaert, M., Vanderhaeghe, C., López Rodríguez, A., de Jong, E., Del Pozo Sacristán, R., Vangroenweghe, F., Dewulf, J. (2011) Comparison of oral versus parenteral iron supplementation on the health and productivity of piglets. Veterinary record, 19, 168-188. doi: [10.1136/vr.c7033](https://doi.org/10.1136/vr.c7033)
- Shirinova L. (2005). Bolezni porosjat neonatal'nogo perioda. Alimentarnaja anemija porosjat. Veterinarija sel'skhozajstvennyh zhivotnyh, 9, 45-47 (in Russian).
- Streyl, K., Carlstron, J., Dantos, E., Mendoza, R., Islas, J.A., Bhushan C. (2015). Field Evaluation of the Effectiveness of an Oral Toltrazuril and Iron Combination (Baycox® Iron) in Maintaining Weaning Weight by Preventing Coccidiosis and Anaemia in Neonatal Piglets, 114(1), 193-200. doi: [10.1007/s00436-015-4525-9](https://doi.org/10.1007/s00436-015-4525-9).
- Tomyn S., Shylin S. I., Bykov D., Ksenofontov V., Gumienna-Kontecka E., Bon V., Fritsky I.O. (2017) Indefinitely stable iron (IV) cage complexes formed in water by air oxidation. Nature Communications, 8, 1-8.
- Vrednye veshhestva. Klassifikacija i obshhie trebovanija bezopasnosti (1982). GOST 12.1.007-76. Moscow. Izdatel'stvo standartov (in Russian).
- Walter, T., Olivares, M., Pizarro, F., Muñoz, C. (1997). Iron, Anemia, and Infection. Nutrition Reviews, 55 (4), 111-124. doi: [10.1111/j.1753-4887.1997.tb06462.x](https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1997.tb06462.x)

### Citation:

Dukhnitsky, V.B., Derkach, I.M., Plutenko, M.O., Fritsky, I.O., Derkach, S.S. (2018). Determination of the accumulative toxicity parameters of iron (iv) on white mice. Ukrainian Journal of Ecology, 8(2), 308-312.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0. License