



УКРАЇНА

(19) UA (11) 52168 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 9/127МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ХРОНІЧНОЇ РТУТНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ (В ЕКСПЕРИМЕНТІ)

1

2

(21) u201004173

(22) 12.04.2010

(24) 10.08.2010

(46) 10.08.2010, Бюл.№ 15, 2010 р.

(72) КАМІНСЬКИЙ РОСТИСЛАВ ФЕЛІКСОВИЧ,
ЧАЙКОВСЬКИЙ ЮРІЙ БОГДАНОВИЧ(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

(57) Спосіб лікування хронічної ртутної інтоксикації (в експерименті), що передбачає застосування лікарських засобів, який **відрізняється** тим, що внутрішньочеревно вводять унітіол у дозі 0,1 мг на 1 кг маси та розчин кверцетину у дозі 0,01 мг на 1 кг маси тіла щоденно один раз на добу протягом двох тижнів.

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, а саме до токсикології та професійних патологій, фармакології та морфології, і може бути застосована для комплексного лікування хронічної ртутної інтоксикації.

Однією з актуальних проблем кардіології є встановлення основних механізмів розвитку патологічних змін міокарда за дії на організм шкідливих факторів різної природи задля подальшої розробки патологічно направленої раціональної фармакотерапії (1, 2). З літератури відомо, що в генезі багатьох захворювань серцево-судинної системи (атеросклерозу, коронаросклерозу, стенокардії, інфаркту міокарда), поширеність яких неухильно зростає, велике значення має посилення біологічних ефектів малих доз ксенобіотиків в умовах поєднаної дії на організм людини шкідливих хімічних факторів довкілля, серед яких чільне місце займає ртуть та її сполуки. Останні можуть викликати розвиток в організмі як гострих, так і хронічних отруєнь, за яких страждають різні життєві важливі органи і системи (3). Шляхи надходження в організм ртуті та її сполук можуть бути різними, але виведення її, головним чином, відбувається через нирки та кишечник. В зв'язку з цим і вивчення патологічних ефектів ртуті було переважно присвячене нирками, шлунково-кишковому тракту, центральній нервовій системі і менше - іншим органам.

Відомо також, що в механізмах дії ртуті велике значення має блокування нею сульфгідрильних груп окисно-відновних ферментів та шкідливий вплив на енергетичний обмін. До тканин з вираженою енергозалежністю, як відомо, відноситься і міокард, так як серцевий м'яз дуже чутливий до дефіциту кисню і реагує на його нестачу перебу-

довою біохімічних процесів, аж до переходу на анаеробний шлях енергоутворення. Механічна активність серцевого м'яза лінійно пов'язана зі швидкістю поглинання кисню міокардом, за підвищення скоротливої активності пропорційно збільшується і поглинання кисню. Тому в механізмах розвитку патологічних змін міокарда за дії ртуті та її сполук важливе місце займає трофічне забезпечення кардіоміоцитів, яке тісно пов'язане зі станом судин, особливо гемомікроциркуляторного русла, стан якого за цих умов потребує подальшого вивчення. Енергетичні запаси кардіоміоцитів переважно залежать від аденозинтрифосфату (АТФ), 90% якого виробляється при окислювальному фосфарилуванні в мітохондріях, а потім використовується на різні процеси: скорочення міофібрил, роботу кальцієвого насоса, роботу мембранного натрій - калієвого насоса, функціонування калієвих каналів, синтетичні процеси та ін.

Біоенергетика міокарда в фізіологічних умовах обумовлена темпами окиснення субстратів переважно в циклі Кребса. Однак, в умовах недостатнього забезпечення киснем цей енергетичний цикл порушується, а молочна кислота не утилізується. Дефіцит АТФ значно підвищує можливість розвитку фібриляції шлуночків і пов'язаних з нею патологічних змін міокарда. Але за токсичної дії на організм ртуті та її сполук в літературі недостатньо даних щодо трофічного та енергетичного забезпечення функціональної активності міокарда, що обумовлює необхідність подальшого вивчення цих процесів як для конкретизації основних механізмів розвитку патології серця, так і для оптимізації профілактичних та лікувальних заходів у таких пацієнтів (4).

(19) UA (11) 52168 (13) U

Тому, метою роботи стало патоморфологічне та гістохімічне дослідження різних ланцюгів енергоутворення в міокарді за дії хлориду ртуті, а також обґрунтування можливості застосування фармакологічних препаратів, дія яких носить чіткий патогенетичний вплив на зміни в серці, за таких умов.

Відомий спосіб лікування ртутної інтоксикації, обраний нами як прототип (5), включає застосування лікарських засобів. Спосіб ґрунтується на визначенні показників змін нейронів, нейроглії та нервових волокон під впливом мідронату в моделі ртутної інтоксикації.

Недоліком цього способу є застосування парабульбарного та субкон'юнктивального шляхів введення, які обмежують ділянку дії препарату, дозування також проводилось без уваги до особливостей організму та вивчалось в комплексі з іншими препаратами, що не дозволяє відокремити їх роль в процесі лікування.

Задача корисної моделі, що заявляється, полягає в обґрунтованості різних методів лікування, забезпеченні збільшення точності при призначенні коректної терапії та її результативності.

Технічний результат, який досягається при вирішенні задачі, полягає у покращенні енергетичного обміну і структури міокарду шляхом патогенетично спрямованого застосування унітіолу і кверцетину.

Поставлена задача досягається тим, що у відомому способі, який передбачає застосування лікарських засобів, згідно корисної моделі внутрішньочеревно вводять унітіол в дозі 0,1мг на 1кг маси та розчин кверцетину в дозі 0,01мг на 1кг маси тіла щоденно один раз на добу протягом двох тижнів.

Унітіол - універсальний антидот, при отруєнні солями токсичних металів це донатор сульфгідрильних (тіолових груп). Механізм дії полягає в тому, що за рахунок наявності сульфгідрильних груп димеркапрол утворює водорозчинні не токсичні комплекси з блокаторами тіолових груп ферментів, пришвидшуючи їх виведення з організму з сечею.

Унітіол - 2,3-димеркаптопропансульфонат натрію ($\text{CH}_2\text{SH}-\text{CHSH}-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{NaNH}_2\text{O}$).

Кверцетин - речовина жовтого кольору є похідним флавонола. Кверцетин блокує фосфоліпазу А2 і запобігає виходу її з клітини. Має широке клінічне значення при застосуванні у хворих на інфаркт міокарда. При застосуванні у хворих на інфаркт міокарда зменшує рівень та ділянку невротизації міокарду. Зменшує вихід іонів кальцію з клітини за рахунок чого зменшується рівень дестабілізації K^+ - Na^+ насосу.

Кверцетин - препарат метаболічного типу дії, антигіпоксанти, антиоксиданти та мембранопротектори.

Спосіб здійснюється наступним чином:

Дослідження проведені на 35 щурах самця лінії Вістар масою 150-170г., утримання та досліди проведені згідно з рекомендаціями Дердавного фармакологічного центру (ДФЦ). Всі тварини були поділені на 5 груп: 1 група контрольна, 2 - внутрішньочеревно вводили унітіол, 3 - внутрішньочере-

вно вводили унітіол, 4 - вводили кверцетин, 5 - одночасно отримували унітіол і кверцетин.

Патоморфологічні та гістохімічні дослідження проводили на серці щурів, котрим протягом двох тижнів внутрішньочеревно вводили розчин хлориду ртуті в дозі 0,01 LD_{50} (2 група), а потім внутрішньочеревно вводили унітіол в дозі 0,01 на 100г маси тіла (3 група), розчин кверцетину в дозі 0,001 на 100г маси тіла (4 група), а також одночасно вводили унітіол і кверцетин в тому ж дозуванні (5 група); всі фармпрепарати вводили протягом двох тижнів. Тварин забивали декапітацією. Готували зрізи. Вивчали наступні показники змін: ушкодження кардіоміоцитів, енергетичний обмін в міокарді.

Для патоморфологічних досліджень серця фіксували в 10% нейтральному формаліні і після стандартної обробки, заливали в парафін. Зрізи товщиною 7мкм фарбували гематоксиліном і еозином, за ван Гізом. На них також гістохімічно вивчали вміст і розподіл нейтральних геінопротеїнів та глікогену (ПАС - реакція за Мак Манасом, контроль з амілазою).

Активність окисно-відновних ферментів вивчали гістохімічно на свіжозаморожених в рідкому азоті зразків серця, які виготовляли в кріостаті: (сукцинатдегідрогенази (СДГ) - за Нахласом і співав., лактатдегідрогенази (ЛДГ) - за Гесс, Скарпелі і Пірсом, НАД - НДГ за Фарбером. Активність ферментів вивчали напівкількісно з подальшою обробкою цифрового матеріалу загальноприйнятими способами статистичного аналізу.

Результати дослідження

Мікроскопічне дослідження міокарда щурів з хронічною ртутною інтоксикацією виявило наявність комплексу патологічних змін. Встановлене посилення проникності стінок всіх відділів гемомікроциркуляторного русла та помірний периваскулярний набряк. Ендотелій мікросудин з набряком, різною мірою дистрофічно змінений аж до вогнищевої десквамації. Підендотеліальні базальні мембрани капілярів та венул з нерівномірним набряком, розпушені. Діаметри дрібних гілок внутрішньоорганічних вільцевих артерій і артеріол дещо розширені, просвіти кровонаповнені. Пухла сполучна тканина всіх відділів серця з набряком, розпушена. Клітинні сполучнотканні елементи переважно звичайної форми та кількості.

Токсична дія хлориду ртуті обумовлює гетерогенність ушкодження кардіоміоцитів. Більша частина їх з ознаками нерівномірного набряку. Ядерний апарат кардіоміоцитів змінений неоднозначно: частина ядер нерівномірно збільшена в розмірах, гіпохромна, інші - нерівномірно пікноморфні, гіперхромні, зустрічається нерівномірний перинуклеарний набряк. Структурні ушкодження міокарда в умовах хронічної ртутної і охоплюють всі відділи правого і лівого серця. Під кінець строку введення хлориду ртуті виявляються початкові ознаки розвитку фіброзу інтерстиція і формування кардіосклерозу.

Енергетичний обмін в міокарді тварин цієї групи суттєво змінений. Перш за все, відмічається нерівномірне зниження активності СДГ в кардіоміоцитах всіх відділів серця. Фермент гістохімічно виявляється зменшеною кількістю зерен дифор-

мазану, розміри котрих коливаються від помірних до дрібних. Темно-сині зерна диформазау в більшості кардіоміоцитів розташовані вздовж міофібрил. Однак виявляються і крупнозернисті фокуси кінцевого продукту реакції, розташовані дифузно в саркоплазмі, а в місцях контрактурних змін вони зливаються в більші конгломерати. В цілому активність СДГ в міокарді щурів цієї серії вірогідно знижена до $2,1 \pm 0,02$ одиниць активності, проти $2,8 \pm 0,02$ одиниць активності в контролі. Таке зниження активності СДГ співпадає з посиленням в саркоплазмі кардіоміоцитів фонові реакції.

Паралельно зі зниженням активності СДГ в міокарді всіх відділів серця щурів цієї серії експерименту виявляється вірогідне підсилення активності гліколітичних процесів. Під впливом хлориду ртуті знижується і активність ферментів термінального окиснення - НАД - Н ДГ, котра гістохімічно виявляється мозаїчним зменшенням кількості зерен диформазау в саркоплазмі кардіоміоцитів всіх відділів серця за одночасного нерівномірного збільшення їхніх розмірів та злиття. Активність НАД - М ДГ знижується з $2,75 \pm 0,02$ до $2,2 \pm 0,03$ одиниць активності за паралельного підсилення фонові реакції.

Така динаміка енергетичного обміну може відображати розвиток в міокарді за хронічної ртутної інтоксикації ознак тканинної гіпоксії. Це свідчить про ураження за таких умов мітохондріального апарата, підсилення проникності його мембран, про що свідчить посилена фонові реакція при гістохімічному виявленні активності СДГ і НАД - М ДГ та зниження їхньої активності.

Вивчення ступеня зворотності за умов хронічної ртутної інтоксикації патологічних метаболічних і структурних змін показало, що виявлені за хронічної дії хлориду ртуті порушення в міокарді є зворотними лише частково. Мікроскопічні дослідження показали зменшення ступеня патологічних змін всіх структур міокарда. Структура ендотелію і підендотеліальної базальної мембрани артерій, капілярів і венул з менш виразними морфологічними порушеннями.

Що стосується енергетичного обміну, то за дії унітіола його показники мають стійку тенденцію до нормалізації. Активність СДГ підвищилась: за її гістохімічного вивчення визначається збільшена, порівняно з показниками групи тварин з хронічною дією хлориду ртуті, кількість рівномірного розміру зерен диформазау, зменшений ступень фонові реакції, а гістохімічний показник активності досягає $2,55 \pm 0,03$ одиниць активності. Така ж динаміка активності НАД - М ДГ, рівень якої досягає $2,45 \pm 0,02$ одиниць активності.

Таким чином, унітіол, будучи універсальним антидотом за дії ртуті, зменшує ступень структурних і метаболічних змін міокарда, рівень котрих однак, не досягає контрольних показників.

Що стосується оцінки дії введення кверцитину на стан метаболізму і структури міокарда у щурів за хронічного впливу хлориду ртуті, то дослідження показали, що він не призводить до суттєвої нормалізуючої дії, особливо на структуру міокарда. Після його використання залишається більшість

морфологічних ознак патології серця як в судинному руслі та інтерстиції, так і в кардіоміоцитах.

В той же час, гістохімічне вивчення стану енергетичного обміну міокарда показала вплив кверцитину на деякі його показники. Так, після його використання посилилась активність СДГ до рівня $2,45 \pm 0,02$ одиниць активності, а НАД - Н ДГ - до $2,40 \pm 0,03$ одиниць активності.

Показники рівня гліколізу достовірно не змінилися і досягли за встановлення активності ЛДГ $2,50 \pm 0,02$ одиниць активності, залишаючись близькими до групи щурів «без лікування за дії хлориду ртуті», що в цілому свідчить, що тканина гіпоксія залишалась на високому рівні.

Одночасне використання на фоні хронічної ртутної інтоксикації унітіола і кверцитину (5-а група) покращило лікувальний ефект з роздільним використанням фармпрепаратів. Комплексна фармакологічна дія призвела до оптимізуючого ефекту за рахунок позитивного впливу на енергетичний обмін і структуру міокарда. Мікроскопічне дослідження встановило зменшення ступеня патологічних змін у всіх відділах серця піддослідних тварин. Зменшився ступень набряку саркоплазми кардіоцитів. Вміст і розподіл білково-полісахаридних комплексів після постановки ПАС - реакції за МАК Манусом був близьким до фізіологічного; вміст глікогена та глікопротеїнів в саркоплазмі кардіоцитів був помірним.

Рівень енергетичного обміну вірогідно не відрізнявся від контролю. Найбільш високою була активність СДГ ($2,75 \pm 0,03$ одиниць активності), котра гістохімічно виявлялась великою кількістю темно-синіх зерен диформазау рівномірної величини вздовж міофібрил. Ступень фонові реакції була незначною. В той же час в саркоплазмі кардіоміоцитів виявлялась зниження, в порівнянні з 3-ю та 4-ю групами, активність ЛДГ, рівень якої наближався до контрольних показників ($2,20 \pm 0,02$ одиниць активності). Активність НАД - Н ДГ залишалась дещо нижчою від контрольних величин однак, це був найбільш високий рівень активності ферментів термінального окиснення порівняно з групами роздільного використання унітіола та кверцитину.

Встановлені показники свідчать про чітку тенденцію до нормалізації в міокарді щурів з хронічною ртутною інтоксикацією в умовах комплексного застосування унітіола і кверцитину процесів оксидоредукції та купуванні ознак тканинної гіпоксії.

Такі позитивні зміни енергообміну, як наслідок комплексного використання унітіола і кверцитину, співпадали з покращенням кровопостачання міокарда. Структура стінок судин гемомікроциркуляторного русла, особливо капілярів і венул, була менш неоднозначно вогнищево змінена в зв'язку з невеликим набряком ендотелію та підендотеліальної базальної мембрани. Переважно в усіх ділянках правих і лівих відділів серця структура стінок капілярів і венул не відрізнялась від контрольної групи. Периваскулярна сполучна тканина в міокарді тварин цієї групи за всіма ознаками наближалась до контрольних показників. Такий стан мікросудинного русла міокарда обумовлював достатню трофіку кардіоміоцитів, що і співпадало в наших

дослідах з чіткою тенденцією до нормалізації енергетичного обліку і структури.

Таким чином, проведені патоморфологічні та гістохімічні дослідження хронічного впливу хлориду ртуті на організм піддослідних тварин, показали, що встановлені енергетичні та структурні зміни можуть знижувати функціональну активність кардіоміоцитів і бути підґрунтям для розвитку за хронічної ртутної інтоксикації серцевої патології.

В основі розвитку патологічних змін у міокарді щурів за таких умов лежать глибокі порушення енергетичного обміну в кардіоміоцитах, які проявляються зниженням активності ферментів тканинного дихання та термінального окиснення рівня гліколітичних процесів, що відображає процес формування тканинної гіпоксії.

Енергетичні порушення розвиваються одночасно зі змінами структури всіх ланок гемомікроциркуляторного русла, що погіршує транскapілярний обмін і в цілому трофіку міокарда.

Таким чином монотерапія патології міокарда хронічної ртутної інтоксикації можлива шляхом патогенетично спрямованого застосування унітіолу і кварцетину.

Комплексне одночасне застосування за таких умов цих препаратів забезпечує оптимізацію енер-

гетичних процесів і структури, які вірогідно не відрізняються від контрольних величин за більшістю показників.

Список літератури:

1. Галенко-Ярошевский П.А., Гацура В.В., Экспериментальные аспекты оптимизации фармакотерапии при острой ишемии миокарда. - М.: Медицина, 2000. - 374с.

2. Велотищев Ю.Е, Темин П.А, Миоохондриальные болезни. В кн.: Ю.Е. Велотищев, П.А. Тормин. Наследственные болезни нервной системы - М. Медицина, 1998. - с. 346-471.

3. Сидоренко Б.А., Преображенский Д.В. Ишемия миокарда: от понимания механизмов к адекватному лечению // Кардиология. - 2000. - с. 106-119.

4. Flares N., Stavrop B., Sheridan D. The effects of diadenogine polyphosphates on the cardiovascular system // Cardiovasc. Res. - 1999. - 1 (42) - P. 15-26.

5. Сокуренько Л.М. Спосіб лікування ртутної інтоксикації (в експерименті). Пат. України №39549, Бюл. Промислова власність, - 2009, кн.11, - №4, - с. 5.25.