



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56463 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G01N 33/50

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ ЗА УМОВ МІКРОМЕРКУРІАЛІЗМУ

1

2

(21) u201010813

(22) 08.09.2010

(24) 10.01.2011

(46) 10.01.2011, Бюл.№ 1, 2011 р.

(72) ШАМАЛО СВІТЛАНА МИКОЛАЇВНА, ЧАЙ-
КОВСЬКИЙ ЮРІЙ БОГДАНОВИЧ

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

(57) Спосіб оцінки ефективності фармакологічної
корекції за умов мікромеркуріалізму, що включає
дослідження нервових тканин, який відрізняється

тим, що у периферійних відділах ушкодженого
сідничного нерва щура після відтворення стандар-
тної моделі травми периферійного нерва в умовах
мікромеркуріалізму визначають різні стадії дефор-
мації новоутворених нервових волокон та пору-
шення дозрівання сполученої тканини, отримані
результати порівнюють з контролем і при змен-
шенні дегенеративно змінених нервових волокон
оцінюють ефективність фармакологічної корекції
за умов мікромеркуріалізму.

Корисна модель, що заявляється, відноситься
до медицини, а саме до гістології та фармакології і
може бути використана для оцінки ефективності
фармакологічної корекції за умов мікромеркуріалі-
зму.

Несприятлива екологічна ситуація в Україні
насамперед обумовлена впливом негативних чин-
ників довкілля на організм людини. Провідна роль
серед хімічних речовин, що забруднюють навко-
лишнє середовище належить важким металам
оскільки метали являють собою один з найголов-
ніших природних ресурсів, що використовують для
розвитку сучасних технологій, а отже утворюють
групу небезпечних екзогенних токсинів [1, 2]. Це
призводить до виникнення екологічно обумовле-
них захворювань, в тому числі і захворювань
центральної нервової системи (ЦНС) та перифе-
ричної нервової системи (ПНС) [3,4]. Отже про-
блема вивчення регенерації нервових волокон під
впливом дії токсичних агентів залишається актуа-
льною [5].

У літературі недостатньо висвітлені дані щодо
впливу тіотриазоліну на збереження та відновлен-
ня структури фібробластів та нейролеммоцитів,
посилення їх синтетичної та фагоцитарної актив-
ності.

Задача, яку вирішує спосіб, що заявляється,
полягає у вивченні впливу тіотриазоліну на регене-
рацію нервових волокон.

Технічний результат при вирішенні задачі по-
лягає в захисті нервових волокон від шкідливої дії
токсичних агентів.

Поставлена задача досягається тим, що у ві-
домому способі, який включає дослідження нерво-
вих тканин, згідно корисної моделі, у периферійних
відділах ушкодженого сідничного нерва щура після
відтворення стандартної моделі травми перифе-
рійного нерва в умовах мікромеркуріалізму визна-
чають різні стадії деформації новоутворених нер-
вових волокон та порушення дозрівання
сполученої тканини, отримані результати порів-
нюють з контролем і при зменшенні дегенеративно
змінених нервових волокон оцінюють ефективність
фармакологічної корекції за умов мікромеркуріалі-
зму.

Спосіб здійснюється наступним чином:

Дослідження були проведені на 40 щурах лінії
Вістар, вагою 150-200 г. Тварин було розподілено
на 4 групи. В 1 та 2 групах моделювали мікромер-
куріалізм шляхом внутрішньо очеревиного вве-
дення хлориду ртуті в дозі 1/100 ЛД₅₀ протягом 2
тижнів, а в 3 та 4 групах протягом 10 тижнів, після
чого тваринам була відтворена стандартна травма
лівого сідничного нерва. Останній перетинали в
ділянці середньої третини стегна і фіксували
центральної та периферійний відрізки на відстані
1-2 мм двома епіневральними швами. Після чого
здійснювали гемостаз, рану зашивали наглухо. В
післяопераційному періоді тваринам першої та
третьої групи вводили 0,9 % фізіологічний розчин
протягом 2 тижнів, а тваринам другої та четвертої
групи вводили препарат Тіотриазолін в дозі 100
мг/кг внутрішньоочеревино протягом 2 тижнів.
Перед забором матеріалу тваринам вводили над-
лишкову дозу тіопенталу (200 мг/кг). Матеріалом

(13) U

(11) 56463

(19) UA

для дослідження були периферійні відділи ушкодженого сідничного нерва щура через 3 та 6 тижнів після відтворення стандартної моделі травми периферійного нерва в умовах мікромеркуріалізму. Матеріал фіксували 2,5 % глутаровим альдегідом на фосфатному буфері та обробляли за загальноприйнятою електронномікроскопічною методикою. Зрізи нервів були виготовлені на ультратомі LKB-III. Ультратонкі зрізи продилялись та фотографували в електронному мікроскопі ПЕМ-125K.

Електронномікроскопічне дослідження показало, що через 3 тижні після стандартної травми нерва за умов короткотривалого мікромеркуріалізму (група 1), у дистальному відрізку останнього спостерігались зміни практично в усіх його структурах. На фоні значної кількості пошкоджених мієлінових волокон зустрічались фіброblastи, структура яких також була порушена. Останні знаходилися в оточенні деполімеризованих колагенових волокон, що були розташовані хаотично на просвітленому фоні, їх фібрили втратили періодичну посмугованість, та мали збільшені темні смужки. У цитоплазмі фіброblastів спостерігались розширені каналні зернистої ендоплазматичної сітки та мітохондрії з просвітленим матриксом та зруйнованими кристами.

Практично всі мієлінові та безмієлінові нервові волокна в цей термін мають виражені деструктивно-дистрофічні зміни, частина з них поглинається макрофагами які, крім фіброblastів, в значній кількості присутні в ендоневрії. Безмієлінові нервові волокна мають набряклу аксоплазму та мітохондрії, патологічно змінені клітини Шванна. Деструкція мієлінових нервових волокон проявляється у вигляді втрати останніми осевих циліндрів, розшаруванням та зникненням періодичності пластин мієлінової оболонки. Виявляються поодинокі патологічно змінені новоутворені нервові волокна з хвилястою мієліновою оболонкою неперервності якої збережена. Аксоплазма таких волокон набрякла, містить зменшену кількість нейрофіламентів та вакуолеподібні мітохондрії.

Патологічних змін зазнають також і нейролемоцити, ультраструктурна організація яких порушена. Цитоплазма клітин Шванна електронно просвітлена, за рахунок цитолізу та містить розширені каналці ендоплазматичної сітки, набряклі мітохондрії. В цей термін характерна наявність овоїдів дегенерації, які утворені клітинами Шванна та макрофагами, що поглинають дегенеративно змінені нервові волокна, у яких деструктована мієлінова оболонка.

На 3 тижень після стандартної травми сідничного нерва за умов короткотривалого мікромеркуріалізму та застосування у якості лікувального засобу препарату «Тіотриазолін» (група 2) виявлено, що новоутворені та дегенеративно змінені мієлінові нервові волокна, які присутні в цей термін в значній кількості оточені колагеновими волокнами без ознак деполімеризації. На повздовжніх зрізах у останніх відмічається чергування світлих та темних смужок з чіткою періодичністю. Структура фіброblastів добре збережена.

Практично всі мієлінові та безмієлінові нервові волокна в цей термін, незважаючи на застосування лікувального препарату, мають виражені деструктивно-дистрофічні зміни. Але на відміну від першої групи дегенеративно змінені нервові волокна, у яких деструктована мієлінова оболонка більш активно поглинаються макрофагами та нейролемоцитами які утворюють овоїди дегенерації. Безмієлінові нервові волокна мають набряклу аксоплазму та мітохондрії. Деструкція мієлінових нервових волокон проявляється у вигляді втрати останніми осевих циліндрів, розшаруванням та зникненням періодичності пластин мієлінової оболонки.

Патологічно змінені новоутворені нервові волокна з хвилястою мієліновою оболонкою мають ознаки відновлення у вигляді присутності груп нейротрубочок та нейрофіламентів, везикули з електроннопрозорим вмістом та неушкоджених мітохондрій з притаманними їм кристами, що свідчить про їх функціональну активність.

Слід відмітити, що ультраструктурна організація нейролемоцитів практично не ушкоджена, вони спостерігаються в значній кількості. Лізис та набряк клітин Шванна не виявлені, їх ядра мають переважно транскрипційно активний еухроматин. Цитоплазма нейролемоцитів містить лише частково розширені каналці ендоплазматичної сітки, комплекс Гольджі, мітохондрії із практично збереженою структурою, багато лізосом.

Через 3 тижні після стандартної травми на фоні довготривалого мікромеркуріалізму (група 3) виявлено розвиток значно більших порушень ультраструктурної організації аніж у дослідних тварин двох попередніх експериментальних груп. Практично всі мієлінові та безмієлінові нервові волокна в цей термін мають виражені деструктивно-дистрофічні зміни, але серед них зустрічається більша кількість новоутворених ніж у тварин в цей термін з короткотривалим мікромеркуріалізмом. Частина таких новоутворених волокон має нормальну будову, решта деформовані. Патологічні зміни новоутворених мієлінових нервових волокон проявляються у вигляді наявності в аксоплазмі значних груп везикул малого та середнього розміру з електроннопрозорим або електроннощільним, тобто гіперосміофільним вмістом; ушкоджених мітохондрій у яких відсутні кристи, а в деяких і внутрішня мембрана; елементи цитоскелету (нейротрубочки та нейрофіламенти) зустрічаються лише у вигляді окремих груп. Мієлінова оболонка патологічно змінених новоутворених нервових волокон стоншена та хвиляста, утворює значні випинання та інвагінації, іноді зустрічається розшарування ламел але неперервність її збережена.

Деструктивно змінені волокна, в яких мієлінові оболонки характеризуються дезорганізацією та відшаруванням, поглинаються макрофагами, та нейролемоцитами з утворенням овоїдів дегенерації. Слід зазначити, що кількість клітин Шванна в цій групі тварин значно менша з більш вираженими патологічними ознаками ніж в групі тварин цього ж терміну, з короткотривалим мікромеркуріалізмом. Патологічно змінені нейролемоцити з одного

боку мають ознаки активності, а з іншого боку ознаки деструкції. Цитоплазма таких клітин електронно просвітлена за рахунок цитолізу, містить як деформовані, так і незначну кількість розширених каналців ендоплазматичної сітки, вакуолеподібні мітохондрії, що втратили кристи.

На тлі патологічно змінених новоутворених та переважної кількості в цей термін дегенеративно змінених мієлінових волокон зустрічаються деполімеризовані колагенові волокна у вигляді втрати їх фібрилами періодичної посмугованості та збільшення розміру темних смуг. Кількість колагенових волокон менша, розташування більш хаотичне, ділянки просвітлення значно більші ніж у групі тварин цього ж терміну з короткотривалим мікромеркуріалізмом. Причиною цього може бути наявність в даній групі тварин в цей термін меншого числа фіброblastів, більша частина з яких патологічно змінена ніж в першій групі експериментальних тварин. У цитоплазмі патологічно змінених фіброblastів спостерігається зменшення кількості розширених каналців зернистої ендоплазматичної сітки та мітохондрії з просвітленим матриксом та зруйнованими кристами.

Через 3 тижні після стандартної травми на фоні довготривалого мікромеркуріалізму та застоювання у якості лікарського препарату «Тіотриазоліну» (група 4) виявлено зменшення дистрофічних змін практично всіх структур травмованого нерва. На тлі деструктивно змінених мієлінових нервових волокон в цей термін зустрічається ще більша кількість новоутворених осьових циліндрів ніж у тварин в цей термін з короткотривалим мікромеркуріалізмом, що отримали лікування. Частина таких новоутворених волокон має нормальну будову, але більша частина їх все ж таки деформована. Але слід зазначити, що патологічно змінені новоутворені мієлінові нервові волокна мають ознаки відновлення у вигляді появи більшої кількості нейротрубочок та нейрофіламентів та появою неушкоджених мітохондрій з притаманними їм кристами на фоні вакуолеподібних. Мієлінова оболонка таких волокон залишається хвилястою, але практично не зустрічається її розшарування.

Деструктивно змінені волокна, в яких мієлінові оболонки характеризуються дезорганізацією та відшаруванням, поглинаються макрофагами, та нейролемоцитами з утворенням овоїдів дегенерації. Слід зазначити, що кількість клітин Шванна в цій групі тварин збільшується, а їх патологічні ознаки зникають на відміну від групи тварин цього ж терміну з довготривалим мікромеркуріалізмом, що не отримували лікування. Нейролемоцити мають ознаки активності. Цитоплазма таких клітин багата на органели і містить значну кількість розширених каналців гранулярної ендоплазматичної сітки, мітохондрії із збереженими кристами, лізомами та округле ядро.

На тлі новоутворених та переважної кількості в цей термін дегенеративно змінених мієлінових волокон зустрічаються нормальні колагенові волокна, але кількість їх незначна. Розташування колагенових волокон залишається хаотичним на фоні просвітлених ділянок. Причиною цього може бути

наявність в даній групі тварин в цей термін відновлення структури фіброblastів, порівняно з третьою групою експериментальних тварин цього ж терміну.

Електронномікроскопічне дослідження показало, що через 6 тижнів після стандартної травми нерва за умов короткотривалого мікромеркуріалізму (група 1) у дистальному відрізку кількість новоутворених нервових волокон зростає у порівнянні з цією групою тварин попереднього терміну, але вони також мають виражені патологічні зміни. Кількість деструктивно змінених волокон, які поглинаються макрофагами та нейролемоцитами в цей термін зменшується. Слід зазначити, що патологічно змінені новоутворені нервові волокна мають різні форми та розміри і розташовані групами. Переважна кількість таких волокон містить просвітлений осьовий циліндр з незначною кількістю нейротрубочок та нейрофіламентів, вакуолеподібні мітохондрії. Мієлінова оболонка патологічно змінених новоутворених нервових волокон стоншена та деформована у вигляді хвилястості її контурів, іноді має місце розшарування ламел, але непереривність її збережена. Клітини Шванна мають як ознаки активності так і патологічні зміни, які схожі з виявленими у таких же клітин цієї групи попереднього терміну. Колагенові волокна виявляються в значній кількості, але практично всі вони деполімеризовані, що пов'язано з патологічними змінами фіброblastів.

Через 6 тижнів після стандартної травми нерва за умов короткотривалого мікромеркуріалізму із застоюванням тіотриазоліну (група 2) у дистальному відрізку кількість новоутворених нервових волокон зростає у порівнянні з цією групою тварин попереднього терміну, але патологічні зміни в них менш виражені. Деструктивно змінені нервові волокна, які в цей термін спостерігаються рідше, активно поглинаються макрофагами та нейролемоцитами, що наявні у значній кількості без ознак пошкодження. В той час, як окремі клітини Шванна мають підвищену фагоцитарну активність, інші беруть участь в формуванні нових волокон. В цитоплазмі таких клітин виявляються осьові циліндри. Слід зазначити, що патологічно змінені новоутворені нервові волокна мають різні форми та розміри і розташовані групами, але мають ознаки відновлення. Переважна кількість таких волокон містить осьовий циліндр з щільним розташуванням нейротрубочок та нейрофіламентів, мітохондрії з добре вираженими кристами. Мієлінова оболонка патологічно змінених новоутворених нервових волокон з ознаками відновлення зберігає хвилястість контурів, але розшарування ламел практично не виявляється. Колагенові волокна спостерігаються в значній кількості, розташовані пучками, без ознак деполімеризації, острівці просвітленого фону значно зменшені у розмірах. Виявлені фіброblastи не мають ознак пошкодження.

Через 6 тижнів після стандартної травми нерва за умов довготривалого мікромеркуріалізму (група 3) у дистальному відрізку кількість новоутворених нервових волокон зростає у порівнянні з цією групою тварин попереднього терміну, але вони мають значно виражені патологічні зміни.

Деструктивно змінені мієлінові нервові волокна поглинаються переважно макрофагами та в меншій мірі патологічно зміненими нейролемоцитами і утворюють овоїди дегенерації. Кількість останніх зменшується в порівнянні з цією групою експериментальних тварин попереднього терміну. Слід зазначити, що патологічно змінені новоутворені нервові волокна мають різні форми та розміри і розташовані групами. Переважна кількість таких волокон містить просвітлений осьовий циліндр з практично відсутніми нейротрубочками та нейрофіламенами, мітохондрії з ознаками деструкції. Мієлінова оболонка патологічно змінених новоутворених нервових волокон деформована, стоншена або навпаки розширена. Деформація мієлінової оболонки спостерігається у вигляді хвилястості її контурів з утворенням глибоких інвагінацій або випячувань, часто має місце розшарування її ламел, але неперервність її збережена. Колагенові волокна виявляються в незначній кількості, на просвітленому фоні та практично всі мають ознаки деполімеризації. Виявлені фібробласти мають ознаки деструкції у вигляді просвітлення цитоплазми та зменшення кількості органел.

Через 6 тижнів після стандартної травми нерва за умов довготривалого мікромеркуріалізму із застосуванням тіотриазоліну (група 4) у периферійному відрізу кількість новоутворених нервових волокон зростає у порівнянні з цією групою тварин попереднього терміну та групи тварин цього ж терміну без застосування фармакотерапії. Переважна кількість новоутворених нервових волокон має ознаки патологічних змін, які виражені у меншій мірі ніж у тварин цього ж терміну без застосування тіотриазоліну. Мієлінова оболонка таких нервових волокон помірно деформована у вигляді незначної хвилястості її контурів з утворенням неглибоких інвагінацій, практично не має місце розшарування її ламел, неперервність збережена. Осьовий циліндр новоутворених нервових волокон містить нейротрубочки та нейрофіламенти, незмінені мітохондрії. Деструктивно змінені мієлінові нервові волокна поглинаються макрофагами та нейролемоцитами, що не мають ознак деструкції і утворюють овоїди дегенерації. Кількість останніх зменшується в порівнянні з цією групою експериментальних тварин попереднього терміну. Активні клітини Шванна беруть участь в утворенні

нових мієлінових та безмієліноних нервових волокон. В цитоплазмі таких клітин наявні осьові циліндри, та розвинуті органели. В цій групі тварин спостерігаються нормальні колагенові волокна в незначній кількості із збереженням чергуванням темних та світлих зон на просвітленому фоні. У наявних фібробластів відсутні ознаки деструкції.

Таким чином, мікромеркуріалізм за умов травми периферійного нерва призводить до патологічних змін практично всіх його компонентів, але довготривалий мікромеркуріалізм, на відміну від короткотривалого, викликає більш глибокі порушення структур в ушкодженному периферійному нерві. Патологічні зміни проявляються переважно у вигляді різних стадій деформації новоутворених нервових волокон, та порушення дозрівання сполучної тканини.

Використання тіотриазоліну протягом двох тижнів після травмування нервового стовбура на фоні короткотривалого та довготривалого мікромеркуріалізму покращує процес регенерації переважно за рахунок збереження та відновлення структури фібробластів та нейролемфоцитів, посилення їх синтетичної та фагоцитарної активності.

Джерела інформації:

1. Вашкулат Н.П. Установление уровней содержания тяжелых металлов в почвах Украины /Н.П. Вашкулат, В.И. Пальгов, Д.Р. Спектор //Довкілля та здоров'я. - 2002. - № 2 (21). - С. 44-46.
2. Мудрый Я.Д. Тяжелые металлы в окружающей среде и их влияние на организм /Я.Д. Мудрый, Т.К. Короленко //Врачебное дело. - 2002. - № 5-6. - С. 6-9.
3. Романюк А.М. Гістоморфометричні зміни структурних компонентів кори мозочка за умов впливу на організм солей важких металів /А.М. Романюк, Н.Б. Гринцова //Вісник морфології. - 2007. - № 13 (2). - С. 234.
4. Трахтенберг І.М. Експериментальне дослідження дії важких металів - ртуті, свинцю та марганцю - на розвиток адаптаційних реакцій у щурів різних вікових груп. /І.М. Трахтенберг, В.А. Тичинін, Т.К. Короленко та ін. //Тези доп. 2 з'їзду токсикологів України. - К., 2004. - С. 33.
5. Gosk J.R. The lower extremity nerve injuries own experience in surgical treatment /J.R. Gosk, J.G. Rutowski //Neuropathol. - 2005. - V. 43. - P. 148-152.