

Морфологические исследования действия лекарственных веществ в токсикологии

Л.М. СОКУРЕНКО, д. мед. н.

/Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев/

Резюме

Морфологічні дослідження дії лікарських речовин у токсикології

Л.М. Сокурєнко

Експериментально досліджено застосування антиоксидантів на основі комплексу морфологічних, морфометричних методів і вивчення *in vitro*. Виявлені морфологічні та морфометричні зміни нейронів і нейроглії є проявами неврологічних розладів, що підтверджується даними щодо цитотоксичної дії хлориду ртуті (сулеми) на клітини людини. Найбільшу протекцію при впливі сулеми виявили унітіол та тіотриазолін, а магне-В₆ та мілдронат найменш токсичні в досліді *in vitro*.

Ключові слова: ртуть, нейротоксична дія, культура клітин, цитопатичні зміни клітин, спинномозковий ганглії, чутливий вузол, тіотриазолін, мілдронат, магне-В₆, унітіол, лектини

Summary

Morphological Researches of Medical Drugs Action in Toxicology

L.M. Sokurenko

Application of antioxidants was experimentally investigated using morphological and statistical methods, investigation *in vitro*. The detected changes of neurons and neuroglia reveal neurological disorders and confirm information about cytotoxic action of mercury on human cells. Unitiolum and tiotriazolium demonstrate the most effective protection against the influens of mercury, but magne-B₆ and mildronatum produced the least toxic effects during *in vitro* experiments.

Keywords: mercury, spinal cord, dorsal root ganglion, tiotriazolium, mildronatum, magne-B₆, unitiolum, cells culture, lektin

Стремительный рост промышленности, широкое применение в сельском хозяйстве и быту огромного количества ксенобиотиков приводят к росту острых и хронических интоксикаций у населения, что требует детального изучения их действия и его коррекции [1].

Изучение действия ксенобиотиков заключается в постановке острых, подострых, субхронических и хронических экспериментов с максимально возможным приближением к реальным условиям их влияния на организм, а также изучения протекторных свойств фармакологических средств с соблюдением принципов безопасности и эффективности.

На фоне ежегодного увеличения объема химических веществ, которые влияют на организм человека, увеличивается количество необходимых для исследований животных, при этом важную роль играет экономический фактор, связанный с большим объемом тестируемого материала. Так как почти все токсикологические исследования проводятся на разных видах животных, защитники животных подвергают все большей критике

применение в исследованиях миллионов животных, которые испытывают страдания или чаще – погибают [2]. Именно поэтому исследования, проводящиеся на культуре клеток, являются аль-

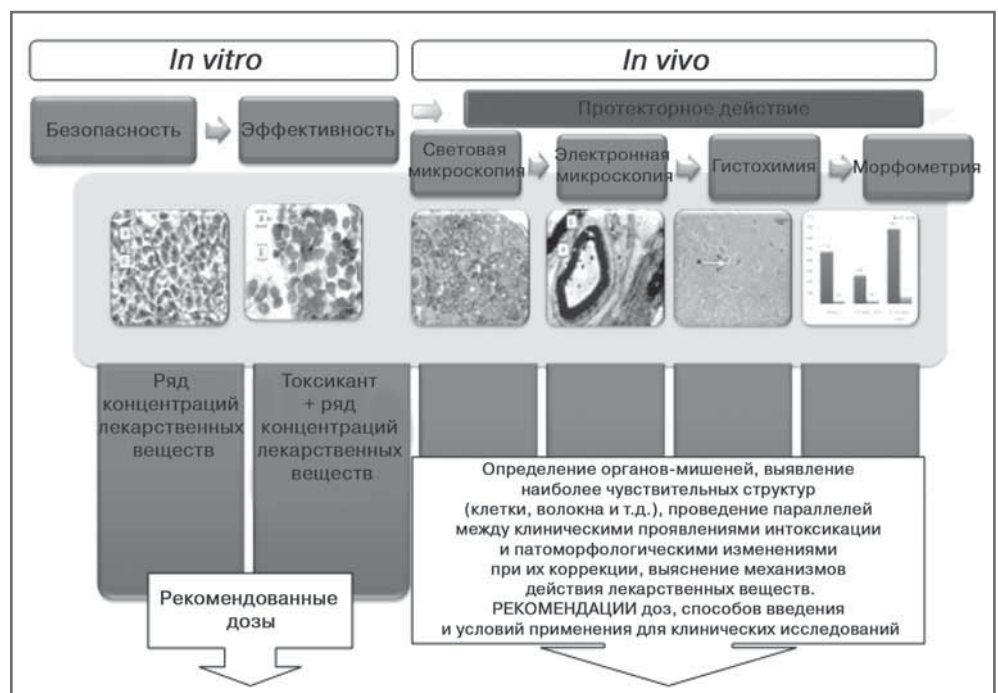


Рис. 1. Схема «ступенчатого» (поэтапного) отбора фармакологических протекторов для коррекции состояния здоровья больных хроническими микротоксикозами

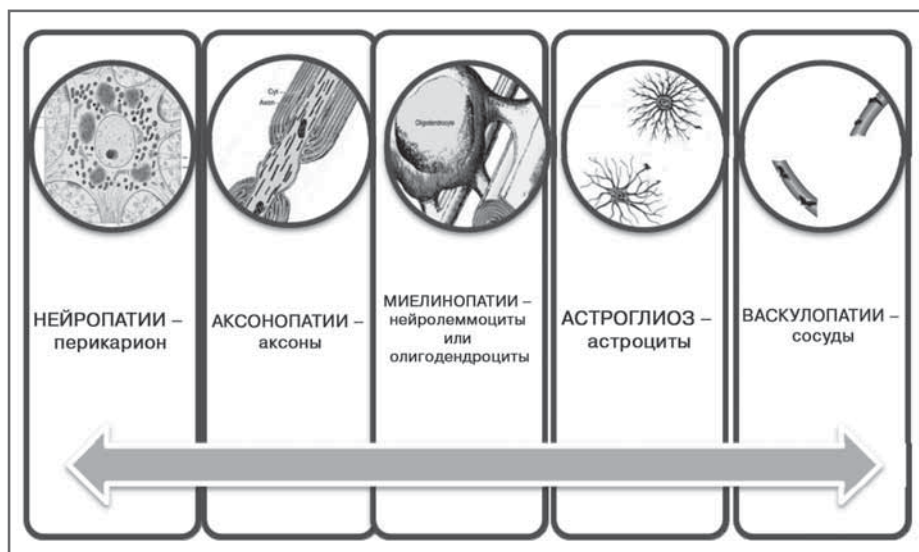


Рис. 2. Классификация нейроинтоксикаций по первичной мишени поражения

тернативной методикой для решения вопросов изучения механизмов действия различных токсикантов, таких как тяжелые металлы, в частности – ртуть [3, 4].

Изучение параметров токсического воздействия ксенобиотиков включает ряд морфологических методов (подходов): скрининг на культурах клеток с последующим применением комплекса гистологических и лектино-гистохимических методов на лабораторных животных, выяснение более глубоких изменений электронно-микроскопическим методом, применение методов анализа для получения доказательной базы.

Концепция «ступенчатого» (поэтапного) отбора фармакологических протекторов для коррекции состояния здоровья больных, подвергшихся хроническому воздействию малых доз токсических веществ, заключается в том, что каждый последующий этап усложняется в методическом плане. Первый этап исследования – скрининг препаратов на моделях микротоксикантов на культурах клетки человека, второй – на лабораторных животных; третий – на людях в условиях клинической токсикологии (рис. 1).

Такое исследование дает возможность определения органов-мишеней, выявления наиболее чувствительных структур (клетки, волокна и т.д.) (рис. 2), проведения параллелей между клиническими проявлениями интоксикации и патоморфологическими изменениями при их коррекции, выяснения механизмов действия лекарственных веществ, а в дальнейшем – рекомендации доз, способов введения и условий применения для клинических исследований.

В процессе разработки концепции фармакологической коррекции было проведено изучение влияния различных веществ при токсических нейропатиях, которые возникают под воздействием малых доз соединений ртути, целью которого был обоснованный поиск лекарственных средств нейропротекторного действия на основании выявления определяющих особенностей изменений структур спинного мозга и чувствительных узлов, а также значения тканевых культур.

Материалы и методы исследования

В работе использован системный подход, который предусматривает применение комплекса нейростологических, лектино-гистохимических и электронно-микроскопических методов, а также исследования *in vitro*, которые дают возможность определить особенности структурных изменений нейронов, глии, микрососудов спинного мозга и чувствительных узлов при токсическом поражении. Применялся компьютерный морфометрический анализ с использованием анализатора изображений и адаптированного программного обеспечения, которое дало возможность обнаружить закономерности возникновения и развития токсических процессов и обнаружить их морфологические характеристики.

Исследования проводились на 120 белых крысах линии Вистар массой 160–180 г. Экспериментальные животные были распределены на 12 групп, разбитых на 6 серий. Животные находились на стандартном рационе.

Изучали афферентные нейроны и их окружение в спинномозговых узлах, поясничные и крестцовые сегменты мотонейронов спинного мозга, которые формируют эфферентный компонент ягодичного нерва и принадлежат ко всем шести нейронным популяциям IX пластины (по Рекседу) серого вещества пояснично-крестцового отдела спинного мозга на уровне L2–S1.

Для **световой микроскопии** срезы спинного мозга получали по общепринятой методике, окрашивали по Нисслю и импрегнировали нитратом серебра по Бильшовскому–Гроссу, с последующим изучением на светооптическом уровне.

Для изучения реактивных изменений нейронов, нейроглии и нервных волокон были избраны следующие показатели: длинный (большой) и короткий (малый) диаметр, периметр, площадь и объем тела и ядер нейронов, объем цитоплазмы и, соответственно, показатели соотношения длинного и короткого диаметров (коэффициент элонгации), объемов ядрышка и ядра, ядерно-цитоплазматическое соотношение (индекс Гертвига). Определяли количество глиоцитов, которые непосредственно граничат с телами нейронов и показатель глиального обеспечения нейрона. Также определяли количество и процентное соотношение светлых и темных нейронов, количество и процентное соотношение глиоцитов, которые непосредственно граничат с телами светлых и темных нейронов, а также неизмененных и патологически измененных миелиновых нервных волокон.

Морфометрическое исследование было проведено с помощью анализатора изображений: микроскопа Olympus Vx51 с цифровой камерой C-4040zoom и персонального компьютера. Измерялись метрические характеристики на базе программного обеспечения UTHSCSA Image Tool® for Windows® (version 2.00) в интерактивном режиме с использованием объектива $\times 40$ и окуляра $\times 10$.

Лектино-гистохимические исследования. Препараты спинного мозга обрабатывали с применением стандартных наборов НПК «Лектинотест» (г. Львов) в разведении лектина (Л) 1:50 согласно методике (Луцик А.Д., 1989). Использованы: лектин касторки (RCA), специфичен к D-галактозе, экранированной сиаловой кислотой; лектин бобчука анагирилистного (LABA), специфичен к L-фуктозе; лектин ландыша (ConA), специфичен к маннозе. Экспрессию рецепторов определяли полуколичественным методом: «-» – отсутствие связывания; «+» – слабое связывание; «++» – умеренное связывание; «+++» – сильное связывание.

Ультрамикроскопическое исследование. Ультратонкие срезы получали по общепринятой методике из небольших фрагментов спинномозговых узлов и спинного мозга на ультратоме LKB-8800 (Швеция) в их продольной и поперечной проекциях, контрастировали 2% раствором уранилацетата в 70–50% этаноле в течение 15 минут, а затем столько же времени азотнокислым свинцом. Срезы изучали и фотографировали в электронном микроскопе ПЭМ 125к и ЭМВ 100б. Исследовали нейроны передних рогов серого вещества спинного мозга и нейроны спинномозговых узлов.

Исследование на клеточных культурах (*in vitro*). Цитотоксическое действие хлорида ртути изучалось методом двукратных серийных разведений на постоянных линиях клеток Imr-32 (нейробластома человека) и U-373 MG (глиобластома человека). Исследуемые клетки культивировались в полной питательной среде в стандартных условиях при образовании клетками на субстрате сплошного монослоя. Чувствительность клеток к действию хлорида ртути в присутствии исследуемых антидотов изучалась по ингибции цитотоксического эффекта ртути при окрашивании клеток трепановым синим, подсчет клеток осуществляли с помощью гемоцитометра. Окрашенные клетки считали с помощью светового микроскопа. Препараты, окрашенные по Романовскому, анализировались под световым микроскопом (Axiostarplus, Carl Zeiss, Германия).

Исследования эффективности применения лекарственных средств проводилось в два этапа: проверялась степень их возможного цитотоксического действия и изучалось их цитопротекторное действие. При этом питательную среду, в которой при стандартных условиях культивировались культуры клеток, заменяли средой, которая содержала разные концентрации исследуемых препаратов: Тиотриазолина и комбинацию магния и пиридоксина (препарат Магне-В₆) (1,0; 0,1; 0,01; 0,001 мг/мл), димеркапрол (препарат Унитиол) и триметилгидразиния пропионат (препарат Милдронат) (10,0; 1,0; 0,1; 0,01 мг/мл) и концентрации хлорида ртути (II) 20,0 мкм/мл для U-373 и 10,9 мкм/мл для Imr-32, которые были определены как IC50. В качестве контроля была культура клеток, содержащая в питательной среде соответствующую концентрацию хлорида ртути, а также культура без добавления в среду химических соединений. Для повышения объективной оценки полученных результатов разработаны такие показатели, как процентное содержание клеток, индексы цитопатических изменений и индексы пролиферации. В связи с тем, что происходило деление живых и разрушение мертвых клеток, определяли такие средние показатели: процентное содержание живых (нейробластов и нейроглиобластов) клеток, индексы цитопатических изменений по мертвым и по живым клеткам, индексы

пролиферации по мертвым, по живым клеткам и по общему количеству клеток.

Статистическую обработку результатов измерений структур спинного мозга и чувствительных узлов, а также результатов исследований *in vitro* проводили с использованием пакета статистических программ Statistica 4.0 (Statistica Inc. США), Biostat и MS Excel. Отличия между группами устанавливали, используя параметрический критерий t-Стюдента и непараметрический критерий Манна-Уитни-Вилкоксона. Достоверными считали отличия с уровнем значимости >95% ($p < 0,05$) [5, 6].

Результаты и их обсуждение

Морфология. Протекция лекарственными средствами токсического влияния малых концентраций ртути ведет к усилению репаративных процессов в чувствительном узле животных после кратковременной экспозиции, а после длительной экспозиции происходит в разной степени коррекция процессов декомпенсации.

Морфологические изменения спинного мозга. В условиях применения препаратов Унитиол, Тиотриазолин, Магне-В₆ и Милдронат после кратковременной экспозиции происходит активация синтетических процессов, которая проявляется смещением ядрышка к ядерной оболочке и увеличением его в размерах, более упорядоченным концентрическим размещением гранул хроматофильной субстанции вокруг ядра; а после длительной экспозиции происходит стабилизация синтетических процессов, которая проявляется упорядоченностью хроматофильного вещества и централизацией ядрышка. Эти изменения имеют разную степень выраженности при действии разных лекарственных веществ. Наиболее интенсивные изменения проявляются после применения Унитиола и Тиотриазолина, менее выраженные – после использования Магне-В₆ и Милдроната.

Данные морфометрического исследования при кратковременном влиянии лекарственных средств свидетельствуют об уменьшении токсических проявлений, нивелировке адаптационных и компенсаторных изменений в нейронах: уменьшении размеров тел, ядер и ядрышек нейроцитов и глиоцитов, нейроглиального соотношения, количества глиоцитов на один нейрон и показателя глиального обеспечения нейронов, в отличие от длительной экспозиции, при которой отмечается увеличение соотношения средних объемов ядра и ядрышка, коэффициентов элонгации, перикарионов и ядер. Так, индекс Гертвига при условии применения Унитиола и Магне-В₆ значительно превышает показатели контроля и группы с интоксикацией; при влиянии Тиотриазолина и Милдроната – почти достигает нормы. При применении Тиотриазолина растут размеры ядрышек мотонейронов.

Структурные изменения спинного мозга при длительной экспозиции в условиях коррекции фармакологическими препаратами можно расценить как проявление интенсивных восстановительных процессов, которые заключаются в повышении морфометрических показателей перикарионов и глиоцитов. При этом соотношения ядрышка и ядра также растут, но в меньшей степени, чем после кратковременной экспозиции. Это связано с компенсаторной реакцией нейрона, которая направлена на увеличение площади поверхности ядра в связи с активацией синтети-

ческих процессов, необходимых для синтеза группы белков, принимающих участие в восстановлении поврежденных структур нейрона. При условии применения Тиотриазолина, Магне-В₆ и Милдроната коэффициент соотношения ядрышка и ядра существенно меньше, чем после кратковременной экспозиции. Морфометрическая картина изменений мотонейронов спинного мозга и окружающих их глиоцитов свидетельствует о большей степени их выраженности в условиях микромеркуриализма под воздействием Тиотриазолина, Магне-В₆ и Милдроната, которая проявляется уменьшением коэффициентов элонгации перикарионов и ядер. Показатель глиального обеспечения нейронов увеличивается и превышает значение контроля и групп после кратковременной экспозиции и применения фармакологической протекции. Однако наибольшие значения характерны для Тиотриазолина и Магне-В₆, менее выражены – для Унитиола и Милдроната. Это свидетельствует об активной роли глии в процессах фармакологической коррекции микромеркуриализма.

Изменения в чувствительных узлах при фармакологической коррекции микромеркуриализма Унитиолом, Тиотриазолином и Магне-В₆ демонстрируют достоверный рост количества светлых нейронов и нейроглии вокруг них на ранних стадиях, что свидетельствует об активной синтетической деятельности (рис. 3), в меньшей степени такие тенденции проявляются на поздних стадиях. Протекторное действие Милдроната определяется снижением коэффициента соотношения светлых нейронов чувствительных узлов крыс по сравнению с группами без фармакологического влияния и после кратковременной экспозиции – достоверным ростом коэффициента соотношения нейроглии вокруг светлых нейронов, что свидетельствует об улучшении гемодинамики в сосудах, антиоксидантном, антиишемическом, эрготропном эффектах, активизирует синтез белков. Эти результаты коррелируют с данными литературы, где еще отмечается повышение эластичности эритроцитов, гиполлипидемическое, вазодилатирующее и противоотечное действие Милдроната [7].

Анализ изменений в структуре чувствительных узлов животных, длительно экспонированных хлоридом ртути, показал, что введение Тиотриазолина способствует уменьшению проявлений интоксикации и появлению процессов компенсации в светлых и темных нейронах аналогично ранним стадиям патологического процесса.

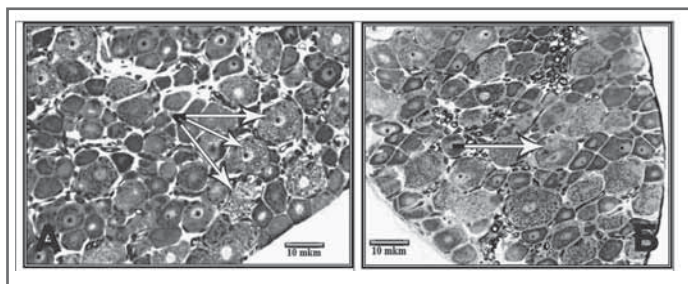


Рис. 3. Чувствительный узел после кратковременной (А) и долговременной (Б) экспозиции хлоридом ртути при действии Унитиола. Микрофото. Об. $\times 20$. А – рост количества светлых нейронов (стрелка). Б – светлые нейроны с незначительным явлением хроматоза (стрелка)

Коэффициент отношения количества нормальных миелиновых нервных волокон к группам без действия лекарственного средства достоверно растет в условиях применения Унитиола в 1,2 и 1,4 раза, Тиотриазолина – в 1,3 и 1,5 раза, Магне-В₆ – в 1,4 и 1,3 раза, Милдронат – в 1,2 и 1,3 раза. Отмеченные изменения свидетельствуют о снижении токсичных проявлений металла на нервные волокна чувствительных узлов при условии применения лекарственных средств на фоне развития ртутной интоксикации, особенно Тиотриазолина и Магне-В₆.

При использовании препарата Унитиол патологические изменения проявляются повышением нейроглиального соотношения светлых нейроцитов и коэффициента соотношения ядра и ядрышка светлых мотонейронов по сравнению с группой без фармакологического влияния. При этом коэффициент соотношения ядра и ядрышка и нейроглиальное соотношение темных мотонейронов остается статистически идентичным показателю опытов при отсутствии применения протекции. Это свидетельствует о нивелировании интоксикационных повреждений, адаптационных и компенсаторных изменений в светлых и в большей степени – темных нейронах. Все эти результаты подтверждают данные литературы относительно вытеснения Унитиолом ртути из тиоловых ферментов [8], однако полного ее вытеснения при этом не происходит [9].

При изучении действия Тиотриазолина наблюдаются те же тенденции изменения морфометрических показателей, позитивного влияния Тиотриазолина на гемодинамику в сосудах головного мозга [10] и нейропротекторного действия в период острого мозгового инсульта [11, 12].

Протекторное введение Магне-В₆ сдерживает токсическое влияние металла на морфометрические показатели нейронов чувствительных узлов в большей степени, чем при условии применения универсального антидота Унитиола. При этом наблюдается снижение морфометрических показателей тел и ядер светлых нейроцитов, индекс Гертвига светлых нейроцитов повышается, значение средних показателей ядрышек светлых нейронов становится меньше, коэффициент соотношения ядра и ядрышка светлых нейронов достоверно меньше, чем у интактных животных; средние морфометрические показатели перикарионов, ядер и ядрышек темных нейроцитов также становятся меньше по сравнению с группой без использования фармакологических препаратов, приближаются при этом к норме. Индекс Гертвига темных нейронов снижается.

При субхроническом эксперименте эти проявления выражены значительно сильнее. Эффект Магне-В₆ предопределен нейропротекторным влиянием на биоэнергетические и пластические процессы, высокой антиоксидантной активностью за счет мембраностабилизирующего действия и уменьшения высвобождения глутамата, а также вступления в неконкурентный антагонизм на уровне NMDA-рецепторов. Данные литературы свидетельствуют, что Магне-В₆ играет важную роль в основных процессах метаболизма и благоприятно влияет на ЦНС [13].

Проведенные наблюдения морфометрических изменений свидетельствуют о том, что применение препарата Милдронат не демонстрирует выраженную антитоксическую активность, в отличие от других лекарственных средств, но положительно влияет на динамику восстановительных процессов. При кратко-

временной экспозиции наблюдается уменьшение морфометрических показателей тел и ядер светлых и темных нейроцитов в отличие от показателей животных в группах без применения фармакопротекции – индекс Гертвига обоих типов мотонейронов статистически достоверно больше контроля. После длительной экспозиции наблюдается увеличение морфометрических показателей перикарионов и ядер светлых и темных нейроцитов, морфометрические показатели изменений ядрышек темных и светлых мотонейронов чувствительных узлов крыс статистически достоверно больше, чем во всех группах сравнения, а в светлых клетках значения ядрышек достигают значений контроля.

Лектино-гистохимическое исследование спинного мозга крыс, экспонированных хлоридом ртути, при применении препарата Унитиол демонстрирует сильную связь нейронов и нейроглии с лектинами LABA и ConA на ранних сроках исследования, а на поздних – среднюю (рис. 4). Лектины LABA имеют высокое сродство к сосудам гемомикроциркуляторного русла. Для рецепторов RCA характерен низкий уровень связывания на обоих сроках экспозиции. Это можно рассматривать как рост синтетических процессов при субхроническом действии хлорида ртути и восстановительных процессов при хроническом его действии, а также свидетельство высокой активности сосудов.

Препарат Тиотриазолин имеет похожий эффект действия, однако демонстрирует среднюю связь с нейроглией после кратковременной экспозиции, что можно трактовать как преобладание синтетической активности в нейронах.

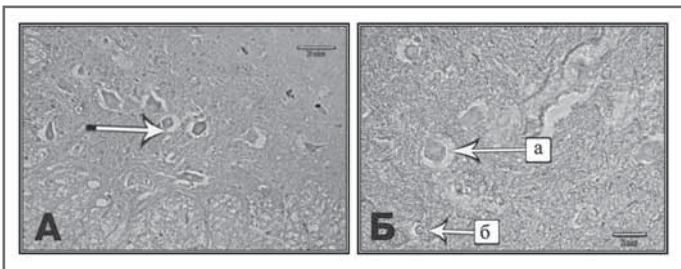


Рис. 4. Мотонейроны (а) и глиоциты (б) спинного мозга. Лектино-гистохимия (Laba). Ок. $\times 40$. А – сильная связь после кратковременной экспозиции хлоридом ртути при условии влияния Унитиола. Перикарикулярный отек (стрелка). Средняя связь после кратковременной (А) и долговременной (Б) экспозиции хлоридом ртути при действии Унитиола

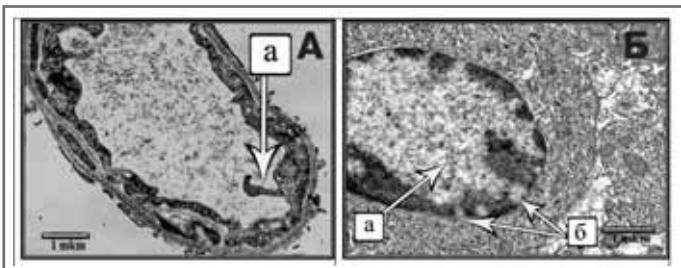


Рис. 5. Передние рога спинного мозга после кратковременной (А) и долговременной (Б) экспозиции хлоридом ртути при действии Унитиола. Электроннограмма. А – эндотелиоциты сосудов микроциркуляторного русла с цитоплазматическими отростками на люминальной поверхности (а). Ув. 1500. Б – активация хроматина (а) и ядерных пор (б) в мотонейронах. Ув. 1600

При влиянии препарата Магне-В₆ интенсивные восстановительные процессы проявляются сильной связью лектинов рицины и конковалина А с нейронами и нейроглией после кратковременной экспозиции. Средней интенсивности связь характерна для лектина золотого дождя. При длительной экспозиции характерна средняя интенсивность связывания нейронов и сильная – для нейроглии, которая свидетельствует о преобладании синтетических процессов в глиоцитах.

При субхроническом исследовании при условиях применения препарата Милдронат определяется сильная интенсивная

Таблица. Гистотопография лектинов в структурах спинного мозга крыс

Структуры	Название лектина					
	2 недели			10 недель		
	ConA	LABA	RCA	ConA	LABA	RCA
Интактные крысы						
Нейроны	+++	+++	++	+++	+++	++
Нейроглия	+++	++	++	+++	++	++
Миелиновые нервные волокна	+	+	++	+	+	++
Сосуды	++	+++	++	++	+++	++
Экспозиция хлоридом ртути						
Нейроны	+	++	+	+	++	+
Нейроглия	+	++	+	+	+	+
Миелиновые нервные волокна	+	+	+	+	+	+
Сосуды	+	+	+	+	+	+
Экспозиция хлоридом ртути и действие Унитиола						
Нейроны	+++	+++	+	++	++	+
Нейроглия	+++	+++	+	++	++	+
Миелиновые нервные волокна	+	++	+	+	+	+
Сосуды	+	+++	+	++	+++	+
Экспозиция хлоридом ртути и действие Тиотриазолина						
Нейроны	+++	+++	++	++	++	+
Нейроглия	+++	+++	++	+++	+++	+
Миелиновые нервные волокна	+	++	+	+	++	+
Сосуды	+	+++	+	+	++	+
Экспозиция хлоридом ртути и действие Магне-В₆						
Нейроны	+++	++	+++	++	++	++
Нейроглия	+++	++	+++	+++	+++	+++
Миелиновые нервные волокна	++	+	++	+	+	+
Сосуды	++	+	++	+	+	+
Экспозиция хлоридом ртути и действие Милдроната						
Нейроны	+++	+++	+++	++	++	++
Нейроглия	+++	+++	+++	++	++	++
Миелиновые нервные волокна	++	++	++	+	+	+
Сосуды	++	++	++	++	++	++

Примечания: + слабое связывание; ++ умеренное связывание; +++ сильное связывание с лектином.

реакция нейронов и нейроглии с рецепторами всех лектинов, а в хроническом эксперименте определяется средняя по интенсивности реакция, которая свидетельствует о вовлечении в восстановительные процессы всех видов углеводных рецепторов. Данные показатели представлены в таблице.

Ультраструктурное исследование демонстрирует, что протекция антиоксидантами токсического влияния малых концентраций ртути ведет к усилению репаративных процессов в ткани спинного мозга животных, которые наблюдаются после кратковременной экспозиции.

Под воздействием монопротекции лекарственными средствами наблюдаются признаки обратимых компенсаторных реакций на ранних сроках исследования, более интенсивные при действии Унитиола и Тиотриазолина (рис. 5). При длительной экспозиции на фоне деструктивных и дистрофических изменений в спинном мозге наблюдаются явления регенерации. Причем явления активации синтетических процессов при условии применения одного лекарственного средства характерны для длительных сроков исследования. Достаточно интенсивные синтетические процессы наблюдаются при условии применения Милдроната: активируются ядерные поры и хроматин. Милдронат способствует активации синтеза белков (ферментов). Исследования показали, что этот препарат индуцирует биосинтез и активность Ca^{2+} -АТФ-азы, гексокиназы и пируватдегидрогеназы саркоплазматического ретикулаума [14].

В условиях моделирования микромеркуриализма в чувствительных узлах подопытных животных возникают деструктивные нарушения в нейронах и нейроглии, сосудах микроциркуляторного русла и нервных волокнах.

После кратковременной экспозиции наблюдаются процессы компенсаторных изменений, направленных на вовлечение внутренних резервов с целью восстановления функционального состояния, а после длительной – процессы декомпенсации.

Протекция лекарственными средствами токсического влияния малых концентраций ртути ведет к усилению репаративных процессов в ткани чувствительных узлов животных после краткой экспозиции, а после длительной экспозиции происходит коррекция процессов декомпенсации, однако с разной степенью выраженности.

Влияние препаратов Унитиол и Тиотриазолин в течение эксперимента, а также Магне-В₆ на ранних стадиях характеризуется появлением новообразованных миелиновых волокон (рис. 6). Действие Магне-В₆ и Милдроната отличаются более интенсивным стимулированием белоксинтезирующих процессов, которое заключается в превалировании эухроматина и активации ядерных пор.

Культура. Поскольку при исследовании фармакологических препаратов руководствуются принципами эффективности, безопасности и доступности, первые два легли в основу изучения их действия на культуры клеток нейрогенного происхождения, в то время как последним авторы исследования руководствовались при их отборе. При изучении клеток линии U-373-MG в условиях применения препарата Унитиол наблюдается достаточно широкий диапазон безопасности от 1,0 до 0,01 мг/мл, Тиотриазолин и Магне-В₆ в концентрации 0,1–0,01 мг/мл являют собой золотую середину. Наибольший процент живых клеток, который равен

контролю, наблюдается при действии концентрации Унитиола 0,01 мг/мл, однако наибольший индекс пролиферации определяется при концентрации 0,1 мг/мл, причем индекс пролиферации для живых клеток одинаков для обеих доз. Оптимальные значения проявления безопасности действия препарата Милдронат на культуру клеток линии U-373-MG наблюдаются в диапазоне концентраций от 10,0 до 0,01 мг/мл.

При экспозиции хлоридом ртути и монопротекции полной защиты клеток при условиях применения лекарственных средств не происходило. Наилучшие значения индексов цитопатических изменений и пролиферации клеток линии U-373-MG выявляются при действии Унитиола в концентрации 0,1 мг/мл (рис. 7, 8). Наибольший процент живых клеток и индекс цитопатических изменений наблюдается при концентрации Тиотриазолина 0,1 мг/мл. Однако наибольший индекс пролиферации определяют в концентрациях 1,0 мг/мл и 0,1 мг/мл. Наибольший процент живых клеток и индекс цитопатических изменений клеток линии U-373-MG с моделированием токсического влияния хлорида ртути наблюдается при концентрациях Магне-В₆ 0,1 мг/мл и 0,001 мг/мл. Наибольший индекс пролиферации живых клеток определяется при концентрации Магне-В₆ 0,1 мг/мл и 0,001 мг/мл, а при последней концентрации – существенно меньше индекс пролиферации по мертвым клеткам. При воздействии Милдроната в условиях экспозиции хлоридом ртути клеток линии U-373-MG наблюдаются цитопротекторные свойства препарата в дозах 10–0,01 мг/мл. Наибольшие значения процентного соотношения живых клеток

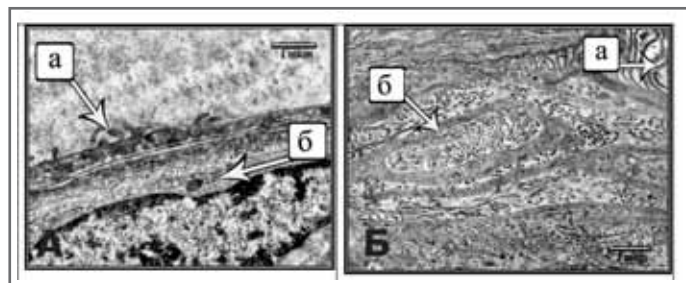


Рис. 6. Чувствительный узел после кратковременной (А) и длительной (Б) экспозиции хлоридом ртути при действии Унитиола. Электроннограмма. А – капилляр с большим количеством цитоплазматических отростков (а) на поверхности эндотелия и лучшей сохранностью органелл (б). Ув. 1100. Б – миелиновые нервные волокна с повреждением структуры на слоев миелина (а) и с сохраненной структурой (б). Ув. 1500

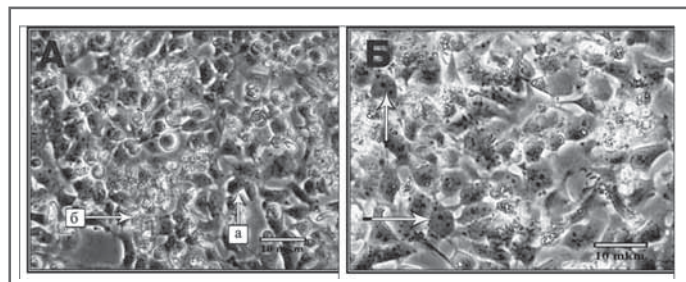


Рис. 7. Клетки линии Img-32 при действии 0,01 мг/мл Унитиола без (А) и при экспозиции хлоридом ртути (Б). Неокрашенный препарат живой культуры. Микрофотография. Об. $\times 32$. А – неплотно размещенные клетки (а) с одним или несколькими отростками и разрушенные клетки (б). Б – превалирование живых клеток с одним или несколькими отростками

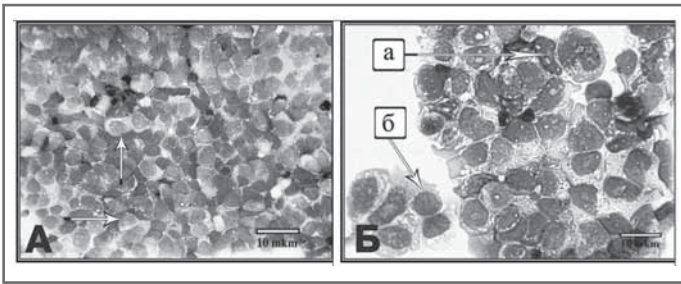


Рис. 8. Клетки линии Imr-32 при действии 0,01 мг/мл Унитиола без (А) и при экспозиции хлоридом ртути (Б). Окраска по Романовскому–Майн–Грюнвальду. Микрофотография. Об. $\times 40$. А – превалирование больших светлых клеток (стрелки). Б – большие округлые клетки (б) и мелкие базофильные клетки с крупными ядрами (а)

и индексов цитопатических изменений по живым и мертвым клеткам наблюдаются при концентрации Милдроната 0,1–10 мг/мл.

Таким образом, Унитиол и Тиотриазолин обеспечивают безопасность и эффективность их влияния на клетки линии U-373-MG в концентрации 0,1 мг/мл, а Магне-В₆ – 0,001 мг/мл, что дает возможность рекомендовать их применение именно в этой концентрации. Препарат Милдронат показал безопасность и эффективность при влиянии на клетки линии U-373-MG в концентрации 10,0 мг/мл и меньше.

При исследовании культуры клеток линии Imr-32 при условии применения препарата Унитиол определяется безопасность в диапазоне 0,1–0,01 мг/мл, Тиотриазолина и Магне-В₆ – в диапазоне 1,0–0,001 мг/мл, Милдроната – в диапазоне 10,0–1,0 мг/мл. Для этих концентраций наблюдались наилучшие значения показателей цитопротекторных свойств, индексов цитопатических изменений и индексов пролиферации клеток линии Imr-32.

Наилучшие значения цитопротекторных свойств, индексов цитопатических изменений и индексов пролиферации показаны при концентрации Унитиола 0,01 мг/мл, но они не имели 100% безопасности. Индексы пролиферации клеток линии Imr-32 достоверно более высоки в опыте с дозой 0,01 мг/мл. Влияние Тиотриазолина при экспозиции хлоридом ртути в культуре клеток линии Imr-32 наблюдается в широком диапазоне от 1,0 до 0,001 мг/мл. Наивысший процент живых клеток, индекс цитопатических изменений наблюдается при концентрации Тиотриазолина 0,1–0,01 мг/мл. Магне-В₆ при экспозиции хлоридом ртути культуры клеток линии Imr-32 в концентрации 0,1–0,01 мг/мл определял наилучшие показатели цитопротекторных свойств и цитопатических изменений. Наилучшие значения показателей цитопротекторных свойств, индексов цитопатических изменений были определены для препарата Милдронат в диапазоне 1,0–0,01 мг/мл, а наибольшие индексы пролиферации – в концентрациях 0,1–0,01 мг/мл. В связи с тем, что Милдронат является обратимым (конкурентным) регулятором окисления жирных кислот, он отличается исключительно низкой токсичностью. При пероральном применении у крыс его Ld50 превышает 25 000 мг/кг, при внутривенном введении – Ld50 >12 500 мг/кг [15]. Препарат не оказывает канцерогенного, мутагенного, тератогенного или эмбриотоксического действия.

Таким образом, Унитиол и Магне-В₆ демонстрируют безопасность и эффективность при влиянии на клетки линии Imr-32 в концентрации 0,01 мг/мл, а Тиотриазолин – в концентрации 0,1 мг/мл.

Влияние Милдроната было безопасным и эффективным на клетки линии Imr-32 в концентрации 10,0–1,0 мг/мл.

Выводы

1. Для более обоснованного поиска лекарственных средств цитопротекторного действия по разработанной авторами схеме на примере морфологического исследования действия хлорида ртути (сулемы) при проведении нейротоксикологических исследований рекомендуется комплексное экспериментальное изучение патологии химического генеза.
2. При токсиколого-гигиеническом изучении солей металлов и оценке средств цитопротекции целесообразно применение как токсикологических, так и морфологических методов изучения культур клеток человека. Это может обеспечить оперативность оценки и надлежащую информативность данных относительно этих потенциально опасных для здоровья человека ксенобиотиков и поиска средств, которые проявляют протекторную активность относительно их патогенного действия, что будет способствовать не только обоснованному сокращению использования в экспериментах лабораторных животных, но и корреляции результатов полученных *in vivo* и *in vitro*.
3. Сравнительный анализ результатов проведенных экспериментов свидетельствует, что наиболее выраженное протекторное действие проявили Унитиол и Тиотриазолин, а наибольшую безопасность в опытах *in vitro* – Магне-В₆ и Милдронат.

Литература

1. Трахтенберг И.М. Морфологические аспекты патогенеза ртутной интоксикации (обзор литературы) / И.М. Трахтенберг, Ю.Б. Чайковский, Л.М. Сокуренок // Современные проблемы токсикологии. – 2008. – №1. – С. 11–17.
2. Дейнека С.Е. Токсиколого-гігієнічні аспекти застосування методу культури клітин при комплексному вивченні сполук металів та оцінці засобів цитопротекції: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – К., 2000. – 33 с.
3. Хейли Бойд Э. Токсичность ртути: генетическая предрасположенность и синергические эффекты // Medical Veritas. – 2005. – №9. – P. 535–542.
4. Kaur P. Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes / Kaur P., Aschner M., Svendsen T. // NeuroToxicology. – Vol. 27, Is. 4. – P. 492–500.
5. Мінцер О.П. Оброблення клінічних і експериментальних даних у медицині / О.П. Мінцер, Ю.В. Вороненко, В.В. Власов. – К.: Вища школа, 2003. – 350 с.
6. Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных / М.Ю. Антомонов – К., 2006. – 558 с.
7. Чеботарьова Л.Л. Застосування низькоенергетичних електромагнітних впливів при діабетичних поліневропатіях / Л.Л. Чеботарьова, Г.Є. Чеботарьов // Фізіол. журн. – 2003. – Т. 49, №2. – С. 85–90.
8. Машковский М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский. – Харьков: Торгсин, 1997. – Т. 2. – С. 212–213.
9. A cluster of pediatric metallic mercury exposure cases treated with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) / J. Forman, J. Moline, E. Cernichiaro [et al.] // Environ. Health Perspect. – 2000. – Vol. 108 (6). – P. 575–577.
10. Білоус І.І. Клініко-патогенетичне обґрунтування застосування мідронату та тіотриазоліну в комплексному лікуванні хворих на діабетичну полінейропатію: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: спец. 14.01.15 / І.І. Білоус. – К., 2004. – 22 с.
11. Беленичев И.Ф. Молекулярный механизм энерготропного и антиоксидантного действия Тиотриазолина / И.Ф. Беленичев, И.А. Мазур, И.С. Чекман // Ліки. – 2006. – №3, 4. – С. 12–16.
12. Метаболіто-тропні препарати / И.А. Мазур, И.С. Чекман, И.Ф. Беленичев [и соавт.]. – Запорожье, 2007. – 303 с.
13. Бурчинский С.Г. Проблема дефицита магния в организме: методы фармакологической коррекции / С.Г. Бурчинский // Здоровье Украины. – 2005. – 2 апреля. – С. 5–6.
14. Коновалов С.В. Порівняльний вплив триметазидіну, мідронату, кардонату на дисфункцію міокарда та дисперсію інтервалу Q–T у хворих на шемічну хворобу серця / С.В. Коновалов, В.К. Серкова // Ліки України. – 2005. – №11. – С. 106–109.
15. Білоус І.І. Клініко-патогенетичне обґрунтування застосування мідронату та тіотриазоліну в комплексному лікуванні хворих на діабетичну полінейропатію: автореф. дис. ... канд. мед. наук: спец. 14.01.15 / І.І. Білоус. – К., 2004. – 22 с.