

Е.А. Титов, Л.М. Соседова, Н.Л. Якимова

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К МОДЕЛИРОВАНИЮ ТОКСИЧЕСКОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ С ПОЗИЦИИ МОРФОМЕТРИИ. СООБЩЕНИЕ 2****Ангарский филиал Восточно-Сибирского научного центра экологии человека СО РАМН – Научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека (Ангарск)**

Представлены токсико-гигиенические подходы к экспериментальному моделированию ртутной энцефалопатии. Указаны способы и сроки воздействия неорганическими соединениями ртути на белых крыс, методы обследования, включающие зоны с указанием координат для гистологического исследования. Предложенные методические подходы дают возможность изучить особенности и закономерности патологического процесса в ЦНС, для поиска патогенетически обоснованных критериев диагностики, эффективных методов терапии и профилактики отдаленных эффектов ртутной нейротоксикации.

**Ключевые слова:** экспериментальное моделирование, неорганические соединения ртути, белые крысы, методические подходы

**METHODICAL APPROACHES TO MODELLING THE TOXIC ENCEPHALOPATHY FROM STANDPOINT OF MORPHOMETRY (INFORMATION 2)**

E.A. Titov, L.M. Sosedova, N.L. Yakimova

**Angarsk Branch of East Siberian Scientific Center of Human Ecology SB RAMS – Scientific Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, Angarsk**

The toxic-hygienic approaches to experimental modeling the mercury induced encephalopathy are represented in this paper. The procedures and the exposure time periods to the inorganic mercury compounds of the albino rats as well as the examination methods including the zones with indicating the coordinates for histological studies are listed. The methodical approaches offered may give a possibility to study the peculiarities and the regularities of the pathological process in the central nervous system in search of the pathogenetically grounded diagnostics criteria as well as of the effective methods of the therapy and the prevention of the long-lasting effects of the mercury induced neurointoxication.

**Key words:** experimental, modeling, inorganic mercury compounds, albino rats, methodical approaches

Одним из наиболее важных направлений гигиенических исследований является разработка методических подходов к изучению закономерностей действия того или иного фактора на организм человека с целью обоснования патогенетического лечения и реабилитации больных. С этих позиций, методические подходы к моделированию нейротоксикации неорганическими соединениями ртути — НСР дадут возможность изучить особенности и закономерности патологического процесса в ЦНС, нейровизуализация позволит прицельно выявлять точки формирования нарушений в нервной ткани и прогнозировать дальнейшее течение интоксикации, что, в конечном итоге, направлено на решение актуальных вопросов поиска патогенетически обоснованных критериев диагностики, эффективных методов терапии и профилактики отдаленных эффектов ртутной нейротоксикации. В целом биомоделирование дает основание управлять механизмами формирования патологических процессов при воздействии ртути на организм человека.

В клинике Ангарского филиала ВСНЦ ЭЧ СО РАМН за последнее десятилетие накопилось достаточно данных клинического обследования работающих с диагнозом хроническая ртутная интоксикация — ХРИ. Однако ежегодная реабилитация и лечение таких больных дают видимое улучшение

состояния здоровья лишь на короткий срок. Учитывая, что изучение динамических морфофункциональных нарушений структуры нервной ткани, уровня метаболизма нервных клеток и процессов взаимодействия нейроглиальной единицы при воздействии производственных нейротоксикантов возможно только в экспериментальных условиях, возникла необходимость исследования патологических процессов, происходящих в ткани головного мозга при биомоделировании ртутной энцефалопатии на экспериментальных животных.

Для изучения общих закономерностей влияния ртути на ЦНС и решения вопросов нейровизуализации патологического процесса нами разработаны методические подходы к экспериментальному моделированию нейротоксикации неорганическими соединениями ртути [7], которые включали следующие этапы:

1. Осуществление ингаляционной затравки животных парами металлической ртути, как наиболее распространенного пути поступления ртути в организм. Или проведение парентеральной затравки сулемой для сравнительного исследования закономерностей и особенностей действия неорганических соединений ртути на организм животных в зависимости от пути введения и химической формы вещества. Обследование выполняется сразу и спустя 2 месяца после окончания экспозиции, для

выявления отдаленных эффектов нейротоксикации и связанных с ней нарушений головного мозга на тканевом, клеточном и субклеточном уровне. Концентрации вводимых химических веществ должны быть достаточно высокими, что обусловлено необходимостью формирования выраженного патологического процесса в ЦНС с выявлением и объективной регистрацией патологических изменений в относительно позднем постконтактном периоде, а также изучения патофизиологических механизмов прогрессивного течения. Эффекты нейротоксичности должны проявляться в течение длительного времени, в том числе и через 2 месяца после окончания воздействия, что соответствует 8–10 годам жизни человека [9, 10].

2. Исследование целостного поведения крыс и результатов биоэлектрической активности коры головного мозга (ЭЭГ). Регистрируют ориентировочно-исследовательское и эмоциональное поведение, рабочую память животных и тревожно-депрессивное состояние, зоосоциальное поведение, когнитивные способности по результатам выработки условных рефлексов, состояние мышечного тонуса и равновесия [2, 10]. Анализируют изменения следующих показателей спектров ЭЭГ: общая мощность спектра ЭЭГ, абсолютная мощность разных диапазонов спектра, изменение мощности ритмов в ответ на фотостимуляцию и зрительные вызванные потенциалы — ЗВП. Для анализа коркового ответа на ЗВП применяют общепринятые приемы описания амплитуды и латентности пиков вызванного ответа, начала ответа, и продолжительности всего потенциала.

3. Нейровизуализация нарушений в ткани головного мозга белых крыс. Для морфологического исследования используют послойные серийные срезы ткани головного мозга с шагом в 5 микрон: фронтальные срезы от Bregma 1.60 до Bregma —14.60, сагитальные от Lateral 0.40 до Lateral 4.60, горизонтальные от Bregma —3.10 Interaural 6.90 до Bregma —9.60 Interaural 0.40. Обследуют сенсомоторную кору головного мозга в височно-теменной и затылочной долях, а также мозжечок. Для выполнения обзорной микроскопии препараты окрашивают: гематоксилин-эозином, раствором тионина по Ниссля, пикрофуксином по Ван-Гизону. Для изучения ультраструктуры нервной ткани проводят электронную микроскопию нейронов коры головного мозга с выполнением морфометрии. Для выявления экспрессии нейроспецифических белков: кислого фибриллярного глиального протеина — GFAP, S100 и нейронспецифической енолазы — NSE выполняют иммуногистохимическое обследование [8].

Сопоставление полученных результатов экспериментального моделирования ртутной энцефалопатии с данными клинического обследования больных с диагнозом ХРИ, в том числе и ртутной энцефалопатией свидетельствовало об аналогичной направленности выявленных нарушений. Анализ целостной структуры видоспецифического поведения белых крыс с ртутной интоксикацией при

динамическом наблюдении показал нарушения высших интегративных функций головного мозга, нарастающие с течением времени постконтактного периода: снижение локомоторной активности, угасание ориентировочно-исследовательских реакций, усиление эмоциональной негативности, тревожности и внутривидовой агрессивности, изменение мышечного тонуса, нарушение выработки условного пищедобывательного рефлекса дифференцировки освещенности [9, 10]. Профессиональная ртутная интоксикация на ранней стадии ее развития проявлялась расстройством когнитивных функций — кратковременной, долговременной, зрительной памяти, концентрации и продуктивности внимания, снижением работоспособности и темпа психомоторной деятельности, во взаимосвязи с легко выраженными нарушениями эмоционально-личностной сферы. В отдаленном периоде происходило утяжеление перечисленной выше симптоматики и диагностированы умеренно выраженные и выраженные нарушения когнитивной и эмоционально-личностной сфер с формированием расстройства личности по органическому типу [3, 4, 5]. Возможно, при длительном воздействии ртути вначале повышается возбудимость коры больших полушарий за счет ослабления внутреннего активного торможения, а затем возникает инертность корковых процессов. В дальнейшем при развитии признаков хронической ртутной интоксикации нарушаются нормальные силовые взаимоотношения и развивается запредельное торможение, преимущественно, верхних слоев коры больших полушарий, входящих в систему ассоциативных волокон коры [3].

На наш взгляд, выявленные, как в эксперименте, так и при клиническом обследовании изменения, могут быть связаны с нарушением метаболизма в нервной ткани, что проявлялось увеличением площади ядер и расширением перинуклеарного пространства нейронов, стойким сокращением площади митохондрий в нейронах, свидетельствующих в совокупности о развитии дистрофических процессов в нервной ткани [6]. Снижение когнитивных функций и долговременной памяти у больных также, возможно, связано с нарушениями в структуре гиппокампа, вызванными действием неорганических соединений ртути и выраженной демиелинизацией отростков нервных клеток, нарастающей в отдаленном периоде интоксикации парами металлической ртути. Особого внимания заслуживает выявленный факт сокращения плотности нормальных неизмененных нейронов на единицу площади коры головного мозга, обусловленное их гибелью и сохраняющееся в отдаленном периоде. При гистологическом исследовании ткани головного мозга нами был выявлен довольно высокий уровень числа дистрофически измененных клеток в коре головного мозга и мозжечке. На нарушение функциональной активности нейронов указывали не только патологические изменения нейронов, носящие дистрофический характер, но и отмечавшееся снижение экспрессии нейроспеци-

фических белков. Функциональная роль нейроспецифических белков в ткани головного мозга, таких как S 100 и GFAP в настоящее время остается до конца не выясненной, но, по данным ряда авторов, снижение их экспрессии опосредованно свидетельствует об угнетении функциональной активности ткани головного мозга, в данном случае коры. При клиническом обследовании больных с диагнозом хроническая ртутная интоксикация отмечались вестибуло-координаторные нарушения и атаксический синдром. У экспериментальных животных также выявлены изменения времени вращения на вращающемся стержне и нарушения в ткани мозжечка, в частности дистрофия клеток Пуркинье, прогрессирующая в отдаленном периоде.

Томографическое исследование головного мозга больных с хронической ртутной интоксикацией свидетельствовало о картине морфологических изменений [1]. В 92,7 % случаев была диагностирована выраженная наружная и внутренняя (асимметричная) гидроцефалия (по механизму ex vasuo) в сочетании с атрофическими изменениями коры больших полушарий (1,8 %) и мозжечка (16,4 %). В эксперименте на лабораторных животных в ткани головного мозга отмечался выраженный периваскулярный отек, захватывающий не только кору головного мозга, но и подкорковые структуры, а также мозжечок. Также наряду с набуханием ядер нейронов наблюдался и выраженный перицеллюлярный отек, приводящий к нарушению цитоархитектоники коры головного мозга.

Наличие органического поражения мозга в отдаленном периоде профессиональных нейротоксикаций у работающих подтверждалось методами электроэнцефалографии с определением

зрительных и слуховых вызванных потенциалов мозга, позволивших выявить нарушение корково-подкорковых взаимосвязей в виде увеличения латентного периода волн N100, P200 и длительности всего ответа [3]. В отдаленном периоде экспериментальной интоксикации наибольшие изменения биоэлектрической активности головного мозга у опытных белых крыс также проявились увеличением латентности и длительности ответа, изменением формы основных пиков при оценке ЗВП [1].

Оценивая полученные результаты, можно заключить, что длительное ингаляционное воздействие неорганических соединений ртути приводило к развитию у белых крыс токсической энцефалопатии, что в равной мере соответствует клинике хронической ртутной интоксикации у пациентов с установленным диагнозом токсической энцефалопатии. В целом динамика развития обнаруженных нарушений двигательной активности животных, морфофункционального состояния ЦНС в эксперименте, устойчивость во времени доказывает их общность с изменениями функционального статуса ЦНС у человека с ртутной нейротоксикацией. Учитывая данные клинических и экспериментальных исследований, считаем, что экстраполяция результатов, полученных при обследовании белых крыс, на человека при моделировании токсической энцефалопатии достаточно обоснована. При этом соблюдается основное условие моделирования — принцип подобия экспериментальной модели оригиналу, ответную реакцию которого на воздействие нейротоксических веществ, она должна воспроизвести, в связи с чем, наблюдаемые нами морфофункциональные и морфометрические изменения и нарушения в нервной ткани головного

**Таблица 1**  
**Сравнительная характеристика патоморфологических нарушений в ткани головного мозга при воздействии НСР в динамике эксперимента**

| Морфологический признак                                                                   | Пары металлической ртути |                 | Сулема           |                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------|------------------|-------------------------------|
|                                                                                           | 1 срок                   | 2 срок          | 1 срок           | 2 срок                        |
| Периваскулярный отек ткани головного мозга                                                | ярко выраженный          | сохраняется     | выраженный       | сохраняется                   |
| Перицеллюлярный отек                                                                      | отмечается               | сохраняется     | отмечается       | сохраняется                   |
| Число дистрофически измененных нейронов в коре головного мозга, шт/0,2 мм <sup>2</sup>    | 14,2 (11,6–16,8)         | 11,0 (9,0–16,0) | 12,0 (10,0–15,0) | 9,0 (7,0–11,0)                |
| Численная плотность нормальных нейронов на единицу площади (по сравнению с контролем)     | ↓ на 50,0 %              | ↓ на 51,0 %     | ↓ на 26,8 %      | ↓ на 42,0 %                   |
| Площадь митохондрий                                                                       | ↓ на 62,1 %              | ↓ на 37,6 %     | ↓ на 38,5 %      | достигла контрольных значений |
| Площадь ядер нейронов                                                                     | ↑ на 66,0 %              | ↑ на 50,0 %     | ↑ на 25,0 %      | ↑ на 31,9 %                   |
| Число глиальных клеток коры головного мозга на единицу площади (по сравнению с контролем) | ↓ на 43,6 %              | ↓ на 10,3 %     | ↑ на 55,0 %      | ↑ на 7,0 %                    |
| Экспрессия GFAP                                                                           | ↓↓                       | ↓               | ↓                | ↓                             |
| Экспрессия S 100                                                                          | ↓↓                       | ↓               | ↓                | ↓                             |
| Толщина гранулярного слоя мозжечка, мкм                                                   | 13,8 (13,5–4,2)          | 9,7 (8,7–11,3)  | 10,2 (9,8–13,3)  | 8,7 (8,3–11,2)                |
| Дистрофия клеток Пуркинье, шт/0,2 мм <sup>2</sup>                                         | 3,6 (3,2–4,9)            | 5,6 (5,3–8,4)   | 7,2 (5,4–7,9)    | 4,13 (1,03–6,1)               |

**Примечание:** ↓ – значение показателя снижается; ↑ – значение показателя повышается.

мозга белых крыс с ртутной энцефалопатией, можно с достаточной определенностью экстраполировать на человека.

Предложенные методические подходы к изучению закономерностей влияния НСР на здоровье человека и моделированию ртутной энцефалопатии позволили выявить как общие, так и отличительные признаки морфофункциональных нарушений в ткани головного мозга лабораторных крыс в динамике постконтактного периода интоксикации парами металлической ртути и сулемой (табл. 1).

Научное осмысление полученных результатов экспериментального моделирования позволило нам из комплекса методов выбрать наиболее информативные морфологические критерии токсического поражения головного мозга белых крыс, имеющие одинаковую направленность при воздействии паров металлической ртути и сулемы: повышенное содержание нейронов коры головного мозга с явлениями дистрофии, увеличение площади ядер нейронов, прогрессирующее снижение общей плотности нейронов коры на единицу площади.

Опираясь на результаты экспериментального моделирования ртутной нейроинтоксикации, можно заключить, что формирование токсической энцефалопатии в отдаленном постконтактном периоде обусловлено:

- наличием длительно сохраняющихся периваскулярного и перицеллюлярного отеков, вследствие нарушения кровоснабжения головного мозга и изменением проницаемости гематоэнцефалического барьера;
- развитием или прогрессированием нейродегенеративного процесса в нервной ткани, характеризующегося дистрофическими нарушениями нейронов и клеток астроглии; уменьшением плотности расположения нейронов; длительно сохраняющимся нарушением ультраструктуры нейронов; нарастающей демиелинизацией нейронов;
- снижением экспрессии в нервной ткани нейроспецифических белков S-100 и GFAP, одновременно с повышением экспрессииNSE.

Отмеченные нами ключевые звенья патологического процесса в ЦНС при интоксикации НСР в конечном итоге являются причиной ее прогрессивного течения с формированием у больных с хронической ртутной энцефалопатией в отдаленном постконтактном периоде органического расстройства личности в виде преимущественно когнитивных нарушений, эмоционально-гиперестетического, тревожно-депрессивного синдромов на фоне гиперкине-

тического синдрома, вестибуло-координаторных нарушений или атаксического синдрома.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Агбаш А.З. и др. Опыт применения перфузионной компьютерной томографии у больных с хронической ртутной интоксикацией // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2009. — № 1 (65). — С. 147–153.
2. Катаманова Е.В., Якимова Н.А., Соседова Л.М. Значимые критерии изменений ЭЭГ при экспериментальном ртутном повреждении нервной системы // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2010. — № 4. — С. 32–36.
3. Катаманова Е.В. и др. Особенности токсической энцефалопатии при хронической ртутной интоксикации и в отдаленном периоде воздействия комплекса токсических веществ у пожарных // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2004. — № 4. — С. 68–71.
4. Лахман О.А. и др. Течение энцефалопатии в отдаленном периоде профессиональной ртутной интоксикации // Мед. труда и пром. экология. — 2003. — № 3. — С. 46–48.
5. Рукавишников В.С. и др. Токсические энцефалопатии в отдаленном постконтактном периоде профессиональных нейроинтоксикаций (клинико-экспериментальные исследования) // Мед. труда и пром. экология. — 2010. — № 10. — С. 22–30.
6. Соседова Л.М., Голубев С.С., Титов Е.А. Сравнительная оценка изменений в нервной ткани белых крыс при воздействии сулемы и паров металлической ртути/ Токсикологический вестник. — 2009. — № 3. — С. 27–30.
7. Соседова Л.М. Научно-методические основы моделирования ртутной токсической энцефалопатии // Токсикологический вестник. — 2010. — № 1. — С. 21–25.
8. Чехонин В.П., Дмитриева Т.Б., Жирков Ю.А. Иммунохимический анализ нейроспецифических антигенов. — М.: Медицина, 2000. — 413 с.
9. Якимова Н.А. Нейротоксичности неорганических соединений ртути в отдаленном постконтактном периоде при экспериментальном моделировании // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2008. — № 2. — С. 102–103.
10. Якимова Н.А. Оценка отдаленных нейротоксических эффектов при экспериментальной интоксикации неорганическими соединениями ртути: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Иркутск, 2010. — 23 с.

## Сведения об авторах

**Титов Евгений Алексеевич** – младший научный сотрудник лаборатории токсикологии Ангарского филиала ВСНЦ экологии человека СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека (665827, г. Ангарск, а/я 1170; тел.: 8 (3955) 55-40-79; e-mail: imt@irmail.ru)

**Соседова Лариса Михайловна** – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией токсикологии Ангарского филиала ВСНЦ экологии человека СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека

**Якимова Наталья Леонидовна** – кандидат медицинских наук, и.о. научного сотрудника лаборатории токсикологии Ангарского филиала ВСНЦ экологии человека СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека