

В.А. Вокина, Е.А. Титов

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ ГИПОКСИЧЕСКОГО И ТОКСИЧЕСКОГО ГЕНЕЗА**Ангарский филиал ВСНЦ экологии человека СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека (Ангарск)**

В работе рассмотрены общие закономерности изменений морфофункционального состояния нервной системы белых крыс при экспериментальном моделировании токсической и гипоксической энцефалопатии. Экспериментальное моделирование поражений нервной системы было выполнено при воздействии интермиттирующей гипоксии и производственных токсикантов: металлической ртути, сулемы и винилхлорида. Выявлены отдельные патоморфологические особенности изменений нервной ткани при энцефалопатии гипоксического генеза.

Ключевые слова: гипоксия, токсическая и гипоксическая энцефалопатия, нервная система, экспериментальное моделирование

MORPHOFUNCTIONAL CONDITION OF NERVOUS SYSTEM OF ALBINO RATS AT AN ENCEPHALOPATHY OF HYPOXIC AND TOXIC GENESIS

V.A. Vokina, E.A. Titov

Institute of Occupational Health and Human Ecology ESSC HE SB RAMS, Angarsk

In work the general laws of changes of a morphofunctional condition of nervous system of albino rats are considered at experimental modelling toxic and hypoxic encephalopathies. Experimental modeling of lesions of nervous system has been executed at influence intermittent hypoxia and industrial toxicants: metal mercury, mercuric chloride and vinyl chloride. Are found out separate pathomorphological features of changes of a nervous tissue at an encephalopathy of hypoxic genesis.

Key words: hypoxia, toxic and hypoxic encephalopathy, nervous system, experimental modeling

Энцефалопатия в настоящее время является одной из актуальных медицинских и социально значимых проблем. Вопросам патогенеза энцефалопатии различного генеза посвящено значительное число публикаций [1, 4, 5, 8, 9]. Среди населения в целом, наряду с токсическим поражением ЦНС эндогенного происхождения (гипотиреоз, сахарный диабет, недостаточность функции печени и почек), встречается гипоксическая энцефалопатия, которая обусловлена отсутствием поступления кислорода к мозгу вследствие гипотензии или дыхательной недостаточности и является не менее разрушительной по своим последствиям.

У работающего населения чаще встречается токсическая энцефалопатия, которая является результатом поражения сосудов и ткани головного мозга в условиях острой или хронической интоксикации тяжелыми металлами, винилхлоридом, органическими растворителями, спиртосодержащими веществами и др. Вместе с тем, вопросам дифференциальной диагностики, позволяющей выделить особенности морфофункциональных нарушений ЦНС при токсическом и гипоксическом воздействиях, посвящены единичные исследования [2]. Целью нашей работы являлась оценка морфологических изменений нервной системы белых крыс при экспериментальном моделировании токсической и гипоксической энцефалопатии.

МЕТОДИКА

Экспериментальное моделирование токсической энцефалопатии включало проведение

нескольких серий опытов с нейротоксикантами (металлическая ртуть, сулема, винилхлорид) при различных путях и сроках введения их в организм лабораторных животных [9]. Экспериментальных животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986). Во всех сериях моделирования использовали белых беспородных крыс-самцов массой от 180 до 260 г, при этом в каждой экспериментальной группе было по 8 – 10 животных.

Хроническое ингаляционное воздействие парами металлической ртути и винилхлоридом проводили в 200-литровых газовых камерах на 300 белых крысах в зимний период. Общая продолжительность воздействия токсикантов составляла 7 недель для ртути (средняя концентрация 0,330 мг/м³) и 8 недель для винилхлорида (средняя концентрация 0,362 мг/м³) по четыре часа ежедневно, исключая выходные дни. Введение сулемы осуществляли в подостром эксперименте, подкожно, из расчета 0,05 мг на 100 г массы животного (расчет по ртути) ежедневно по 5 дней в неделю в течение 6 недель.

Для сравнительной оценки полученных результатов нами моделировалось состояние подострой гипоксии, которая создавалась путем помещения белых крыс в трехлитровый эксикатор один раз в неделю до появления судорожных сокращений и остановки дыхания. Эксперимент продолжался в течение 6 недель.

Обследование экспериментальных животных проводили непосредственно после окончания воздействия. Во всех сериях экспериментального моделирования каждой опытной соответствовала контрольная группа, животные которой в том же режиме получали инъекции физиологического раствора или же в газовые камеры им подавался воздух.

Умерщвление животных проводилось методом декапитации в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом МЗ СССР от 12.08.1977 г. Головной мозг сразу после декапитации животных фиксировали в 10% нейтральном формалине, с последующей проводкой и заливкой в парафин. Далее на санных микромах MC-2 (СССР) и HM 400 (Microm, Германия) с использованием одноразовых ножей изготавливали сагиттальные, фронтальные и горизонтальные срезы головного мозга. Приготовленные стандартные серийные срезы толщиной 3–5 мкм наклеивали на стекла, обработанные яичным альбумином. Для оценки состояния клеток головного мозга препараты окрашивали по общепринятым методикам гистологической окраски: гематоксилином и эозином — для выявления общей картины состояния нейронов и клеток глии в различных отделах головного мозга; пикрофуксином с докраской гематоксилином Вейгерта (по Ван-Гизону) — для оценки состояния сосудов головного мозга; тионином (по Нисслю) — для исследования структуры нейронов; импрегнацией нитратом серебра по методу Гомори — для оценки состояния миелиновых волокон головного мозга [3]. Исследование структуры нервной ткани у контрольных и экспериментальных животных было проведено на светооптическом исследовательском микроскопе Olympus BX 51. Была изучена нервная ткань сенсомоторной коры лобной, теменной и затылочной долей, CA1, CA2 и CA3 полей гиппокампа. Ввод микроизображений срезов мозга в компьютер проводили при помощи камеры Olympus.

Иммуногистохимически выявляли экспрессию глиального фибриллярного кислого протеина (GFAP), нейроспецифической енолазы (NSE), протеина S-100. Исследования проводили с помощью моноклональных антител (Lab Vision Corporation, США) и вторичных антител, конъюгированных с полимером и пероксидазой (Lab Vision Corporation). Визуализацию прореагировавших первичных антител производили при помощи хромогена DAB+ (Lab Vision Corporation). Выявление экспрессии осуществляли на парафиновых срезах.

Статистическая обработка проводилась с использованием ППП «STATISTICA v6.0» [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценивая полученные результаты можно заключить, что длительное воздействие парами металлической ртути, винилхлоридом и сулемой приводило к развитию у белых крыс токсической энцефалопатии. При морфологическом изучении

препаратов головного мозга белых крыс, подвергавшихся токсическому и гипоксическому воздействию, отмечалось органическое поражение нервной ткани — периецеллюлярный и периваскулярный отек, причем последний был более выражен при интоксикации винилхлоридом, при гипоксии наблюдаемые изменения имели менее выраженный характер. Глиоз нервной ткани наблюдался при воздействии как токсикантов, так и гипоксии, однако степень выраженности реакции глии была различной. Так, при гипоксии и ингаляционном воздействии винилхлоридом была обнаружена незначительная реакция глии, в то время как сулема и металлическая ртуть способствовали дегенеративным изменениям глиальных клеток: вакуолизации и разрастанию сателлитной глии. Учитывая, что глиальные клетки являются основной составной частью гематоэнцефалического барьера, и нарушение их функционирования оказывает влияние на проницаемость системы гематоэнцефалического барьера, можно сделать предположение о снижении его барьерной функции.

Нарушение функционального состояния глиальных клеток подтверждал иммуногистохимический анализ экспрессии нейроспецифических белков, который показал снижение содержания белка S-100, являющегося маркером дифференцированной глии, и глиального фибриллярного кислого белка, характеризующего состояние астроглиальных клеток, в препаратах нервной ткани белых крыс с токсической энцефалопатией. Считается, что изменение активности GFAP указывает на морфофункциональные нарушения глиальной ткани и нарушении окислительно-восстановительных процессов [3]. Снижение его уровня в нервной ткани, возможно, связано с энергетическим дефицитом, а также с нарушением стабильности цитоскелета астроцитов, и их формы, определяемых при обзорной микроскопии как дегенеративно-дистрофические явления глии. Данные изменения способствуют затруднению осуществления структурно-динамической связи между ядром и внешней оболочкой клетки и ее экстрацеллюлярным окружением. При гипоксической энцефалопатии содержание нейроспецифических белков изменялось незначительно или не изменялось совсем. Наряду с этим, в препаратах нервной ткани коры головного мозга и гиппокампа при токсическом воздействии отмечалось повышение содержания нейроспецифической енолазы (NSE). Данный фермент — один из известных в настоящее время общих маркеров всех дифференцированных нейронов, который специфичен для центральных и периферических нейронов. Известно, что NSE, являясь гликолитическим ферментом, участвует в расщеплении глюкозы, а его экспрессия увеличивается при нейродегенеративных процессах и характеризует прогрессивность патологического состояния [3]. При непосредственном вовлечении нервной ткани в патологический процесс, качественные и

Таблица 1

Экспрессия нейроспецифических белков в головном мозге крыс при гипоксическом воздействии и при интоксикациях винилхлоридом, сулемой и ртутью Me (Q25–Q75)

Группы	S100, усл. ед.	NSE, усл. ед.	GFAP, усл. ед.
Винилхлорид	4 (3–4)	5 (5–5)*	5 (4–5)
Сулема	3 (3–3)*	3 (3–4)	3 (3–3)*
Ртуть	1 (1–1)*	5 (5–5)*	1 (1–1)*
Гипоксия	4 (4–4)	4(3–4)	3(3–4)
Контрольная группа	4 (4–5)	3 (3–3)	4 (4–5)

Примечание: * – различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

количественные определения этого белка предоставляют информацию о степени выраженности повреждения нейронов. Следовательно, высокая экспрессия данного белка подтверждает выявленные нами структурные нарушения нейрональных клеток. Содержание NSE в препаратах нервной ткани белых крыс с гипоксической энцефалопатией соответствовало показателям контрольной группы (табл. 1).

При воздействии гипоксии и токсикантов установлена дистрофия клеток Пуркинье, пирамидных нейронов гиппокампа, наиболее значительные нарушения наблюдались в нейронах коры. Нарушение структуры слоев коры головного мозга было выявлено в препаратах нервной ткани животных, подвергшихся воздействию металлической ртути и сулемы. Поражения нейронов нервной ткани в эксперименте зачастую носило ишемический характер и характеризовалось сморщиванием тел нейронов и приобретением ими треугольной формы, в цитоплазме появлялись мелкие плотные гранулы, ядро нейрона также приобретало треугольную форму. В группах контроля таковых изменений не наблюдалось.

В целом при токсической энцефалопатии наблюдалось более значительное уменьшение количества нейронов с последующим разрежением нервной ткани. Кроме этого при воздействии сулемы и винилхлорида обнаруживались апоптотические тельца, свидетельствующие о гибели нейронов по типу апоптоза, которые отсутствовали при гипоксическом воздействии. В препаратах нервной ткани белых крыс при воздействии токсикантов встречался спонгиоз, который характерен для дистрофических и гидропических изменений в нервной ткани. Он был особенно выражен при винилхлоридной нейроинтоксикации и имел лишь единичный очаговый характер при энцефалопатии, развившейся при гипоксии.

Таким образом, длительное интермиттирующее моделирование состояния гипоксии приводит к развитию у животных энцефалопатии, основные проявления которой имеют общие закономерности с токсической энцефалопатией и характеризуются морфологическими изменениями структуры нервной ткани. Но при данном режиме воздействия степень выраженности наблюдаемых изменений меньше. Гипоксическая энцефалопатия имеет свои

особенности, связанные с отсутствием изменений в содержании нейроспецифических белков, а также признаков апоптоза и спонгиоза.

ВЫВОДЫ

1. При проведении патоморфологических исследований установлено, что токсическая и гипоксическая энцефалопатия способствует возникновению периваскулярного и перичеллюлярного отеков, дегенеративных изменений глиальных клеток, дистрофии клеток Пуркинье, нейронов коры головного мозга крыс.

2. Выявлены некоторые особенности изменений нервной ткани, отличающие гипоксическое воздействие от токсического, которые заключались в отсутствии изменений в содержании нейроспецифических белков, а также признаков апоптоза и спонгиоза при гипоксическом воздействии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Визило Т.П., Цюрюпа В.Н., Власова И.В. Хроническая энцефалопатия и когнитивные расстройства // Политравма. — 2008. — № 2. — С. 50 – 54.
2. Катаманова Е.В. и др. Дифференциальный диагноз токсической энцефалопатии у пожарных // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2002. — № 3. — С. 84 – 87.
3. Коржевский Д.Э. Краткое изложение основ гистологической техники для врачей и лаборантов-гистологов. — СПб.: Кроф, 2005. — 48 с.
4. Лужников Е.А., Леженина Н.Ф., Гольдберг Ю.С., Епифанова Н.М. Особенности формирования и течения токсико-гипоксической энцефалопатии при острых отравления веществами нейротропного действия // Анестезиология и реаниматология. — 2005. — № 6. — С. 4 – 8.
5. Носатовский И.А. Токсическая энцефалопатия при «фенилпропаноламиновой» наркомании // Наркология. — 2007. — № 2. — С. 26 – 31.
6. Пирс Э. Гистология теоретическая и прикладная. — М.: Изд-во иностранной литературы, 1962. — 963 с.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. — М.: Медиа Сфера, 2002. — 312 с.

8. Рукавишников В.С., Лахман О.А., Бенеманский В.В. Токсическая энцефалопатия: патогенез, клиника и лечение // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. — 2003. — № 1. — С. 93–100.

9. Соседова Л.М., Якимова Н.А., Титов Е.А., Капустина Е.А. Экспериментальное моделирование

токсической энцефалопатии // Мед. труда и пром. экология. — 2008. — № 8. — С. 22–26.

10. Чехонин В.П., Дмитриева Т.Б., Жирков Ю.А. Иммунохимический анализ нейроспецифических антигенов. — М. : Медицина, 2000. — 414 с.

Сведения об авторах

Вокина Вера Александровна – младший научный сотрудник лаборатории токсикологии Ангарского филиала ВСНЦ ЭЧ СО РАМН (665827, г. Ангарск, 12-а микрорайон, д. 3; тел.: 8 (3955) 55-40-92; e-mail: imt@irmail.ru)

Титов Евгений Алексеевич – младший научный сотрудник лаборатории токсикологии Ангарского филиала ВСНЦ ЭЧ СО РАМН (665827, г. Ангарск, 12-а микрорайон, д. 3; тел.: 8 (3955) 55-40-92; e-mail: imt@irmail.ru)