

5. Личко А. Е. Типы акцентуаций характера и психопатий у подростков. — М., 1999.

6. Осадшая В. Н., Гавриков Л. К., Ергиева С. И. и др. Влияние гендерных различий на тяжесть состояния недоношенных детей в раннем неонатальном периоде. — СПб.: Современные проблемы науки и образования, 2013.

Контактная информация

Можаров Николай Сергеевич — ассистент кафедры психиатрии, наркологии и психотерапии с курсом ФУВ, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: n-mozharov@mail.ru

УДК 615.620.3

НЕЙРОТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Ю. И. Великородная, Н. И. Мамулайшвили, А. Я. Почепцов

Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии, Волгоград

Изучали нейротоксичность хлорофоса в хроническом эксперименте. При гистохимическом, иммуногистохимическом и морфологическом исследовании отмечено преимущественное поражение аксонов и синаптических окончаний центральной нервной системы с деградацией нейрофиламентов аксонов и нарушениями медиаторных процессов.

Ключевые слова: нейротоксичность, хлорофос, хроническая интоксикация, морфология, иммуногистохимия, гистохимия.

NEUROTOXIC EFFECTS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN CHRONIC ORGANOPHOSPHORUS INTOXICATION (EXPERIMENTAL STUDY)

Yu. I. Velikorodnaya, N. I. Mamulaishvili, A. Ya. Pocheptsov

Neurotoxicity of metrifonate was studied in chronic experiment. Predominant involvement of axons and synaptic terminals of the central nervous system with axon neurofilaments degradation and mediator processes damaging was detected in histochemical, immunohistochemical and morphological study.

Key words: neurotoxicity, metrifonate, chronic intoxication, morphology, immunohistochemistry, histochemistry.

По современным представлениям, интоксикация фосфорорганическими соединениями (ФОС) приводит к развитию 4 основных синдромов [7]: острого холинергического синдрома, интермедиарного синдрома, нейропатии замедленного типа и нейропсихического синдрома. Наиболее известным из них является нейропатия замедленного типа, хотя другие формы также способны вызывать хронические поражения как центральной, так и периферической нервной системы.

Первые клинические случаи отдаленной прогрессирующей нейропатии были описаны в литературе около 100 лет назад и относились к отравлениям триортокрезилфосфатом (трилоилфосфатом). В экспериментах наиболее чувствительными к действию триортокрезилфосфата оказались домашние куры, которые долгие годы были эталонной моделью отдаленной нейротоксичности. Менее чувствительными были лабораторные грызуны (крысы и мыши) и при интоксикации триортокрезилфосфатом локомоторных изменений у них не наблюдали [3]. Более эффективным, с точки зрения моделирования нейротоксичности у грызунов, оказался хлорпирифос. Его введение вызывало различные нарушения поведенческих реакций у крыс и мышей, включая двигательные и когнитивные расстройства [5].

Морфологическим субстратом нейротоксичности, впервые описанным J. B. Cavanagh в 1954 году, является отек аксонов, приводящий к разобщению мембран миелиновых оболочек с образованием вакуолей в дистальных отделах длинных и крупных нервных миелиновых стволов с последующим Валлеровским перерождением поврежденных нервных волокон.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Проявления нейротоксичности, в том числе и в головном мозге, у экспериментальных животных при хронической интоксикации широко применяемым инсектицидом хлорофосом.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве модельного фосфорорганического соединения был использован 0,0-диметил (1-окси-2,2,2-трихлорэтил) фосфонат, известный под торговой маркой «Хлорофос» (ХФ). При выполнении данной работы был использован ХФ в виде технического продукта (производства ООО «Волгоградпромпроект») с содержанием основного действующего вещества 97,2 %.

10%-й водный раствор ХФ вводили внутривенно.

Методом пробит-анализа по Финни была определена ЛД₅₀, которая составила 725 мг/кг (598 ± 844) (при $T_{\text{табл}} = 1,96$, $S = 1,37$).

В эксперименте участвовало 20 беспородных половозрелых белых крыс-самцов, весом 150—180 г. Крыс содержали в клетках, по 3—4 особи в каждой в помещениях с искусственным освещением (8.00—20.00 ч. — свет, 20.00—8.00 ч. — темнота) при 20—22 °С в условиях свободного доступа к воде и пище. При постановке экспериментов руководствовались требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных.

Животные были разделены на 2 группы по 10 особей:

Контрольная группа, в которой животные получали физиологический раствор.

Опытная группа, в которой животные получали ХФ внутривенно в дозе 72,5 мг/кг (1/10 ЛД₅₀) 5 раз в неделю в течение 10 недель с последующим увеличением дозы до 115 мг/кг (1/5 ЛД₅₀) в течение 2 недель. По окончании эксперимента крыс наркотизировали диэтиловым эфиром и декапитировали.

Материалом патоморфологического исследования были образцы головного мозга на уровне — 4,5 мм от Bregma, на уровне мозжечка и продолговатого мозга, а также седалищный нерв на уровне верхней трети бедра.

Образцы тканей, предназначенные для патоморфологического и иммуногистохимического исследования, сразу после извлечения помещали в 4%-й раствор параформальдегида (Sigma), приготовленного на 0,01M фосфатно-солевом буфере с pH = 7,4 (Sigma). Затем образцы заключали в парафиновую среду Histomix по общепринятой методике. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм, полученные на ротационном микротоме (MICROM HM340E), монтировали на предметные стекла.

Для выявления процессов демиелинизации использовали краситель Luxol fast blue (Acros) для окраски миелиновых волокон с последующей докраской Cresyl violet (Sigma). Миелиновые волокна окрашивались в сине-зеленый цвет, нейроны — от розового до фиолетового.

Парафиновые срезы для иммуногистохимического исследования толщиной 4 мкм монтировали на стекла, обработанные поли-L-лизин (Menzel).

Для детального исследования состояния оболочек аксонов в ЦНС были использованы антитела к основному белку миелина (MBP), (ABCAM, клон BDI221).

Изучение тонкого строения нейрофиламентов, как одного из главных компонентов аксонов и тел нейронов, проводили с помощью определения экспрессии белка NF-200 (Novocastra, клон RT97).

Для иммуногистохимического исследования состояния системы медиаторного обмена в головном мозге использовали метод определения холинацетилтрансферазы (ХАТ), применялись антитела к ХАТ (Novocastra, клон 38B12).

В качестве одного из маркеров медиаторного действия ФОС изучали экспрессию фермента из класса эстераз — параоксаназу 2 (PON2). Применялись антитела к PON2 производства ABCAM.

Для блокирования эндогенной пероксидазы срезы инкубировали 20 минут в 3%-й перекиси водорода. Постановку иммуногистохимических реакций проводили с помощью системы детекции «Дако». Пероксидазу проявляли 3-3-диаминобензидином из набора протокола. На заключительном этапе реакции срезы докрашивали гематоксилином Майера. Негативным контролем служили препараты без инкубации с первичными антителами при полном соблюдении остальных этапов протокола.

Полученные препараты изучали и фотографировали в микроскопе AxioScope A1 (Zeiss), оборудованной цифровой камерой AxioCam MRc5 и обрабатывали в программе ZENpro 2011 (Zeiss).

Материалом гистохимического исследования были образцы головного мозга (ГМ) на уровне лобной доли и на уровне — 4,5 мм от Bregma — перекрест зрительного нерва (ПЗН).

Образцы тканей, предназначенные для гистохимического исследования, замораживали при температуре -18—20 °С и резали в криостате. Полученные срезы монтировали на одно предметное стекло и инкубировали. В данной работе были использованы следующие методы: определение активности АХЭ и бутирилхолинэстеразы (БХЭ) по методу Карновского, а также неспецифических эстераз (НЭ) по методу Пирса [1]

Активность гистохимических реакций на препаратах оценивали полуколичественным методом по Соколовскому [2]. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Excel-2010 с использованием *t*-критерия Стьюдента для средних величин.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При гистохимическом исследовании изучении головного мозга было отмечено угнетение активности эстераз в неокортексе, подкорковых образованиях и ядрах (табл. 1, рис. 1).

При патоморфологическом исследовании головного мозга через 3 месяца после начала эксперимента значимых отличий от контроля обнаружено не было.

В периферической нервной системе у экспериментальных животных было выявлено поражение части миелиновых волокон седалищного нерва (рис. 2А, В). Миелиновые оболочки пораженных волокон были истончены или, напротив, увеличены в размерах, а аксоны уменьшены в диаметре. Между аксоном и миелиновой оболочкой образовывались пустоты. Более отчетливо патология миелиновых волокон была заметна при иммуногистохимическом исследовании основного белка миелина (MBP) (рис. 2С, D).

Таблица 1

Изменение активности эстераз в органах-мишенях
при хронической интоксикации ХФ ($M \pm \sigma$)

Органы-мишени	НЭ		АХЭ		БХЭ	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	ОПЫТ
ГМ на уровне ПЗН	$4,00 \pm 0,0$	$3,35 \pm 0,24^* \downarrow$	$4,00 \pm 0,00$	$3,46 \pm 0,26^* \downarrow$	$4,03 \pm 0,09$	$2,50 \pm 0,00^* \downarrow$
Лобные доли	$4,1 \pm 0,21$	$3,18 \pm 0,28^* \downarrow$	$4,00 \pm 0,00$	$2,97 \pm 0,26^* \downarrow$	$4,00 \pm 0,00$	$3,88 \pm 0,13$

* $p \leq 0,05$.

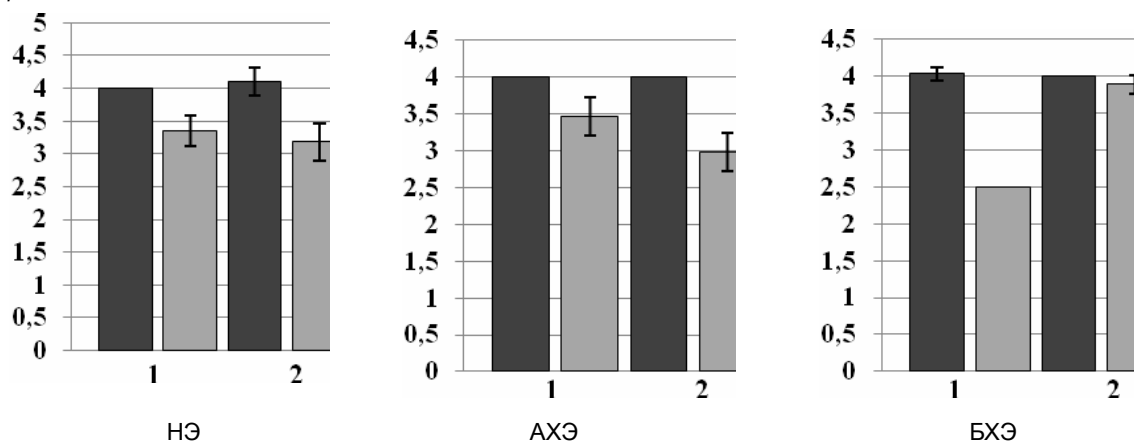


Рис. 1. Изменение активности эстераз в головном мозге при хронической интоксикации ХФ.

Контроль — ■ Опыт — □.

1 — головной мозг на уровне перекреста зрительных нервов; 2 — лобные доли

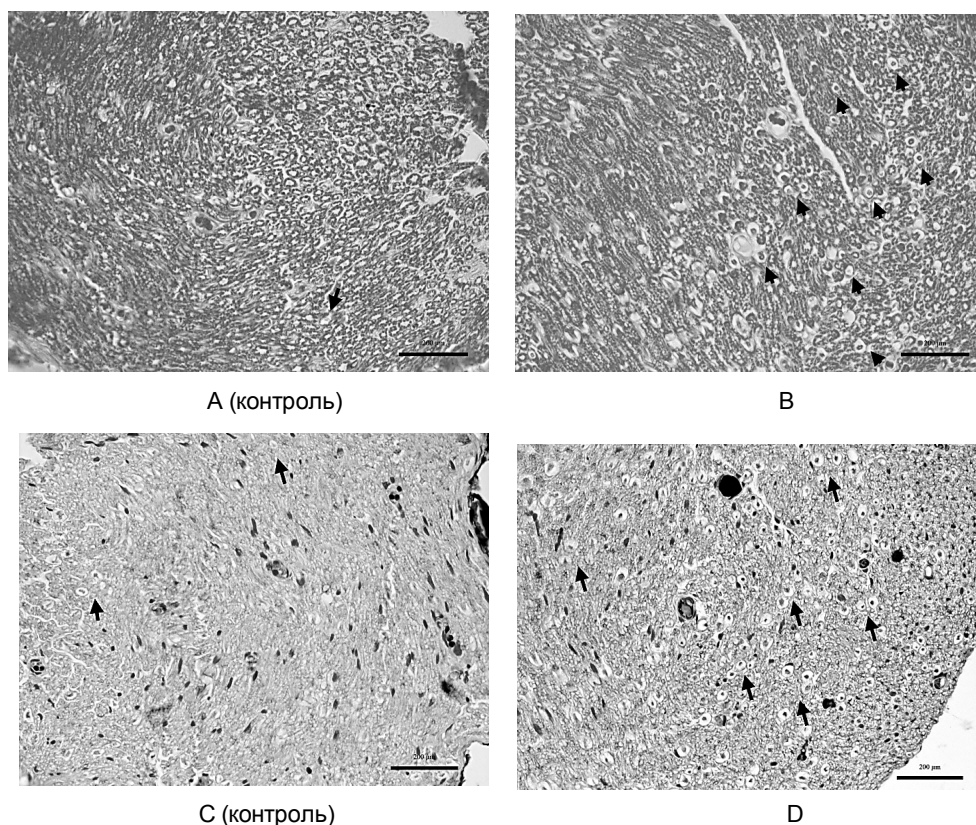


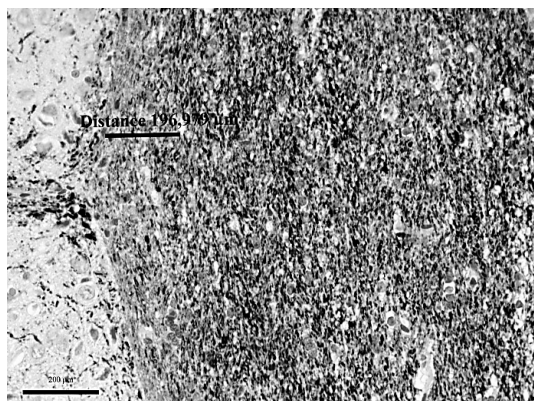
Рис. 2. Поражение миелиновых аксонов седалищного нерва при хронической интоксикации хлорофосом.

А (контроль) и В (опыт) — окраска Luxol fast blue. С (контроль) и D (опыт) — антитела к МВР.

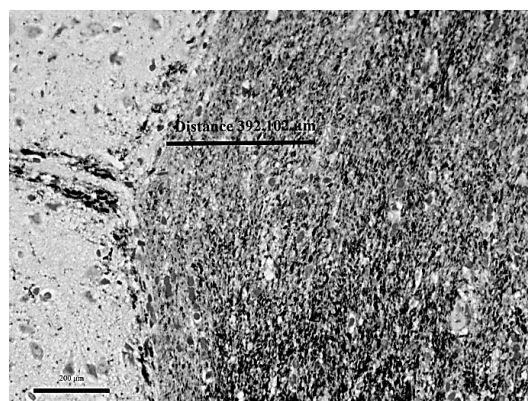
ПАП-метод, докраска гематоксилином Майера. Scale bar = 200 μ m

Изучение содержания белка нейрофиламентов в среднем мозге показало снижение экспрессии NF-200 в области Аммонова рога за счет уменьшения количества волокон цитоскелета и их частичной фрагментации (рис. 3А, В). Расстояние, занимаемое истонченными нейрофиламента-

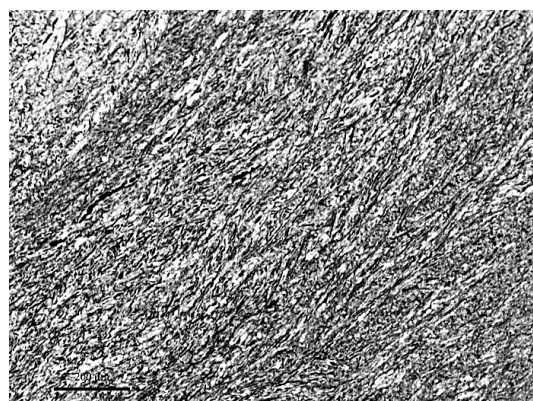
ми, увеличивалось в 2 раза: с 196,9 мкм до 392,1 мкм. В продолговатом мозге были отмечены признаки дезорганизации нейрофиламентов в проводящих миелиновых волокнах (рис. 3С, D). Они становились более истонченными, рыхлыми, теряя свою упорядоченную структуру.



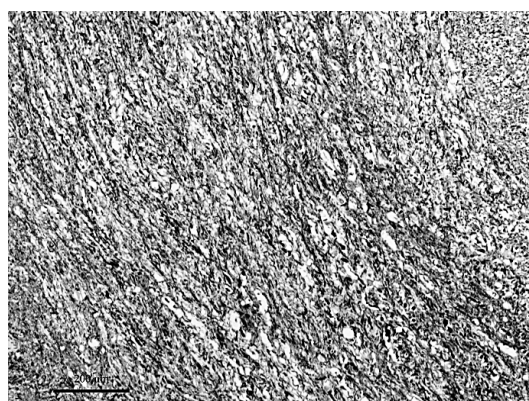
А (контроль)



В



С (контроль)



D

Рис. 3. Изменение структуры нейрофиламентов в головном мозге при хронической интоксикации хлорофосом: частичная фрагментация в проводящих пучках Аммонова рога (В) и разрыхление в проводящих пучках продолговатого мозга (D).

Антитела к NF-200. ПАП-метод,
докраска гематоксилином Майера
Scale bar = 200 μm

При иммуногистохимическом исследовании ХАТ было выявлено снижение ее активности в проводниковых структурах продолговатого мозга (рис. 4В) по сравнению с контролем (рис. 4А). В то же время в синапсах холинэргических нейронов среднего и продолговатого мозга уровень экспрессии ХАТ оставался неизменным.

При исследовании PON2 в продолговатом мозге было отмечено повышение уровня активности исследуемой параоксоназы в нейрорпиле (рис. 4D). В структурах среднего мозга и в коре больших полушарий изменений в активности PON2 обнаружено не было.

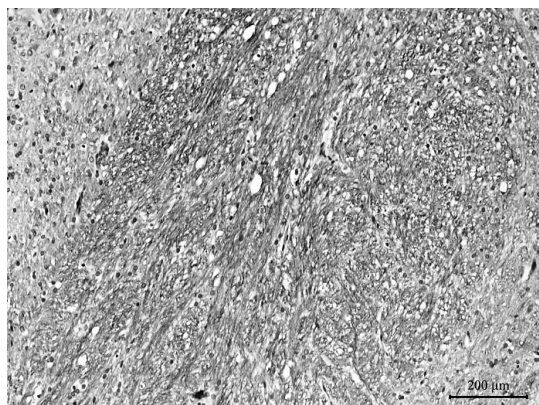
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно полученным данным, хроническая интоксикация ХФ сопровождалась умеренно выраженными явлениями демиелинизации в крупных стволах периферических нервов. Проявлениями патологического процесса в нейронах и аксонах головного мозга была деградация одного из компонентов цитоскелета — белка NF-200. Он оказался наиболее чувствительным маркером при токсическом поражении ЦНС. При этом отмечалось повышение активности PON2 в нейрорпиле продолговатого мозга, что, скорее всего, является адаптационным механизмом нейронов в ответ на стресс-индуцирование [4].

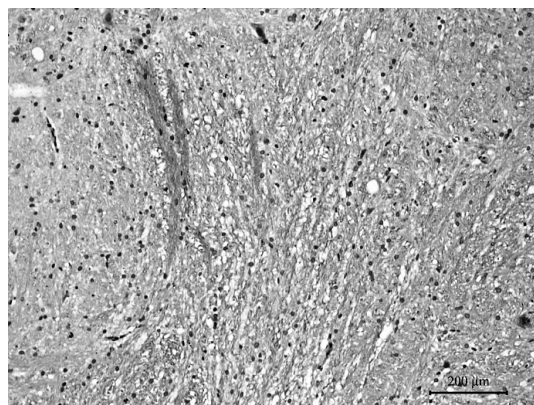
Проводящие миелиновые волокна такими защитными свойствами, по нашим данным, не обладают.

В результате проведенного гистохимического исследования было обнаружено устойчивое угнетение активности АХЭ и БХЭ в тканях головного мозга,

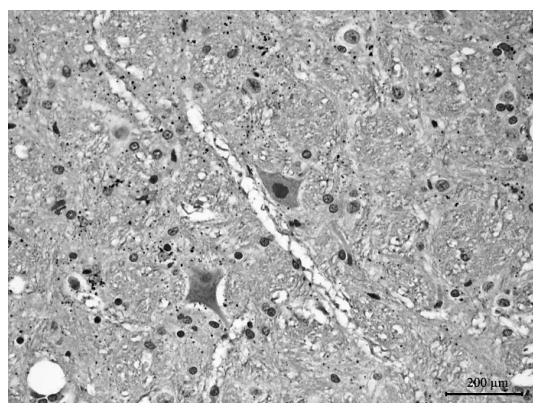
а наиболее стабильным и глубоким было изменение активности суммы неспецифических эстераз. Параллельно с этим снижалась и активность ХАТ — фермента, катализирующего синтез и ресинтез ацетилхолина в синапсах в проводниковых структурах про-



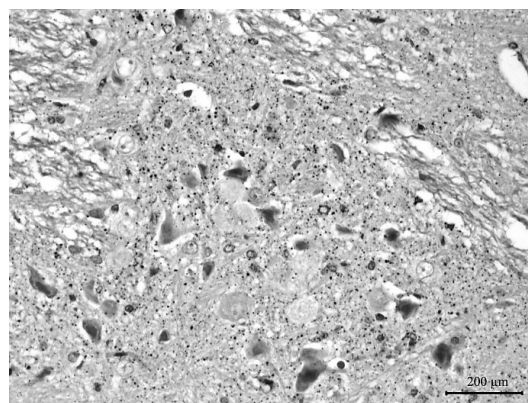
А (контроль)



В



С (контроль)



Д

Рис. 4. Снижение активности ХАТ в проводниковых структурах продолговатого мозга у животных опытной (В) группы по сравнению с контрольной (А). Антитела к ХАТ. ПАП-метод, докраска гематоксилином Майера.

Увеличение экспрессии PON2 в нейронах и на телах нейронов (Д) в продолговатом мозге у подопытного животного. Контроль (С). Антитела к PON2. ПАП-метод, докраска гематоксилином Майера.

Scale bar = 200 μm

долговатого мозга. Оба наблюдения не противоречат друг другу, так как, по-видимому, угнетение процесса синтеза нейромедиатора является следствием дефицита субстратов из-за ингибирования АХЭ молекулами ФОС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, согласно представленным данным, нейротоксичность, индуцированная малыми дозами хлорофоса в течение длительного периода времени, проявлялась комплексом изменений в головном мозге. На фоне угнетения активности АХЭ, БХЭ и неспецифических эстераз происходила индукция PON2, нарушение процесса ресинтеза ацетилхолина и деградация опорного белка цитоскеле-

та нейронов и аксонов NF200. В периферических нервных стволах процесс демиелинизации был выражен значительно меньше и наиболее наглядно проявлялся при иммуногистохимическом определении основного белка миелина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кононский А. И. Гистохимия. — Киев: Вища школа, 1976. — 178с.
2. Соколовский В. В. Гистохимические исследования в токсикологии. — Л.: Медицина, 1971. — 176 с.
3. Abou-Donia M. B. Organophosphorus pesticides / Handbook of Toxicology. — N. Y., 1995. — P. 419—473.
4. Giordano G., Cole T. B., Furlong C. E., et al. // Toxicol. Appl. Pharm. — 2011. — Vol. 256 (3). — P. 369—378.

5. Icenogle L. M., Christopher N. C., Blackwelder W. P., et al. // Neurotoxicol. Teratol. — 2004. — Vol. 26 (1). — P. 95—101.

6. Ray D. E., Richards P. G. // Toxicol. Teratol. — 2001. — Vol. 120 (1—3). — P. 343—351.

7. Salvi R. M., Lara D. R., Ghisolfi E. S., et al. // Toxicol. Sciences. — 2003. — Vol. 72 (2). — P. 267—271.

Контактная информация

Почепцов Александр Яковлевич — заведующий лабораторией патоморфологии, ФГУП Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии ФМБА России, e-mail: poshepcov@rihtop.ru.

УДК 616.8-003.996

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ КРУПНОКЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ГИПОТАЛАМУСА ПРИ ДЕФИЦИТЕ МАГНИЯ

**А. В. Смирнов, О. Ю. Евсюков, М. В. Шмидт, П. А. Хлопонин,
Г. Л. Снигур, А. А. Спасов, М. В. Харитоновна, А. А. Желтова**

*Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра патологической анатомии, кафедра фармакологии, кафедра биологии,
Ростовский государственный медицинский университет*

В работе представлены ультраструктурные изменения крупных нейронов гипоталамических ядер, их отростков, глиальных клеток при моделировании алиментарного дефицита магния в течение 8 недель. Выявлено преобладание обратимых повреждений митохондрий, белоксинтезирующего аппарата клеток, структурные проявления нарушений обмена миелина при дефиците магния.

Ключевые слова: гипоталамус, ядро, дефицит, магниевый, ультраструктура.

ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF MAGNOCELLULAR HYPOTHALAMIC NUCLEI WITH MAGNESIUM DEFICIENCY

**A. V. Smirnov, O. Y. Evsiukov, M. V. Shmidt, P. A. Khloponin,
G. L. Snigur, A. A. Spasov, M. V. Kharitonova, A. A. Zheltova**

This paper presents major ultrastructural changes of hypothalamic nuclei in modeling of nutritional deficiency of magnesium for 8 weeks. We revealed a prevalence of reversible damage of mitochondria, protein-synthesizing unit of cells, structural manifestations of myelin damage.

Key words: hypothalamus, nucleus, deficit, magnesium, ultrastructure.

В настоящее время накоплено большое количество данных о ключевой регуляторной роли ионов магния в функционировании нейронов. Магний является ключевым модулятором синаптической пластичности [4, 5], клеточного роста и пролиферации, а эффекты гипомagneзмии связаны с развитием воспаления, продукцией цитокинов, активацией фагоцитов с развитием оксидативного стресса [3, 8]. Индукция повреждения клеток, опосредованная оксидативным стрессом, была отмечена в различных тканях в условиях гипомagneзмии. Так, у магниевых-дефицитных крыс выявлено ускорение процессов инволюции тимуса как классического примера апоптоза [7]. Пищевой дефицит магния также индуцирует повреждение кардиомиоцитов, эндотелия и гладкомышечных клеток сосудов [1]. Механизмы оксидативного стресса тесно связаны с дисфункцией митохондрий, которые рассматривают как магниевые депо [6]. Одним из основных транспортных каналов для ионов магния являются белки TRPM7, локализующиеся в плазматических мембранах клеток и мембранах митохондрий [10]. Дефицит магния сопровождается изменением

экспрессии TRPM7 в нейронах крупноклеточных ядер гипоталамуса [2]. Поэтому изучение ультраструктурных изменений митохондрий при магниевой недостаточности представляет особый интерес. Многие аспекты ультраструктурных преобразований в центральной нервной системе, в частности, в гипоталамусе при алиментарном дефиците магния изучены мало, хотя имеются единичные сообщения об изменениях в гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системе [9] при моделировании альдостерон-зависимого дефицита магния.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить ультраструктурные преобразования паравентрикулярных и супраоптических ядер гипоталамуса при моделировании алиментарного дефицита магния.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали 20 половозрелых нелинейных белых крыс-самцов массой 220—260 г. Весь экспериментальный материал был разделен на 2 группы: