

На правах рукописи

Титов Евгений Алексеевич

**ТОКСИКО-ГИГИЕНИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ МОДЕЛИРОВАНИЮ РТУТНОЙ
ЭНЦЕФАЛОПАТИИ**

14.02.01 – гигиена

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск– 2011

Работа выполнена в Ангарском филиале Учреждения Российской академии медицинских наук Восточно-Сибирского научного центра экологии человека Сибирского отделения РАМН – Научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Соседова Лариса Михайловна

Научный консультант:

Кандидат медицинских наук

Голубев Сергей Степанович

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук
профессор

Осипенко Борис Гордеевич

кандидат биологических наук
доцент

Клименков Игорь Викторович

Ведущая организация:

**ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет»
Минздравсоцразвития России**

Защита диссертации состоится 30 сентября 2011 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д.208.032.02 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития РФ по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1.

Автореферат разослан «___» _____ 2011г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук,
профессор

Лемешевская Е. П.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В числе приоритетных и перспективных направлений, определенных на 3 Всероссийском съезде токсикологов (2008г.), были названы исследования механизмов отдаленных эффектов действия химических веществ, в том числе и избирательной нейротоксичности. Особую опасность для нервной системы представляют ртуть и ее соединения, поступающие в окружающую среду из природных и антропогенных источников. В рамках концепции, разрабатываемой добровольным Глобальным партнерством правительств по ртути с целью решения мировой проблемы выбросов этого трансграничного загрязнителя, угрожающего здоровью миллионов людей, указывается на необходимость расширения знаний об опасности и риске воздействия ртути на организм человека (Виноградова А.А., 2010).

Общепризнано, что ртуть нарушает процесс пролиферации клеток головного мозга, угнетает механизмы митоза, вызывает развитие периваскулярного и перичеллюлярного отека ткани мозга, дистрофию нейронов и клеток Пуркинье, изменение ферментативной активности (Ето Комуо, 1999; Кириллова Л.Б., 2001). Формирование органических изменений в нервной системе при воздействии ртути сопровождается появлением признаков токсической энцефалопатии с поражением пирамидной и экстрапирамидной систем, мозжечка, гипоталамической области, коры больших полушарий. Наряду с этим, есть основания полагать, что и после прекращения контакта с нейротоксикантом продолжают развиваться структурно-морфологические изменения в ЦНС, приводящие к прогрессивному течению интоксикации. Показано, что у работающих в производствах ртутного электролиза в постконтактном периоде нередко наблюдается прогрессирование нервно-психических нарушений, вплоть до формирования токсических энцефалопатий (Ефимова Н.В., 2001; Лахман О.Л. и соавт., 2003, 2008, Рукавишников В.С., 2005).

Вместе с тем, в последнее десятилетие по морфологическим аспектам нарушений структуры нервной ткани при ртутной интоксикации выполнены немногочисленные исследования, в которых, в основном, представлены результаты секционного обследования лиц, подвергавшихся хроническому воздействию ртути (Eyer F., 2006; Feitosa-Santana C, 2008). Остаются недостаточно изученными особенности и закономерности формирования патологии нервной ткани в отдаленный период после прекращения контакта с ртутью и ее неорганическими соединениями (НСР); практически отсутствуют данные о характере структурных нарушений нервной ткани при ртутной интоксикации в динамике постконтактного периода; морфологические основы прогрессирования ртутного поражения нервной системы и методические подходы к моделированию токсической энцефалопатии с позиции морфометрии. Отсутствуют данные об отдаленных нейротоксичных эффектах сулемы, как эталонного представителя неорганических соединений ртути.

Вместе с тем, в натуральных условиях достаточно трудно оценить степень и характер патоморфологических изменений в ткани головного мозга, а также дифференцировать влияние на ответную реакцию организма того или иного усугубляющего фактора, в то время как при биомоделировании возможно создание необходимых условий, полностью соответствующих целям и задачам

эксперимента. Экспериментальное моделирование дает возможность оценить метаболизм, морфометрические и гистохимические изменения различных отделов головного мозга с выявлением локализации патологического процесса. Разработка методических подходов к исследованию особенностей и закономерностей воздействия НСР на нервную систему позволит решить актуальные вопросы поиска патогенетически обоснованных критериев диагностики, эффективных методов терапии и профилактики отдаленных эффектов ртутной нейроинтоксикации работающих и населения.

Учитывая высокую актуальность проблемы нейротоксичности, а также соответствующую направленность многолетних клинических исследований Института, посвященных отдаленным последствиям профессиональных поражений нервной системы, представляется перспективным проведение экспериментальной работы, способной в той или иной степени раскрыть сложные механизмы многообразных ответов нервной системы на экзогенную интоксикацию ЦНС металлической ртутью и её неорганическими соединениями.

Цель работы

Цель настоящей работы состояла в изучении особенностей морфофункциональных изменений нервной ткани в динамике постконтактного периода при экспериментальной интоксикации парами металлической ртути и сулемой с разработкой методических подходов к моделированию токсической энцефалопатии с позиции морфометрии.

Задачи исследования:

1. Изучить характер морфофункциональных нарушений ткани головного мозга белых крыс в динамике постконтактного периода интоксикации парами металлической ртути и сулемой.
2. Провести сравнительный анализ особенностей и общих закономерностей морфофункциональных изменений нервной ткани при воздействии паров металлической ртути и сулемы.
3. Обосновать морфологические критерии токсического поражения головного мозга белых крыс при воздействии паров металлической ртути и сулемы.
4. Разработать методические подходы к моделированию ртутной токсической энцефалопатии с позиции морфометрии для изучения общих закономерностей воздействия неорганических соединений ртути на организм человека.

Научная новизна:

Получены новые данные об общих закономерностях поражения нервной ткани белых крыс в отдаленном периоде интоксикации НСР (металлическая ртуть и сулема), характеризующихся длительно сохраняющимися дистрофическими изменениями нейронов коры головного мозга и клеток Пуркинье в мозжечке, снижением количества нормальных нейронов на единицу площади, увеличением размеров ядер нейронов. Впервые проведенное иммуногистохимическое исследование экспрессии нейроспецифических белков в нервной ткани, выявившее снижение глиального фибриллярного кислого белка – GFAP и белка S-100, наряду с повышением нейронспецифической енолазы – NSE, свидетельствует о нарушениях функционального состояния нейронов и клеток астроглии и формировании в постконтактном периоде нейродегенеративных процессов.

Отличительной особенностью формирования нейроинтоксикации, вызванной сулемой, является развитие выраженного реактивного глиоза ткани головного мозга, в то время как при воздействии паров металлической ртути, напротив, отмечается гибель клеток астроглии. Установлено, что при интоксикации парами металлической ртути в динамике постконтактного периода нарастают процессы демиелинизации отростков нейронов, которые не выявляются при интоксикации сулемой.

Впервые разработаны методические подходы к моделированию токсической энцефалопатии для изучения общих закономерностей воздействия неорганических соединений ртути с позиции морфометрии. Обоснованы морфологические критерии токсического поражения головного мозга белых крыс при воздействии паров металлической ртути и сулемы.

Практическая значимость:

Практическая значимость определялась экспериментальным доказательством сохранения и прогрессирования структурно-морфологических поражений ткани головного мозга в отдаленном постконтактном периоде интоксикации НСР. Полученные данные послужат базой для понимания механизмов отдаленной нейротоксичности НСР, а также при разработке целенаправленных методов диагностики и лечения структурно-функциональных нарушений в постконтактном периоде ртутной нейроинтоксикации.

По материалам исследований разработана экспериментальная модель токсической энцефалопатии на животных, что позволяет рекомендовать ее к использованию при апробации новых методов диагностики, профилактики и лечения токсической энцефалопатии (патент на изобретение «Способ моделирования отдаленной токсической энцефалопатии» № 2341828 от 20.12.2008 г.). Научное обоснование морфологических критериев токсического поражения головного мозга белых крыс при воздействии паров металлической ртути и сулемы позволило подать в ФИПС заявку на изобретение «Способ диагностики ртутной энцефалопатии у мелких лабораторных животных» (от 20.05.2011 г.). Основные положения работы включены в лекционный материал кафедры профпатологии и гигиены Иркутского ГИУВа и используются в педагогической и научной деятельности на базе учебно-образовательного центра Ангарского филиала ВСНЦ экологии человека СО РАМН – НИИ медицины труда и экологии человека.

Положения, выносимые на защиту:

1. Следствием воздействия паров металлической ртути и сулемы на белых крыс является прогрессирующее в отдаленном постконтактном периоде нейродегенеративное поражение нервной ткани, характеризующееся нарушением ультраструктуры нейронов, снижением их общей численности и дистрофическими процессами в нейронах коры головного мозга и клетках Пуркинье, изменением количества клеток астроглии.

2. Нейродегенеративные процессы в нервной ткани животных с ртутной нейроинтоксикацией сопровождаются нарушением экспрессии нейроспецифических белков (кислого глиального фибриллярного белка, S-100, нейронспецифической енолазы) в коре головного мозга.

Публикации:

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 5 – в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобразования и науки РФ.

Апробация работы:

Результаты проведенных исследований были доложены и обсуждены на: Межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины» (Иркутск, 2006 г.), Всероссийской конференции молодых ученых «Экология в современном мире: взгляд научной молодежи», (Улан-Удэ, 2007 г.), 8-м Международном Конгрессе Молодых ученых, (Томск, 2007), 5-й Конференции молодых ученых России «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» (Москва, 2008 г.), 2-м Санкт-Петербургском международном экологическом форуме «Окружающая среда и здоровье человека – 2008» (СПб, 2008 г.), 3-м съезде токсикологов России (Москва, 2008 г.), Межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 10-летию организации Научных Центров ВСНЦ СО РАМН (Иркутск, 2008 г.), Всероссийской конференции «Химическая безопасность РФ в современных условиях» (СПб, 2010 г.), Международном симпозиуме «Новые направления в токсикологических исследованиях» (Одесса, 2010 г.), Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» посвященной 120-летию со дня основания Института экспериментальной медицины (СПб, 2010 г.)

Личный вклад автора

Автором сформулированы цель и задачи исследований, определены объекты, методы и объем работы. Осуществлен ряд экспериментов по воздействию НСР на организм экспериментальных животных (белых крыс), проведен гистологический анализ материалов, а также морфометрический анализ результатов электронной микроскопии, иммуногистохимии и обзорной микроскопии препаратов нервной ткани белых крыс. Выполнено формирование базы данных и обработка полученных результатов, проведено их обобщение и обсуждение, выполнено оформление диссертации, подготовлены публикации по теме диссертации.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка литературы. Содержит 23 рисунка и 22 таблицы. Изложена на 129 страницах. Список литературы содержит 241 источников (45 отечественных и 196 зарубежных).

Диссертация выполнена по материалам НИР 019 Ангарского филиала ВСНЦ ЭЧ СО РАМН: «Изучение закономерностей формирования нарушений церебрального гомеостаза в отдаленном периоде профессиональных интоксикации у работающих» (номер государственной регистрации № 01200500603) и НИР 021 «Изучение механизмов формирования поражения нервной системы при воздействии производственных нейротоксикантов различной химической природы» (номер государственной регистрации №01200803591).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для решения поставленных задач были проведены комплексные поэтапные исследования, включающие в себя токсикологические, гистологические, электронно-микроскопические, иммуногистохимические методы и методы количественной и статистической оценки полученного материала.

Для моделирования ртутной нейроинтоксикации были проведены экспериментальные исследования на белых крысах-самцах, полученных путем собственного воспроизводства в виварии института Ангарского филиала ВСНЦ ЭЧ СО РАМН. Хроническое ингаляционное воздействие на животных ($n=30$) проводили в 200-литровых газовых камерах в зимний период (совместно с к.м.н. Хомуевым Г.Д. и к.б.н. Якимовой Н.Л.). Воздействие парами металлической ртути длилось в течение 7 недель, по 4 часа ежедневно, исключая выходные дни. Средняя концентрация ртути в камере составляла $0,61 \pm 0,05 \text{ мг/м}^3$ (выполнено лабораторией ЛФХМИ, зав. лабораторией физико-химических методов исследования д.б.н., проф. Дорогова В.Б). Белым крысам контрольной группы ($n=30$) в том же режиме подавался чистый воздух. Моделирование нейроинтоксикации сулемой проводили путем парентерального ее введения из расчета 0,05 мг на 100 г массы животного (расчет по ртути) в физиологическом растворе ежедневно по 5 дней в неделю в течение 7 недель ($n=30$). Белые крысы контрольной группы ($n=30$) в том же режиме получали физиологический раствор. Определение содержания ртути в различных отделах головного мозга выполняли на анализаторе ртути «Юлия- 2» с расширенным диапазоном измерений и цифровым отсчетом показаний (совместно с м.н.с. лаборатории физико-химических методов исследования Рычаговой О.А.).

Обследование белых крыс проводили в 2 этапа: непосредственно после окончания воздействия (1 срок) и через 9 недель после окончания воздействия (2 срок). Экспериментальное моделирование выполняли в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986) и требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к Приказу Минздрава СССР от 12.08.1977г. №775).

В основу выбора областей головного мозга белых крыс для проведения морфологических исследований были положены данные литературы и результаты углубленного клинического обследования лиц с хронической ртутной интоксикацией (ХРИ), проведенного в условиях клиники Института, свидетельствующие о наличии у больных симптомов, характерных для функциональных нарушений коры головного мозга, мозжечка, гиппокампа (Ллахман О.Л. и соавт., 2008 Komyo Eto et al., 1999;). В связи, с чем у лабораторных животных изучали кору головного мозга, как нервный центр, деятельность которого обеспечивает регуляцию разнообразных функций организма и сложные формы поведения, куда поступают сигналы от всех главных сенсорных образований. Мозжечок исследовали, как центр равновесия, поддержания мышечного тонуса, координации движений и контроля сложных и автоматически выполняемых двигательных актов. Учитывая результаты экспериментальных исследований, выполненных в лаборатории токсикологии АФ ВСНЦ ЭЧ СО РАМН Якимовой Н.Л. (2010), показавших нарушения кратковременной и долговременной памяти белых крыс с ртутной нейроинтоксикацией, исследовали гиппокамп, как центр, ответственный за хранение и реализацию условных рефлексов.

Для оценки нейротоксических эффектов воздействия НСР на нервную ткань выполняли послойные фронтальные, сагиттальные и горизонтальные срезы головного мозга с шагом в 5 микрон. Состояние тканей анализировали после окраски срезов гематоксилин-эозином и тионином по методу Ниссля. Для выявления экспрессии нейроспецифических белков S 100, GFAP и NSE в тканях

головного мозга белых крыс использовали метод иммуногистохимического анализа. Исследования выполняли 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). Для оценки экспрессии антигенов и активности ферментов использовали четырехбалльную систему. Исследование гистологических препаратов проводили на микроскопе Olympus BX 51 (Япония).

Для изучения ультраструктуры оценивали состояние нейропиля и нервных клеток. В процессе микроскопии измеряли количество и площадь сечения митохондрий и ядер нейронов в различные сроки интоксикации, а также интенсивность демиелинизации отростков нейронов. Исследование ультраструктуры проводили в центре коллективного пользования Иркутского Лимнологического Института СО РАН (зав. д.б.н., Лихошвай Е.В.) на электронном микроскопе Leo 906E (Zeiss, Германия). Морфометрическое исследование препаратов выполняли с помощью компьютерной микроскопической видеосистемы "Quantimet 550IW" (Leica, Англия), предназначенной для цифрового анализа патоморфологического и цитологического материала с камерой высокого разрешения, с форматом изображения 6000x4000 пикселей, позволяющей проводить количественный анализ изображения по реальным цветам или оптическим плотностям. Обработку полученных изображений осуществляли с использованием входящих в программный пакет Leica QWin16 методик стереологических исследований.

Морфометрический анализ ткани головного мозга включал в себя стереологические и морфометрические методы гистометрии: обзорную оценку состояния ткани мозга, подсчет общей численной плотности нейронов, число дистрофически измененных нейронов в различных слоях коры головного мозга. В каждом образце оценивали степень и характер повреждения того или иного нейрона, а также общие закономерности распространения патологического процесса по органу в целом. Степень повреждения оценивали по состоянию цитоплазмы и ядра клеток. Всего было выполнено 10800 гистологических и морфометрических исследований.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft) (лиц № AXXR004E642326FA). Проверку значимости различий выборок изучаемых показателей контрольных и экспериментальных животных проводили при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни, так как сравниваемые выборки не удовлетворяли условиям нормальности распределения.

Работа выполнена в Ангарском филиале ВСНЦ ЭЧ СО РАМН. Институт соответствует установленным требованиям по разработке санитарно-гигиенических и эпидемиологических нормативных документов и имеет Сертификат аккредитации Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № СА 13.98 от 31.03.2005г. и Аттестат аккредитации испытательной лаборатории № ГСЭН.RU.ЦОА.149, зарегистрированный в Государственном реестре №РОСС.RU.0001.510164 от 27.06.2007г., а также Лицензию на осуществление медицинской деятельности № ФС – 38-01-000865 от 23.06.2009 г.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование ртутной нейроинтоксикации на лабораторных животных при ингаляционном воздействии парами металлической ртути и парентеральном введении сулемы дает возможность выявить наиболее характерные морфофункциональные нарушения нервной ткани белых крыс в динамике постконтактного периода.

Учитывая мнение Красовского Г.Н. (1980), о том, что именно кумуляция ртути в ЦНС обуславливает клинические проявления нейроинтоксикации в постконтактном периоде, был выполнен анализ содержания ртути в ткани головного мозга белых крыс. Установлено, что ионы ртути, как при воздействии паров, так и при введении сулемы, длительно аккумулировались в нервной ткани, причем большая их часть содержалась в стволовой части мозга, что подтверждают литературные данные о большей тропности ртути к глуболежащим отделам головного мозга (Трахтенберг И.М., 1969; Курляндский Б.А., 2002; Плетенева Т.В., 2005.). Как показали наши исследования, ионы металла интенсивно накапливались и в сенсомоторной коре. Через 9 недель после воздействия, несмотря на интенсивное выведение токсиканта, полной его элиминации из головного мозга белых крыс не происходило, следовательно, даже незначительные концентрации ионов ртути могут длительное время поддерживать, а в некоторых случаях, даже усугублять, морфофункциональные нарушения в нервной ткани.

Характер нарушений ткани головного мозга белых крыс при воздействии паров металлической ртути в динамике постконтактного периода показывает изменения, имеющие различную степень выраженности в зависимости от срока обследования. В течение всего постконтактного периода в препаратах нервной ткани отмечается выраженный перипеллюлярный и периваскулярный отек, интенсивность последнего остается постоянной на протяжении всего периода наблюдения. Известно, что периваскулярный отек приводит к нарушению трофики нейронов, вследствие снижения поступления питательных веществ в клетки (Быков В.Л., 2001). Подтверждением этому служит высокое число нейронов коры головного мозга с признаками дистрофии у животных опытной группы, имевшее в оба срока обследования статистическую значимость. Наиболее выраженные нарушения отмечаются в первый срок обследования (рис.1). В отдаленном периоде количество дистрофически измененных нейронов снижается, однако, по-прежнему, остается на довольно высоком уровне. В целом, их число в 1 срок обследования составляет 12,4% от общего количества клеток, а во второй срок – 8,9%. Наличие дистрофически измененных нейронов в отдаленном периоде ртутной интоксикации, свидетельствует о вовлечении в патологический процесс новых клеток и является подтверждением сохранения и прогрессирования патологического процесса в нервной ткани.

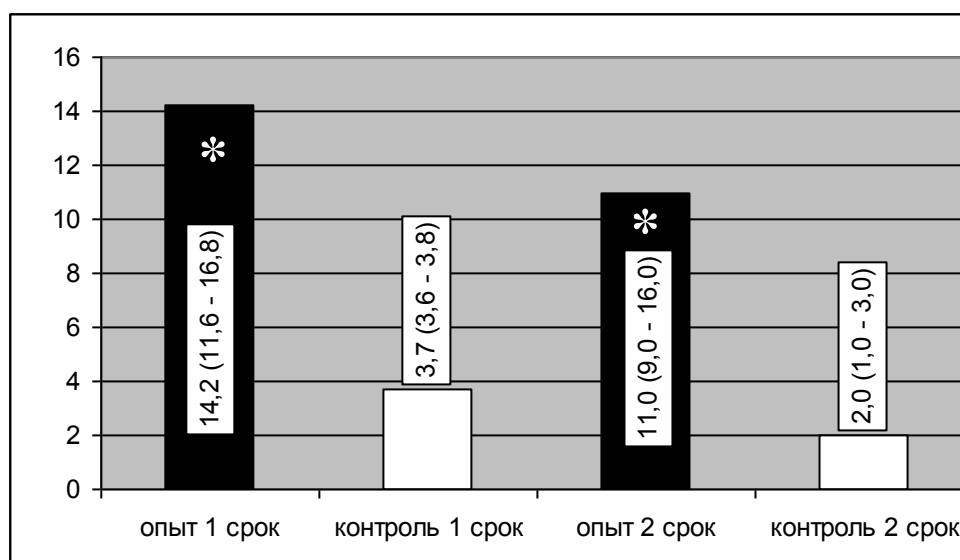


Рис.1 Число дистрофически измененных нейронов коры головного мозга на единицу площади гистологического препарата ($0,2 \text{ мм}^2$) при интоксикации парами металлической ртути в динамике обследования. Примечание:* - значения статистически значимы по сравнению с контролем, при $p < 0,05$. Статистическая значимость рассчитывалась по Манна-Уитни.

Общая численная плотность нормальных нейронов коры головного мозга на единицу площади в первый срок обследования снизилась на 50% по сравнению с контролем, в динамике обследования сокращение составило 51%. В оба срока выявлено набухание проводящих волокон нервной ткани.

Наряду с этим, в препаратах коры головного мозга на протяжении всего периода наблюдения отмечалось повышение экспрессии NSE (табл.1).

Таблица 1

Экспрессия белка S100, GFAP и NSE в коре головного мозга белых крыс при интоксикации парами металлической ртути в динамике обследования(усл.ед) . Med ($Q_{25} - Q_{75}$).

Группы	S100		NSE		GFAP	
	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль
1 срок	1 (1-1)*	4 (4-5)	5 (5-5)*	3 (3-3)	1 (1-1)*	4 (4-5)
2 срок	3 (3-3,5)*	4 (4-5)	4 (4-4)*	3 (3-3)	3 (3-3)*	4 (4-5)

Примечание:* - различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$.

Данный фермент-специфический маркер дифференцированных центральных и периферических нейронов. Известно, что экспрессия NSE увеличивается при нейродегенеративных процессах (Чехонин В.П., 2000). При непосредственном вовлечении нервной ткани в патологический процесс, качественные и количественные определения данного белка, являющегося гликолитическим ферментом и участвующем в расщеплении глюкозы, предоставляют информацию о степени повреждения нейронов и характеризуют прогрессивность патологического состояния. Наряду с этим, по мнению Чехонина В.П. (2000г.), повышенное содержание NSE в спинномозговой жидкости отражает эффективность терапии и характерно при нейродегенеративных нарушениях. Следовательно, высокая экспрессия NSE подтверждает выявленные нами структурные нарушения нейрональных клеток и свидетельствует о формировании нейродегенеративного процесса. По нашему мнению, у лиц с острым отравлением

НСР или в отдаленном постконтактном периоде после воздействия НСР, необходимо определение содержания NSE в крови и спинномозговой жидкости, как одного из маркеров нейронального повреждения и развития нейродегенеративного процесса.

О наличии метаболических нарушений в нейронах коры головного мозга при воздействии паров металлической ртути свидетельствует изменение размеров митохондрий, их отечность и появление признаков распада митохондрий, выявляемых при электронно-микроскопическом исследовании. В целом, количество наблюдаемых в поле зрения (16мкм²) митохондрий, как отростков, так и перикариона нейронов и, соответственно, их суммарная площадь в оба срока исследования в опытной группе были ниже, чем в контроле (табл.2). В отдаленном периоде обследования выявлялось некоторое повышение средней площади митохондрий в 1,3 раза по сравнению с первым сроком, связанное с появлением большего их количества в поле зрения, но показатели оставались значительно ниже, чем в препаратах контрольных животных. Данный факт указывает на отсутствие полного восстановления структуры митохондрий в отдаленном периоде интоксикации.

Таблица 2

Площадь митохондрий в головном мозге белых крыс при интоксикации парами металлической ртути в динамике обследования, (мкм²). Med (Q₂₅ – Q₇₅)

Срок обследования	Опытная группа	Контрольная группа
1 срок	2,75 (1,61-10,74)	7,24 (1,77-17,16)
2 срок	3,48 (1,92-7,98)	5,57 (1,92-8,52)

В то же время площадь ядер нейронов в препаратах опытных крыс в оба срока наблюдения была статистически значимо увеличена по сравнению с таковой у контрольных животных (рис.2). Наблюдалась деформация ядер, ядерный хроматин располагался глыбками по периферии клетки, что, по-нашему мнению, обусловлено дистрофическими процессами в нервных клетках. В отдаленном периоде интоксикации площадь ядер существенно не снижалась, следовательно, в клетке продолжали развиваться дистрофические процессы. Повреждение ядра дискоординирует функции цитоплазмы, вызывает нарушение синтеза белков, которые в совокупности с нарушением метаболической активности митохондрий могут приводить к структурно-функциональным изменениям в нервных клетках, запуская при этом цепь патологических процессов (Быков В.Л., 2001, Адо А.Д., 2002).

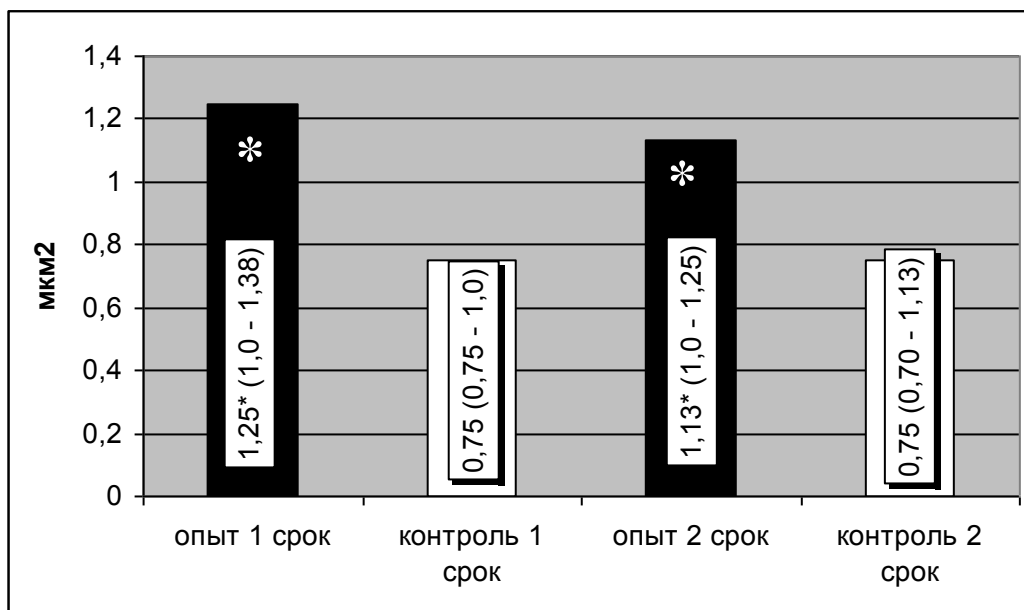


Рис.2. Площадь ядер в коре головного мозга при интоксикации парами металлической ртути в динамике обследования, (мкм²). Примечание:* - различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p < 0,05$. Статистическая значимость рассчитывалась по Манна-Уитни.

Ультраструктурный анализ нейронов коры головного мозга выявил отдельные участки демиелинизации отростков нервных клеток. В отдаленном периоде интоксикации наблюдалось усиление демиелинизации отростков, с разрывом миелиновых пластин вплоть до цитолеммы нейрона. Воздействие паров металлической ртути вызывало выраженную реакцию глии, проявляющуюся в статистически значимом снижении числа профилей глиальных клеток- $29,2 \pm 0,5$ в $0,2 \text{ мм}^2$ нервной ткани в сравнении с контрольными величинами (соответственно $51,7 \pm 4,7$). При обследовании во второй срок общее количество профилей глиальных клеток повышалось на 44,4%, но, все же, оставалось значимо ниже, чем в контрольной группе, что свидетельствует о незначительном восстановлении количественных характеристик структуры астроглиальной ткани в динамике постконтактного периода.

Нарушение функционального состояния глиальных клеток подтверждает иммуногистохимический анализ экспрессии нейроспецифических белков S100 и GFAP. На протяжении всего постконтактного периода в препаратах нервной ткани белых крыс с ртутной интоксикацией наблюдалось снижение экспрессии нейроспецифического цитоплазматического белка S100 (табл.1), являющегося маркером дифференцированной глии и участвующего в регуляции обучения и запоминания. Несмотря на увеличение экспрессии белка S100 в ткани головного мозга в отдаленном периоде ртутной интоксикации, данный показатель оставался все же достоверно значимо ниже контрольных значений. Учитывая, что уровень S100 в клетке (преимущественно в астроцитах) контролируется скоростью синтеза, а не деградации, можно предположить о нарушении функциональных синтетических процессов в клетках астроглии при воздействии паров металлической ртути.

Наряду с этим, уменьшилась в первый срок обследования и экспрессия GFAP, также характеризующего функциональное состояние астроцитов (табл.1). Чехонин В.П. (2000) связывает снижение экспрессии GFAP в нервной ткани с энергетическим дефицитом, а также нарушением стабильности цитоскелета

астроцитов, и их формы, определяемых при обзорной микроскопии, как дегенеративно-дистрофические явления глии, что в совокупности затрудняет осуществление структурно-динамической связи между ядром и внешней оболочкой клетки с её экстрацеллюлярным окружением. Во 2 срок обследования уровень экспрессии GFAP, несмотря на незначительное повышение, оставался пониженным по сравнению с контрольной группой. Учитывая, что глиальные клетки являются составляющими структурными элементами гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), принимая участие в регуляции его проницаемости, нарушение их функционального состояния, наблюдаемое при ртутной интоксикации, позволяет сделать предположение о снижении барьерной функции ГЭБ и изменении его проницаемости в динамике патологического процесса.

Морфологический анализ мозжечка показал отсутствие статистически значимого повышения количества клеток Пуркинью с признаками дистрофии у экспонированных ртутью животных в 1 срок обследования, по сравнению с контрольной группой, что обусловлено, по-нашему мнению, интенсивным разрушением поврежденных клеток и, как следствие, снижением их общего количества в ткани. Однако соотношение числа клеток Пуркинью с признаками дистрофии к нормальным в опытной группе было выше, чем аналогичное соотношение в контрольной группе. Повреждение ткани мозжечка белых крыс в отдаленном постконтактном периоде характеризовалось нарастанием числа дистрофически измененных клеток Пуркинью, как по сравнению с контрольной группой (соответственно 5,6 (5,3-8,4) и 3,06 (2,69-4,1), ($p < 0,002$), так и в динамике эксперимента (соответственно 1 срок - 3,6 (3,2 – 4,9), 2 срок - 5,6 (5,3-8,4), ($p < 0,05$), что способствовало усугублению дисфункции мозжечка.

При морфометрии гранулярного слоя мозжечка установлено, что его толщина у белых крыс с ртутной интоксикацией при обследовании сразу после воздействия не имела значимого отличия от животных контрольной группы. Однако в отдаленном периоде интоксикации отмечалось снижение толщины гранулярного слоя, как по сравнению с 1 сроком обследования (соответственно 1 срок - 13,8 (13,5-14,2) мкм, 2 срок - 9,7 (8,7-11,3) мкм, ($p < 0,05$), так и с контрольной группой - 11,8 (10,9-12,4) мкм, ($p < 0,05$), что может быть связано с гибелью гранулоцитов в результате нарастания дистрофического процесса. Полученные результаты свидетельствуют о том, что первоначально при ртутной интоксикации повреждения в ткани мозжечка отмечались только в ганглионарном слое, тогда как в отдаленном периоде патологический процесс захватывает уже и гранулярный слой.

Вышеуказанные изменения в ткани головного мозга сопровождаются нарушением нормального соотношения между процессами возбуждения и торможения в коре головного мозга животных, с преобладанием первоначально процессов возбуждения с последующим развитием процессов торможения. Исследованиями, проведенными в лаборатории токсикологии Ангарского филиала ВСНЦ ЭЧ СО РАМН, установлено, что нейроинтоксикация белых крыс, получивших ингаляционное воздействие парами металлической ртути, сопровождалась нарушением ориентировочно-исследовательского и эмоционального поведения, выразившихся в увеличении тревожности, агрессивности, негативной эмоциональности, нарушении локомоторной

активности (Якимова Н.Л., 2010). Важно отметить, что на протяжении всего эксперимента у животных сохранялась повышенная агрессивность.

Морфофункциональные нарушения нервной ткани подтверждаются результатами изучения биоэлектрической активности в коре головного мозга белых крыс с ртутной интоксикацией (Якимова Н.Л., 2010). У животных опытной группы влияние паров металлической ртути на естественную электрическую активность нейронов, биопотенциалы и головной мозг в целом выразилось в преобладании медленноволновой активности при проведении различных проб, нестабильностью доминирующих ритмов и меньшей реакцией амплитудных значений в ответ на фотостимуляцию. В раннем постконтактном периоде ртутной интоксикации у животных наблюдалось увеличение амплитуды основных ритмов ЭЭГ. Напротив, в отдаленном периоде амплитуда основных ритмов ЭЭГ снизилась, что указывает на формирование в нервной ткани относительно неблагоприятного метаболического и функционального состояния. В своих исследованиях Мурик С.Э. (2003) предполагает, что такие изменения свидетельствуют уже не о функциональном, а об органическом поражении головного мозга. Данное предположение подтверждает наличие сохраняющихся изменений биопотенциалов мозга в отдаленном периоде обследования и нарушение корково-подкорковых взаимосвязей, проявляющихся в изменении коркового зрительного ответа. Выявленные нейротоксические эффекты воздействия паров металлической ртути на показатели биоэлектрической активности коры головного мозга сохранялись, продолжительный период времени, что свидетельствует о стойкой дестабилизации ритмической активности головного мозга.

Таким образом, выявленные морфологические нарушения нервной ткани животных с ртутной интоксикацией можно рассматривать, как один из элементов морфологического эквивалента нарушения целостной структуры поведения и биоэлектрической активности головного мозга.

На следующем этапе экспериментального моделирования для сравнительной оценки эффектов нейротоксичности паров металлической ртути и её неорганических соединений был выполнен ряд экспериментов по подкожному введению сулемы, являющейся эталонным представителем солей ртути, обладающей характерными особенностями данной группы веществ. Установлено, что в 1 срок обследования интоксикация сулемой вызывает развитие в нервной ткани периваскулярного и перипеллюлярного отека. В динамике постконтактного периода, периваскулярный отек крупных и мелких сосудов коры головного мозга сохранялся. Структурные нарушения в коре головного мозга характеризовались высокой распространенностью дистрофии нейронов коры (табл. 3), сокращением плотности расположения нормальных нейронов на единицу площади нервной ткани, которая в первый срок наблюдения снизилась на 26,8%, по сравнению с контролем, во второй срок на 42%. При этом в динамике постконтактного периода количество нормальных нейронов у животных опытной группы уменьшилось на 20,8%.

Таблица 3

Количество дистрофически измененных нейронов коры головного мозга при интоксикации сулемой в динамике обследования (в $0,2\text{мм}^2$). Med ($Q_{25} - Q_{75}$).

Группы животных	1 срок (абсолютная величина)	2 срок (абсолютная величина)
Опытная группа	12,0 (10 – 15)*	9,0 (7 – 11)*♦

Контрольная группа	2,0 (2 – 3)	3,0 (2-3)
--------------------	-------------	-----------

Примечание:* - различия статистически значимы при сравнении с контрольной группой при $p < 0,05$; ♦ - различия статистически значимы при сравнении опытных групп в динамике обследования при $p < 0,05$.

Ультраструктурный анализ показал, что при воздействии сулемы суммарная площадь митохондрий в 1 срок наблюдения была статистически значимо ниже по сравнению с соответствующими значениями контрольной группы (табл. 4). Митохондрии выглядели набухшими, кристы митохондрий расширены. Учитывая, что митохондрии являются энергетической составляющей клетки, снижение их площади влияет на энергетическое обеспечение клеток головного мозга и, наряду с повреждением сосудов головного мозга, запускает патологический процесс, ведущий к дистрофии нейронов. Вместе с тем, в отдаленном периоде площадь митохондрий достигла контрольных значений, что позволяет предположить функциональное восстановление митохондрий в отличие от ответной реакции на воздействие паров металлической ртути. Площадь ядер нейронов на протяжении всего периода интоксикации оставалась увеличенной по сравнению с контрольной группой, следовательно, в клетке продолжалось развитие патологического процесса (табл. 4). При интоксикации сулемой не выявлено видимой демиелинизации отростков нервных клеток, ярко выраженной при ртутной интоксикации.

Таблица 4

Средняя площадь митохондрий и ядер в головном мозге белых крыс при интоксикации сулемой в динамике обследования, ($\mu\text{км}^2$). Med ($Q_{25} - Q_{75}$).

Срок обследования	Опытная группа		Контрольная группа	
	Митохондрии	Ядра	Митохондрии	Ядра
1 срок	2,4 (0,18-0,54)*	1,0 (0,88–1,13) *	3,9 (0,31-0,62)	0,75 (0,75–0,88)
2 срок	4,8 (0,38-0,55) *♦	1,1 (0,88–1,2) *	4,2 (0,28-0,58)	0,75 (0,75–0,9)

Примечание:* - различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p < 0,05$; ♦ - значения статистически значимы при сравнении площади митохондрий в опытных группах в динамике обследования при $p < 0,05$.

Структурные нарушения в коре головного мозга белых крыс с интоксикацией сулемой в 1 срок обследования характеризовались возрастанием как общего числа клеток астроглии, так и их количества с явлениями вакуолизации, свидетельствующей о нарушении их функционального состояния (табл.5). Выраженная пролиферация (глиоз) астроглиальных элементов, представляет собой процесс заместительной гиперплазии в ответ на гибель нейронов. Согласно мнению ряда авторов (Трахтенберг И.М., 1969; Это Комио, 1999; Чехонин В.П., 2000 и др.), реактивный глиоз является наиболее часто наблюдаемой реакцией астроцитов, находящихся рядом с зоной повреждения нервной ткани и сопровождает демиелинизирующие и дегенеративные заболевания ЦНС. В отдаленном периоде интоксикации сулемой морфологический анализ ткани коры головного мозга показал уменьшение числа глиальных клеток, по сравнению с первым сроком обследования. Однако их количество было все еще достоверно выше, чем у контрольных животных, а число клеток астроглии с признаками вакуолизации в динамике постконтактного периода оставалось на прежнем уровне (табл.5).

Таблица 5

Количество клеток астроглии в коре головного мозга при интоксикации сулемой в динамике обследования (в 0,2 мм²). Med (Q₂₅ – Q₇₅).

Группы животных	Общее количество клеток астроглии (абсолютная величина)		Количество вакуолизированных клеток астроглии (абсолютная величина)	
	опыт	контроль	опыт	контроль
1 срок обследования	83,0(57–119)*	53,5(50–55)	10,0(8–13)*	3,0(3–5)
2 срок обследования	59,0(54–65) *	55,0(52–57)	10,0(8–14)*	3,0(2–5)

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

Нарушение функционального состояния клеток астроглии подтверждает наблюдавшееся снижение экспрессии GFAP в нервной ткани в 1 срок обследования (табл.6), которое свидетельствует о постепенном прекращении процессов пролиферации и нарастании процессов дегенерации в глиальной ткани. Последнее характеризуется возросшим количеством вакуолизированных клеток астроглии, значимо большее по сравнению с контролем. Иммуногистохимическое определение белка S-100 в этот же срок обследования, также выявило снижение его экспрессии по сравнению с контрольной группой. В отдаленный период интоксикации экспрессия нейроспецифических белков (GFAP и S100) в нервной ткани сохраняла аналогичную направленность, оставаясь значимо ниже, чем у контрольных групп животных, что позволяет высказать предположение о сохранении морфофункциональных нарушений нейроглии, несмотря на восстановление числа клеток астроглии (табл.6).

Таблица 6

Экспрессия GFAP и S 100 при интоксикации сулемой в динамике обследования. (усл.ед) Med (Q₂₅ – Q₇₅).

Группы	Экспрессия GFAP в ткани головного мозга,		Экспрессия S 100 в ткани головного мозга,	
	опыт	контроль	опыт	контроль
1 срок	3 (3-3)*	4 (4-5)	3 (3-3)*	4 (4-5)
2 срок	3 (3-3)*	4 (4-5)	3 (3-3,5)*	4 (4-5)

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

Воздействие сулемы вызывало утолщение слоев гиппокампа в зоне CA1, CA2 и CA3, которое сохранялось и в отдаленном периоде. При обследовании ткани мозжечка сразу после окончания введения сулемы обращало на себя внимание наличие вакуолизации белого вещества, полнокровие крупных и мелких сосудов. В отдаленном периоде в белом веществе мозжечка наблюдалось незначительное очаговое набухание волокон проводящих пучков. В динамике постконтактного периода значимо уменьшилась толщина гранулярного слоя мозжечка у белых крыс с интоксикацией сулемой. У этих же животных клетки Пуркинье с признаками дистрофии на протяжении всего срока наблюдения встречались достоверно чаще, чем у контрольных животных (соответственно, в 2,4 раза в 1 срок и в 2,7 раз во 2 срок обследования). Анализируя результаты воздействия сулемы на мозжечок белых крыс, можно заключить, что, как и при интоксикации парами металлической ртути, патологический процесс развивался вначале в ганглионарном слое

мозжечка, а с течением времени захватывал и более глубокие структуры, в частности, гранулярный слой.

Оценивая индивидуальное поведение белых крыс с экспериментальной интоксикацией сулемой, выполненное в лаборатории токсикологии Ангарского филиала ВСНЦ ЭЧ СО РАМН, установлено, что нарушения целостной структуры поведения при введении сулемы имели аналогичную с ртутной интоксикацией направленность и общие закономерности. В 1 срок нарушения проявлялись в неспецифическом возбуждении животных, негативно-эмоциональном состоянии и высоком уровне тревожности. В отдаленный постконтактный период двигательная и исследовательская активность уменьшались, нарастали негативно-эмоциональные реакции, тревожность, депрессивноподобное состояние и страх. В отличие от животных с интоксикацией парами металлической ртути у особей, получавших сулему, в оба срока отсутствовали признаки внутривидовой агрессивности, что связано, по нашему мнению, с выраженной подавленностью поведения и тревожно-депрессивным состоянием (Якимова Н.Л., 2010).

Результаты изучения биоэлектрической активности коры головного мозга не выявили каких-либо принципиальных различий между интоксикацией белых крыс парами ртути или сулемой. Сразу после окончания воздействия в обоих случаях у животных наблюдалось увеличение амплитуды основных ритмов, нестабильность доминирующих ритмов, преобладала медленноволновая активность. В отдаленном постконтактном периоде наибольшие изменения в биоэлектрической активности головного мозга проявлялись при изучении зрительных вызванных потенциалов. Наблюдалось удлинение латентности и длительности ответа, раздвоение или уплощение пика, что косвенно подтверждало нарушение корково-подкорковых взаимодействий и наличие активирующего влияния ретикулярной формации на стволовые образования и таламус, характерные для прогрессирования токсической энцефалопатии. (Якимова Н.Л., 2010).

В целом, сравнительный анализ морфологических изменений нервной ткани при ингаляционном воздействии паров металлической ртути и подкожном – сулемы позволил установить, что в указанных выше дозах и режиме введения формирующиеся нарушения не имели принципиальных отличий. К общим закономерностям проявления патологического процесса можно отнести: увеличение площади ядер, характерное для дистрофических процессов, снижение экспрессии GFAP и S 100, свидетельствующей о нарушениях функционального состояния клеток астроглии и формировании нейродегенеративных процессов, дистрофические изменения нейронов коры головного мозга, значительное снижение плотности расположения нормальных нейронов коры головного мозга на единицу площади, сокращение толщины гранулярного слоя мозжечка. Наряду с этим выявлены и некоторые особенности формирования поражений нервной ткани, которые проявились, прежде всего, в реакции астроглии. При воздействии паров металлической ртути отмечается резкое сокращение числа астроцитов, в то время как при интоксикации сулемой, напротив, наблюдается их ярко выраженная пролиферация. Пары металлической ртути вызывали в динамике постконтактного периода значимое возрастание количества клеток Пуркинье с явлениями дистрофии, что не было характерно для воздействия сулемой. Еще одной отличительной чертой являлось отсутствие видимой демиелинизации отростков

нейронов при воздействии сулемы, тогда как ингаляции парами металлической ртути вызывали нарастание процессов демиелинизации в динамике обследования.

Таким образом, экспериментальное моделирование нейроинтоксикации парами металлической ртути и сулемой дало возможность объективно оценить функциональное состояние головного мозга белых крыс при воздействии НСР. Нейровизуализация патологического процесса в динамике постконтактного периода убедительно свидетельствует о формировании стойких, необратимых, в ряде случаев нарастающих органических поражений нервной ткани (кора головного мозга, гиппокамп и мозжечок) белых крыс, характерных для нейродегенеративного процесса.

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 нейроинтоксикации НСР позволят изучить особенности и закономерности патологического процесса в ЦНС, нейровизуализация даст возможность 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 нейроинтоксикации. В целом, биомоделирование дает основание управлять механизмами формирования патологических процессов при воздействии ртути на организм человека.

Для изучения общих закономерностей влияния ртути на ЦНС и решения вопросов нейровизуализации патологического процесса нами разработаны методические подходы к экспериментальному моделированию нейроинтоксикации неорганическими соединениями ртути (НСР), 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 НСР 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 нейроинтоксикации 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.

2. Исследование целостного поведения крыс и результатов биоэлектрической активности коры головного мозга.

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, саггитальные 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: GFAP, S 100 и NSE выполняют иммуногистохимическое обследование.

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. 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 (Лахман О.Л., 2003, 2006, 2008). 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 ХРИ нарушаются нормальные силовые взаимоотношения и развивается запредельное торможение, преимущественно, верхних слоев коры больших полушарий, входящих в систему ассоциативных волокон коры (Катаманова Е.В., 2010).

На наш взгляд, выявленные, как в эксперименте, так и при клиническом обследовании изменения, могут быть связаны с нарушением метаболизма в нервной ткани, что проявляется увеличением площади ядер и расширением перинуклеарного пространства нейронов, стойким сокращением площади митохондрий в нейронах, высоким уровнем дистрофически измененных клеток в коре головного мозга и мозжечке, снижением экспрессии нейроспецифических белков, свидетельствующих в совокупности о развитии в нервной ткани дистрофических процессов. Снижение когнитивных функций и долговременной памяти у больных также, возможно, связано с нарушениями в структуре гиппокампа, вызванными действием НСР 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 которое сохраняется и в отдаленном периоде.

При клиническом обследовании больных с диагнозом ХРИ 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.

Наличие органического поражения мозга в отдаленном периоде профессиональных нейроинтоксикаций 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 (Катаманова Е.В., 2010). 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.

Оценивая полученные результаты, можно заключить, что длительное ингаляционное воздействие НСР приводило к развитию у белых крыс токсической энцефалопатии, что в равной мере соответствует клинике ХРИ у пациентов с установленным диагнозом токсическая энцефалопатия. 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 нейроинтоксикацией. Учитывая данные клинических и экспериментальных исследований, считаем, что экстраполяция результатов, полученных при обследовании белых крыс, на человека при моделировании токсической энцефалопатии достаточно обоснована. 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 перичеллюлярного отеков, вследствие нарушения кровоснабжения головного мозга и изменением проницаемости ГЭБ;

-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 экспрессии NSE.

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 гиперкинетического синдрома, вестибуло-координаторных нарушений или атаксического синдрома.

ВЫВОДЫ

1. При воздействии неорганических соединений ртути в постконтактном периоде выявлены общие морфофункциональные закономерности изменений в ЦНС: нарушение ультраструктуры нейронов, снижение их общей численности, дистрофические процессы в нейронах коры головного мозга и клетках Пуркинье, изменение количества клеток астроглии, наличие периваскулярного и перипеллюлярного отеков, уменьшение толщины гранулярного слоя мозжечка.

2. Особенности патологических процессов в ЦНС при интоксикации парами металлической ртути является сокращение числа клеток глии, нарастание в динамике процессов демиелинизации отростков нейронов, количества клеток Пуркинье с явлениями дистрофии.

3. Особенности патологического процесса в ЦНС при интоксикации сулемой является выраженная пролиферация глиальных клеток, отсутствие видимой демиелинизации отростков нейронов.

4. Иммуногистохимическое исследование нейроспецифических белков в нервной ткани животных с интоксикацией неорганическими соединениями ртути показало на протяжении всего периода наблюдений статистически значимое снижение экспрессии глиального фибриллярного кислого белка и белка S-100, наряду с повышением нейронспецифической енолазы, что свидетельствует о нарушениях функционального состояния нейронов, клеток астроглии и формировании нейродегенеративных процессов.

5. В динамике постконтактного периода интоксикации парами металлической ртути установлено: снижение плотности расположения нейронов коры головного мозга и клеток Пуркинье мозжечка, нарастание числа данных клеток с явлениями дистрофии, усиление демиелинизации отростков нейронов и сохранение нарушений ультраструктуры нейронов, обуславливающих, в совокупности, прогрессивное течение нейродегенеративного процесса в нервной ткани.

6. Определены методические подходы к моделированию токсической энцефалопатии, позволяющие оценить характер нарушений состояния ЦНС при воздействии неорганических соединений ртути на основе морфофункциональных изменений в нервной ткани с учетом целостного поведения и результатов электроэнцефалографии экспериментальных животных.

7. Морфологическими критериями токсической энцефалопатии у белых крыс при воздействии паров металлической ртути и сулемы являются: повышенное количество нейронов коры головного мозга с явлениями дистрофии, увеличение площади ядер нейронов, прогрессирующее снижение общей плотности нейронов коры головного мозга на единицу площади.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Титов Е.А. Оценка патоморфологических изменений головного мозга белых крыс при ингаляционном воздействии паров ртути // Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины: материалы межрегиональной

- научно-практической конференции молодых ученых. – Иркутск, 2006 – С. 275-277.
2. Соседова Л.М., Голубев С.С., Титов Е.А. Сравнительная морфологическая оценка нейротоксичности сулемы и гипоксии // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2007. - №1. – С.100 – 102.
 3. Титов Е.А. Сравнительная оценка изменений в нервной ткани при воздействии сулемы и ингаляционном воздействии паров ртути. // Экология а современном мире: взгляд научной молодежи: материалы Всероссийской конференции молодых ученых. (24-27 апреля 2007) – Улан-Удэ, 2007 – С. 383-384.
 4. Титов Е.А. Морфо-функциональные нарушения нервной ткани при воздействии паров металлической ртути // 8 Международный Конгресс Молодых ученых. - Томск, 2007.
 5. Соседова Л.М., Титов Е.А. и др. Экспериментальное моделирование токсической энцефалопатии // Медицина труда и промышленная экология. - №8.- 2008 – С. 22-26.
 6. Якимова Н.Л., Титов Е.А. Отдаленные эффекты токсичности неорганической ртути при экспериментальном моделировании (поведенческие и патоморфологические аспекты) // Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины: тезисы 5 конференции молодых ученых России. // Вестник РАМН. – 2008. – № 6 (прил.) – С. 502.
 7. Соседова Л.М., Титов Е.А. и др. Изучение механизмов формирования поражений нервной системы при воздействии производственных нейротоксикантов: клинико-экспериментальные исследования. // Тезисы 3 съезда токсикологов России. – М., 2008. – С. 245-247.
 8. Титов Е.А. Нейротоксическое действие ртути в отдаленном периоде интоксикации. Гистологические аспекты. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2008. – №2. – С. 96-97.
 9. Соседова Л.М., Титов Е.А. и др. Отдаленные эффекты нейротоксичности при экспериментальном моделировании. // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2008. - №3(23). Прил. 2, часть 1. - С. 34.
 10. Соседова Л.М., Голубев С.С., Титов Е.А. Сравнительная оценка морфофункциональных изменений в нервной ткани и печени белых крыс при воздействии сулемы и паров металлической ртути. // **Токсикологический вестник** – 2009. - №3. – С. 27-30
 11. Соседова Л.М., Кудаева И.В., Титов Е.А. и др. Морфологические и нейрохимические эффекты в отдаленном периоде ртутной интоксикации (экспериментальные данные). // **Медицина труда и промышленная экология.** - №1. – 2009. – С.37-42.
 12. Вокина В.А., Титов Е.А. Морфофункциональное состояние нервной системы белых крыс при энцефалопатии гипоксического и токсического генеза. // **Бюллетень ВСНЦ СО РАМН.** – 2010. - №4. – С.13-16.
 13. Титов Е.А. Морфологические нарушения ткани головного мозга белых крыс при интоксикации парами металлической ртути и сулемой // **Медицинский академический журнал** – 2010. - №5. – С.79-80.

Патент

Способ моделирования отдаленной токсической энцефалопатии [Текст] : Пат. 2341828 Рос. Федерация : МПК G09 23/28 / Соседова Л.М., Якимова Н.Л., Хомуев Г.Д., Титов Е.А., Рукавишников В.С.; заявитель и патентообладатель ГУ Науч.

центр мед. экологии ВШЦ СО РАМН. - № 2007116507/14 ; заявл. 02.05.07 ; опубл. 20.12.08, Бюл. № 35. – 5 с.

Список сокращений

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

НСР – неорганические соединения ртути

ХРИ – хроническая ртутная интоксикация

ЦНС – центральная нервная система

ЭЭГ - электроэнцефалография

GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок

NSE – нейронспецифическая енолаза

DAB – диаминобензидин