

16. Szentágothai J. The neuron network of the cerebral cortex: a functional interpretation // Proc. Roy. Soc. Lond. B.— 1978.— 201, N 1.— P. 219—248.
17. Valverde F. Short axon neuronal subsystems in the visual cortex of the monkey // Intern. J. Neuroscience.— 1971.— 1, N 1.— P. 181—197.
18. Winer J. A. Anatomy of layer IV in cat primary auditory cortex (AI) // J. Comp. Neurol.— 1984.— 224, N 4.— P. 535—567.

Одес. ун-т им. И. И. Мечникова
М-ва высш. и сред. спец. образования УССР

Поступила 20.03.87

УДК 615.9—0.85.7

Структурно-функциональные изменения в различных отделах головного и спинного мозга при воздействии диоксакарбом

Н. В. Кокшарева, Л. Н. Бадаева

Определяющим в механизме физиологического действия карбаматных пестицидов (производные карбаминовой кислоты) является нарушение каталитической функции фермента холинэстеразы (ХЭ) (К.Ф.3.1.1.7 и К.Ф.3.1.1.8) во всех органах и системах, имеющих холинэргическую иннервацию. При этом скорость реакции со стороны нервной системы прямо пропорциональна антихолинэстеразной активности препаратов и определяет симптомы интоксикации: тремор, клонико-тонические судороги, нарушение психики [4, 11].

По сравнению с периферическим действием, которое исследовано весьма полно и углубленно [4, 9, 10, 13, 17], центральные эффекты карбаматов изучены еще недостаточно. Имеются лишь отдельные сведения о том, что некоторые карбаминовые пестициды при введении в токсических дозах вызывают ряд морфологических изменений в головном мозгу и нарушают условно-рефлекторную деятельность животных [3]. Вместе с тем в настоящее время практически нет данных о влиянии указанных пестицидов на нейроны спинного мозга.

Цель данного исследования — оценка способности карбаматных пестицидов (на модели отравления животных высокотоксичным препаратом диоксакарбом) проникать в центральную нервную систему и оказывать влияние на функциональное состояние и изменять ультраструктуру спинного мозга.

Методика

Опыты проведены на 60 белых крысах обоего пола массой 180—230 г и 12 кроликах — массой 2,0—2,5 кг. Подопытные группы включали по 6—8 животных. Среднесмертельную дозу (ДЛ₅₀) диоксакарба (элокрон) при пероральном введении животным определяли методом наименьших квадратов для пробит-анализа кривых летальности, вычисленных по методу Прозоровского [2]. Центральное действие карбамата оценивали по изменению функционального состояния и ультраструктуры спинного мозга крыс, а также активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в различных отделах головного мозга кроликов (продолговатом мозгу, гиппокампе, гипоталамусе, верхних и нижних холмиках крыши среднего мозга, каудато-путамене).

Диоксакарб (2,1,3-диоксалан-2, или фенил N-метилкарбамат) вводили животным внутривенно в дозе ДЛ₅₀ (10 мг/кг — кроликам, 50 мг/кг — крысам). Активность АХЭ определяли колориметрическим методом [15]. При отравлении диоксакарбом животных декапитировали в агональный период. Влияние карбамата на нейроны спинного мозга изучали по изменению реакций в двухнейронной (моносинаптической) рефлекторной дуге [6, 7]. Функциональное состояние соматомоторных мотонейронов определяли на наркотизированных уретаном (1 г/кг внутривенно) крысах по электрической активности — суммарному значению моносинаптического потенциала (МСП) передних

корешков V—VI поясничных сегментов при раздражении соответствующих дорзальных корешков одиночными или двойными прямоугольными стимулами длительностью 0,1 мс. Силу раздражения подбирали такую, которая вызывала возбуждение афферентных волокон группы I [16]. Изучение латентного периода, амплитуды и длительности МСП позволяло судить об основных процессах — возбуждении и торможении в мотонейронах при различных функциональных состояниях мозга. В течение опыта подопытных животных переводили на искусственное дыхание.

Ультраструктуру спинного мозга при воздействии диоксакарбом (ДЛ₅₀) изучали методом электронной микроскопии. Исследуемый материал — передние рога спинного

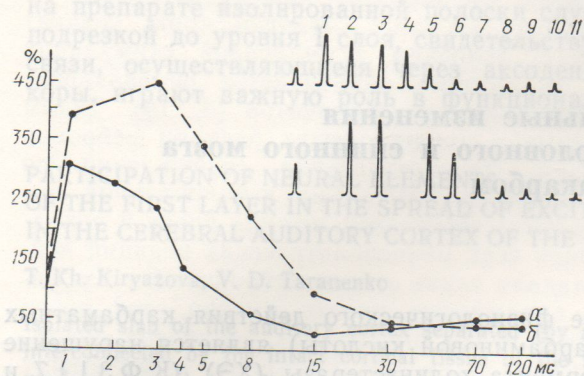


Рис. 1. Изменение моносинаптического потенциала при введении диоксакарба (ДЛ₅₀):

1 — на кондиционирующее раздражение; 2—11 — через различные интервалы времени: 1,3; 1,7; 2,5; 3,0; 6,5; 30; 70; 90; 120 мс после тестирующего. На графике: а — контроль, б — отравление диоксакарбом; по оси ординат — отношение суммарного тестирующего моносинаптического потенциала к суммарному кондиционирующему, по оси абсцисс — интервал между предварительным и пробным раздражениями (в логарифмической шкале).

мозга на уровне поясничных сегментов — фиксировали в растворе глутаральдегида на фосфатном буфере; постфиксацию кусочков проводили в 2 %-ном растворе четырехоксида осмия с последующей заливкой в аралдит. Ультратонкие контрастированные срезы просматривали в электронном микроскопе ЭМВ-100 ЛМ.

Результаты и их обсуждение

Установлено, что диоксакарб при пероральном введении белым крысам и кроликам проявляет высокую токсичность: ДЛ₅₀ составляет 50 и 10 мг/кг соответственно. При этом в картине острого отравления на первый план выступают признаки поражения нервной системы (повышенная возбудимость, саливация, тремор, клонико-тонические судороги, переходящие в тетанус, нарушение координации движений и ритма дыхания, парезы). Гибель животных при остром отравлении диоксакарбом наступает обычно через 30—40 мин.

Для понимания центральных эффектов препаратов представляется весьма важным изучение их способности преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). На модели отравления кроликов диоксакарбом (10 мг/кг) показано, что карбаматы, не содержащие заряда, хорошо проникают в ЦНС и уже через 30 мин вызывают резкое (на 65—78 % по отношению к контролю) угнетение АХЭ в тех отделах головного мозга, где в условиях нормы активность фермента особенно велика (продолговатом мозгу, верхних и нижних холмиках крыши среднего мозга, гиппокампе, гипоталамусе, каудато-путамене [5]). В опытах на крысах получены аналогичные результаты. Так, через 30 мин после введения пестицида (50 мг/кг) активность фермента в головном мозгу была угнетена на 68 % по отношению к контролю.

Влияние диоксакарба на центральные процессы сгибательного рефлекса оценивали по суммарному значению МСП, который является адекватным выражением возбуждения в мотонейронах, через которое осуществляется этот рефлекс. У контрольных крыс на одиночное ортодромное раздражение дорсального корешка пороговой силы для группы I нервных волокон в соме мотонейронов генерируется распространяющийся по их аксонам нервный импульс, который регистрируется в соответствующем переднем корешке как МСП. Форма этого потенциала свидетельствует о почти одновременном синхронном возбуждении мотонейронов (рис. 1). Латентный период этого потенциала весьма устойчив

и составляет в среднем 0,28 ± 0,004 с, что свидетельствует о нейронах моносинаптического типа (0,28 ± 0,004 с в моносинаптическом разрядом только часть нейронов воз-

Как видно из рис. 1, после введения крысам (30 %) возростала; сокращалось на 25 % изменения амплитуды на одиночный афферентный отдел спинного мозга распространяющееся.

Характер течения возбуждения в мотонейронах, посылаемых в разряд в мотонейрон, то последнее в зависимости от иннервации реакции отражают в них распро-

Кривые на рис. 1 показывают, что у крыс первые 0,5—1 мс пульса. При более поздней фазе (4—5 мс) фазы «облегчения». Значение «облегчения» тестирующего МСП — в интервалах от 4 до 120 мс первоначального периода «облегчения» тестирующего МСП — дотяжения 120 мс (сравнение) тестирующего МСП — дотяжения 120 мс (сравнение) числа мотонейронов возбуждение в ответ на исходит за счет во время прохождения конденсации порогом возбу-

После введения диоксакарба амплитуда МСП — 450 % (контроль) — 15—17 мс (см. рис. 1). Изменения, несомненно, центральной части мозга вероятно в дендритах моносинаптической группы нервных волокон поэтому нет доподлинно влияния на проведение импульса, чем в аксонах.

По всей вероятности нейроны при воздействии не только их тормозные влияния на ретикулярную формацию рефлексов [4,

и составляет в среднем $(1,9 \pm 0,1)$ мс. Такое значение скрытого периода свидетельствует о том, что афферентный импульс переходит на мотонейроны моносинаптически. Амплитуда этой реакции, как правило, достигает $(0,28 \pm 0,004)$ мВ. Обычно на одиночный афферентный импульс в моносинаптической рефлекторной дуге отвечает распространяющимся разрядом только 10—20 % мотонейронов, между тем как некоторая часть нейронов возбуждается только до подпорогового уровня [7, 16].

Как видно из рис. 1 (осциллограммы 1—7), уже через 20—30 мин после введения крысам диоксакарба амплитуда МПС существенно (на 30 %) возрастала; при этом значение латентного периода, наоборот, сокращалось на 25 % по сравнению с контролем. Наблюдаемые нами изменения амплитуды и длительности латентного периода МСП в ответ на одиночный афферентный импульс свидетельствуют о том, что под влиянием карбамата повышается возбудимость мотонейронов поясничного отдела спинного мозга, т. е. число мотонейронов, вовлекаемых в распространяющееся возбуждение, возрастает.

Характер течения распространяющегося моносинаптического возбуждения в мотонейронах исследовали также применением двух раздражений, посылаемых с различными интервалами времени между ними. Так, если вскоре после первого кондиционирующего нервного разряда в мотонейронах вызвать второе — тестирующее — возбуждение, то последнее подвергается значительным двуфазным изменениям в зависимости от интервала между ними. Эти изменения тестирующей реакции отражают функциональное состояние мотонейронов после генерации в них распространяющегося возбуждения.

Кривые на рис. 1, построенные на основе усредненных результатов, показывают, что у контрольных крыс тестирующей реакции нет в течение первых 0,5—0,7 мс после прохождения кондиционирующего импульса. При более продолжительных интервалах следовала длительная (4—5 мс) фаза резкого увеличения тестирующего МСП («облегчение»). Значение «облегчения», представляющее собой процентное отношение тестирующего МСП к кондиционирующему, составляло 300 %. В интервалах от 4 до 15 мс амплитуда этого потенциала снижалась до первоначального уровня. После удлинения интервалов свыше 15 мс период «облегчения» переходил в длительную фазу угнетения тестирующего МСП — депрессию, которая четко регистрировалась на протяжении 120 мс (см. рис. 1, а и осциллограммы). Значительное «облегчение» тестирующей реакции можно рассматривать как следствие увеличения числа мотонейронов, в которых возникает распространяющееся возбуждение в ответ на тестирующее раздражение. Вероятно, это происходит за счет вовлечения в процесс возбуждения оставшихся после прохождения кондиционирующего импульса мотонейронов с пониженным порогом возбудимости.

После введения диоксакарба (ДЛ₅₀) не только возрастала суммарная амплитуда МСП, но и резко увеличивались значения «облегчения» — 450 % (контроль — 300 %) и длительность этой фазы — до 15—17 мс (см. рис. 1, график и осциллограммы 1—7). Наблюдаемые изменения, несомненно, обусловлены процессами, развивающимися в центральной части моносинаптической рефлекторной дуги, наиболее вероятно в дендритах и на соме нейронов. Это видно из того, что в моносинаптической рефлекторной дуге возбуждение проходит с афферентных волокон на мотонейроны через одну синаптическую связь, поэтому нет дополнительных элементов, которые могли бы оказать влияние на проведение в дуге рефлекса. Кроме того, эти процессы более длительны, чем в афферентных аксонах.

По всей вероятности, наблюдаемое повышение возбудимости мотонейронов при воздействии антихолинэстеразными карбаматами обусловлено не только их влиянием на клетки Реншоу, от которых поступают тормозные влияния на мотонейроны, или же действием этих препаратов на ретикулярную формацию, которая регулирует уровень спинномозговых рефлексов [4, 13], но и непосредственным влиянием на нейроны

спинного мозга. В этом плане большой интерес могут представлять результаты, полученные нами при электронно-микроскопических исследованиях. Уже имеются отдельные работы о влиянии пестицидов на ультраструктуру спинного мозга [1, 2]. Изучение ультраструктуры спинного мозга при воздействии диоксакарбом позволяет выявить степень развития нейротоксического эффекта на субклеточном уровне. Обнару-

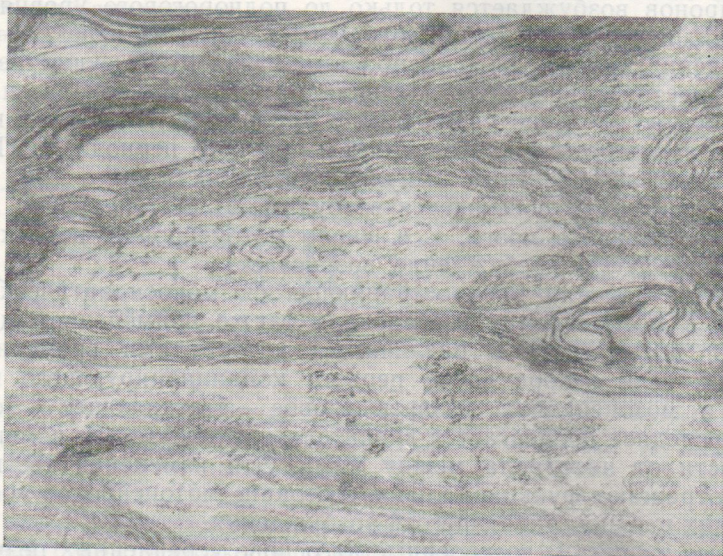


Рис. 2. Ультраструктура миелиновых волокон спинного мозга крысы (контроль). $\times 18\,000$.

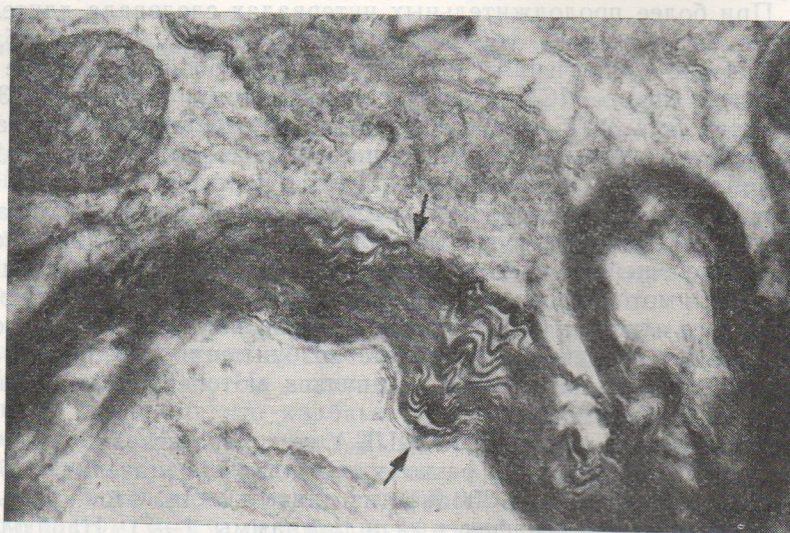


Рис. 3. Деструкция миелина, очаговая гомогенизация, извитость мембран миелинизированных волокон в спинном мозгу крысы (отравление диоксакарбом, 50 мг/кг). $\times 20\,000$.

жено, что карбамат (50 мг/кг) уже через 40 мин вызывает дезорганизацию ультраструктур спинного мозга крыс, о чем свидетельствует дегенерация миелиновых мембран волокон мелкого и крупного калибров; отмечаются различные картины деструкции миелиновых мембран вплоть до распада их в виде мелкозернистого осадка. Наблюдаются очаговая гомогенизация, извитость мембран, увеличение электронной плотности аксоплазмы, появление в ней вакуолей, миелиноподобных структур, деструкция крист отдельных митохондрий (рис. 2, 3).

В цитоплазме нейроцитов спинного мозга обнаружены маргинальная конденсация хроматина, очаговые расширения перинуклеарного

пространства. Служа в виде очагов каналцев и части клетки. Наблюдения их формы, гомогенизации, что диоксакарб и уже в первые моменты ультраструктурно-морфологические нарушения обменных процессов миелина и его оболочки. Учитывая бо- карбаматных пестицидов действия [4, 11, 17] ционально-морфологические могут быть характерными, обладающих сильной токсичностью.

Выводы

1. В механизме токсического действия диоксакарба существует гематоэнцефалический барьер в различных частях.
2. Впервые установлено, что повышение возбуждающей активности спинного мозга, что карбаматов на про-

STRUCTURAL-FUNCTION OF THE BRAIN AND

N. V. Kokshareva, L. N.

The model for intoxication to show that carbamate proceeding from rough areas of the brain. At motoneurons and chancocytes are of great importance. The data obtained test of the central nervous s

All-Union Institute of Ministry of Public Heal

1. Бадаева Л. Н. Сипидов (полихлорка) 1978, № 3.— С. 262
2. Бадаева Л. Н., Ки и фосфорорганичес токсикологии пести 1981 г.— Киев, 1981
3. Василенко Д. А., К га.— Киев: Наук. д
4. Голиков С. Н., Роз Л.: Медицина.— 19
5. Дишовски Х. Д. Э реактиваторов холи реф. дис. ... канд. ме
6. Ковтун С. Д., Ткач рефлексорную дуг С. 1125—1127.

пространства. Следует отметить изменения эндоплазматического ретикулаума в виде очагового отсутствия рибосом на мембранах, расширения канальцев и частичной фрагментации мембран этой сложной организации клетки. Наблюдались деструкция крист митохондрий, изменение их формы, гомогенизация матрикса. Эти изменения свидетельствуют о том, что диоксакарб в токсических дозах хорошо проникает через ГЭБ и уже в первые минуты после введения вызывает необратимые изменения ультраструктуры нервных волокон в ЦНС, которые можно рассматривать как результат адаптационно-трофических расстройств, нарушения обменных процессов в миелиновой оболочке вплоть до деструкции миелина и его распада.

Учитывая большое структурное разнообразие существующих карбаматных пестицидов и различную выраженность их центрального действия [4, 11, 17], можно предположить, что наблюдаемые нами функционально-морфологические изменения при воздействии диоксакарбом могут быть характерными лишь для такого же типа веществ, а именно обладающих сильной антихолинэстеразной активностью и высокой токсичностью.

Выводы

1. В механизме токсического действия карбаматных пестицидов (диоксакарб) существенное значение имеет их способность проникать через гематоэнцефалический барьер и угнетать активность ацетилхолинэстеразы в различных отделах головного мозга.
2. Впервые установлено, что одним из звеньев патологии является повышение возбудимости мотонейронов в начальный период с последующим нарушением ультраструктуры нервных волокон и нейроцитов спинного мозга, что свидетельствует о прямом токсическом эффекте карбаматов на проводниковый аппарат ЦНС.

STRUCTURAL-FUNCTIONAL CHANGES IN DIFFERENT AREAS OF THE BRAIN AND SPINAL CORD CAUSED BY DIOXACARB

N. V. Kokshareva, L. N. Badaeva

The model for intoxication of white rats and rabbits by dioxacarb (DL_{50}) has been used to show that carbamate pesticides readily penetrate into the central nervous system, proceeding from rough depression of the enzyme cholinesterase activity in various areas of the brain. At the same time it is stated that an increase in the excitability of motoneurons and changes in the ultrastructure of nervous fibres and spinal cord neurocytes are of great importance in the mechanism of toxic action of carbamate pesticides. The data obtained testify to the direct action of the drug on the conductive apparatus of the central nervous system.

All-Union Institute of Hygiene and Toxicology of Pesticides, Polymers and Plastics, Ministry of Public Health of the USSR, Kiev

1. Бадеева Л. Н. Системно-структурные критерии нейротоксического действия пестицидов (полихлоркамфен, валексон) в эксперименте // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1978, № 3.— С. 262—267.
2. Бадеева Л. Н., Киселева Н. И., Письменная М. В. Нейротоксическое действие хлор- и фосфорорганических пестицидов в системе мать—плод // Проблемы гигиены и токсикологии пестицидов: Тез. докл. VI Всесоюз. науч. конф.— Киев, 17—19 нояб. 1981 г.— Киев, 1981.— С. 84—88.
3. Василенко Д. А., Костюк П. Г. Межсегментарные нейронные системы спинного мозга.— Киев: Наук. думка.— 1983.— 205 с.
4. Голиков С. Н., Розенгарт В. И. Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества.— Л.: Медицина.— 1964.— 381 с.
5. Дишовски Х. Д. Экспериментальные исследования механизма действия некоторых реактиваторов холинэстеразы при отравлении диметилдихлорвинилфосфатом: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Киев, 1971.— 21 с.
6. Ковтун С. Д., Ткаченко И. И. Влияние полихлоркамфена на моносинаптическую рефлекторную дугу белых крыс // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1977.— № 12.— С. 1125—1127.