

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ
СИСТЕМЫ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ
ОКСИДОМ УГЛЕРОДА И МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ**

Толкач П.Г., Башарин В.А., Потапов П.К., Никишин А.С.

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 194044

г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6, тел.: +7 (812) 292-34-82

Резюме. В проведённом экспериментальном исследовании на лабораторных животных воздействовали продуктами пиролиза древесины, содержащих оксид углерода в концентрации 4800 ± 650 ppm (6000 ± 810 мг/м³), в течение 30 мин, что приводило к формированию тяжёлой степени интоксикации. При оценке воспроизведения условного рефлекса поиска пищи у предварительно обученных животных отмечали увеличение ($p < 0,05$) количества ошибок референтной и рабочей памяти в отдалённом периоде интоксикации. Данные изменения сопровождались нарушением гистоархитектоники поля СА₃ гиппокампа. При моделировании нормобарической гипоксической гипоксии (содержание кислорода $6 \div 8$ об. %, 30 мин) в отдалённом периоде не наблюдалось нарушения воспроизведения условного рефлекса поиска пищи. При исследовании микропрепаратов поля СА₃ гиппокампа не наблюдалось выраженных патологических изменений. Результаты проведённого экспериментального исследования позволяют предположить, что развитие гипоксии вследствие образования карбоксигемоглобина не является ведущим патогенетическим механизмом развития отдалённых нарушений функций центральной нервной системы после интоксикации оксидом углерода. Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что механизм развития данных нарушений связан с опосредованными нейротоксическими механизмами действия оксида углерода.

Ключевые слова: продукты пиролиза, оксид углерода, интоксикация, центральная нервная система, гипоксическая гипоксия, механизм действия.

**FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL DISTURBANCES OF CENTRAL
NEUROUS SYSTEM WERE INDUCED INTOXICATION OF CARBON MONOXIDE
AND MODELING HYPOXIC HYPOXIA IN THE RATS**

Tolkach P.G., Basharin V.A., Potapov P.K., Nikishin A.S.

Military Medical Academy. C.M. Kirov

Abstract. In the experimental study, laboratory animals were exposed to wood pyrolysis products containing carbon monoxide at a concentration of 4800 ± 650 ppm (6000 ± 810 mg/m³) for 30 minutes, which led to the formation of a severe degree of intoxication. When evaluating the food-procuring conditioned response in the pre-trained animals in 8-arm radial maze, we noted an increase ($p < 0,05$) in the number of errors of the referent and working memory in the delayed period of intoxication. These changes were accompanied by a violation of the histoarchitecture of the hippocampus CA₃ field. When modeling normobaric hypoxic hypoxia (oxygen content $6 \div 8$ vol.%, 30 min) in the distant period there was no disturbance in the reproduction of the food-procuring conditioned response. In the study of micrographs of the CA₃ hippocampal field, no significant pathological changes were observed. The results of the experimental study suggest that the development of hypoxia due to the formation of carboxyhemoglobin is not the leading pathogenetic mechanism for the development of delayed neurological disturbances of the central nervous system after carbon monoxide intoxication. The obtained results are consistent with the literature data that the mechanism for the development of these disorders is associated with mediated neurotoxic mechanisms of carbon monoxide action.

Key words: products of pyrolysis, carbon monoxide, intoxication, central nervous system, hypoxic hypoxia, mechanism of action.

Введение

Проблема отравления оксидом углерода (СО) достаточно актуальна, как в Российской Федерации, так и во всём мире [8]. Так, в 2012 г. в РФ летальные исходы при отравлении оксидом углерода составили 25,2% от общего количества отравлений, а в 2017 г. – 22,2% [2]. Данные цифры свидетельствуют об отсутствии выраженной динамики к снижению смертности отравленных оксидом углерода. По данным МЧС России в 2017 г. в РФ произошло около 133,1 тыс. пожаров, на которых погибло около 8 тыс. человек, травмировано более 10 тыс. человек [3]. Поражение людей на пожарах в первую очередь связано с воздействием химического фактора [1]. Количество пострадавших от действия токсичных компонентов продуктов термодеструкции различных материалов составляет около 70% в структуре всех пострадавших [11]. В результате термодеструкции всех естественных и значительного количества синтетических материалов образуется большое количество оксида углерода. Например, в стадии «развитого» пожара в жилых помещениях концентрация СО составляет 3÷5 об. % (10÷30 тыс ppm), при этом абсолютно смертельная концентрация этого токсиканта в воздухе составляет около 1 об. % [9].

Ведущий механизм токсического действия оксида углерода связан с развитием гемической гипоксии [13], которая приводит к повреждению органов и тканей с высоким потреблением кислорода, среди которых на первом месте находится центральная нервная система (ЦНС) [1]. Описаны и другие механизмы непосредственного нейротоксического действия оксида углерода, приводящие к поражению различных структур центральной нервной системы [10,12]. Особо следует подчеркнуть, что нейротоксическое действие оксида углерода может вызывать отдаленные повреждения структур центральной нервной системы [15]. Показано, что у 13÷50% пациентов с тяжёлым отравлением оксидом углерода, сопровождающимся потерей сознания, содержанием концентрации карбоксигемоглобина в крови свыше 25%, после восстановления сознания и, часто, после выписки из стационара, развиваются нарушения когнитивных функций [10,12], которые существенно нарушают качество жизни таких пострадавших [4].

В работах ряда отечественных и зарубежных авторов высказываются предположения о том, что патологические процессы, развивающиеся при остром отравлении оксидом углерода и сопровождающиеся нарушениями тканевых механизмов, связанных с утилизацией кислорода имеют свою специфику и отличаются от изменений, регистрируемых при кислородном голодании организма [5, 14]. На сегодняшний день остаётся не до конца изученным вклад гипоксии, развившейся вследствие образования карбоксигемоглобина в развитие отдалённых нарушений функций ЦНС.

Таким образом, **цель** исследования заключалась в оценке морфофункциональных изменений в центральной нервной системы у лабораторных животных при интоксикации оксидом углерода и моделировании гипоксической гипоксии.

Материалы и методы исследования

Экспериментальное исследование выполнено крысах-самцах (n=50). При проведении исследования выполняли требования нормативно-правовых актов о порядке экспериментальной работы с использованием животных, в том числе по гуманному отношению к ним. Вывод животных из экспериментов осуществляли путём передозировки раствора Золетила (Virbac Sante Animale, Франция). Животные были разделены на три группы: Контроль (n=6), животные находились в ингаляционной камере и дышали атмосферным воздухом в течение 30 мин; Интоксикация продуктами пиролиза (n=6), животные подвергались интоксикации продуктами пиролиза древесины; Гипоксическая гипоксия (n=6), животные подвергались моделированию нормобарической гипоксической гипоксии.

Оксид углерода получали путём пиролиза древесных опилок. Термическую деструкцию древесных опилок массой 13 ± 1 г осуществляли в камере для пиролиза при температуре $280 \div 350$ °C в течении 5 мин. Образовавшиеся продукты пиролиза путём естественной конвекции поступали в ингаляционную камеру ($V=0,1$ м³), в которой находились животные. Концентрацию СО и кислорода в ингаляционной камере определяли с помощью газоанализатора ДАХ-М-03 («Аналит-Прибор», Россия). Содержание карбоксигемоглобина в крови лабораторных животных определяли спектрофотометрическим методом непосредственно после окончания интоксикации.

Моделирование нормобарической гипоксической гипоксии осуществляли в ингаляционной камере объёмом 0,1 м³. В камеру, в которой находились лабораторные животные (n=6), закачивали гелий ($V=0,04$ м³). При этом концентрация кислорода в камере снижалась до $6 \div 8$ об. %. Животные находились в условиях нормобарической гипоксической гипоксии в течение 30 мин. Содержание кислорода в ингаляционной камере определяли при помощи газоанализатора ДАХ-М-03 («Аналит-Прибор», Россия).

Состояние функций ЦНС оценивали при помощи методики выработки и воспроизведения условного рефлекса поиска пищи (УРПП) на установке «Восьмилучевой радиальный лабиринт» на 1, 7, 14, 21 сут после интоксикации, по ранее описанной методике [6]. Для оценки морфологических изменений структур ЦНС выполняли гистологическое исследование поля СА₃ гиппокампа на 21 сут после острой тяжёлой интоксикации и моделирования гипоксической гипоксии (на 21 сут). Полученные

MEDLINE.RU, ТОМ 20, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 14 ЯНВАРЯ 2019 материалы фиксировали 10 % раствором нейтрального формалина, гистологические препараты готовили по стандартной методике и окрашивали гематоксилином и эозином, крезильным фиолетовым по Нисслю. Микропрепараты исследовали на светооптическом микроскопе МИКМЕД-6 («Аналит-Нева», Россия) и выполняли фоторегистрацию. Статистический анализ результатов экспериментальных исследований проводили при помощи программы Statistica 10.0. Полученные данные, распределённые по закону отличного от нормального, анализировали при помощи непараметрического критерия Краскела-Уолиса и критерия Ньюмана-Кейлса для множественных попарных сравнений. Вывод о статистической значимости различий между группами принимали при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты исследования

При проведении анализа газовой смеси в ингаляционной камере, после поступления продуктов пиролиза, было обнаружено высокое содержание СО (4800 ± 650 ppm (6000 ± 810 мг/м³)). Концентрация кислорода в камере при одновременном нахождении в ней 6 животных снижалась не более чем на 0,8%. Воздействие продуктов пиролиза древесины приводило к резкому увеличению двигательной активности животных, которое через $4,2 \pm 0,5$ мин сменялось атаксией. Воздействие дыма приводило к появлению признаков раздражения слизистых оболочек глаз и верхних дыхательных путей. После извлечения животных из камеры положение тела в пространстве расценивалось как «на боку», содержание карбоксигемоглобина в крови составляло $58,7 \pm 4,2\%$. Летальность составила 25%, животные погибали только при непосредственном нахождении в ингаляционной камере. Через 24 часа после интоксикации состояние животных, подвергшихся воздействию продуктов пиролиза, не отличалось от контрольной группы.

Гипоксическая гипоксия моделировалась путём замещения атмосферного воздуха в ингаляционной камере гелием. Содержание кислорода в камере составляло $6 \div 8$ об. %. По окончании моделирования гипоксической гипоксии положение тела животных в пространстве расценивалось как «на животе», летальных исходов отмечено не было. Через 24 часа после воздействия состояние животных, подвергшихся гипоксической гипоксии, не отличалось от контрольной группы.

Влияние интоксикации продуктами пиролиза древесины, моделирования гипоксической гипоксии на память оценивали по сохранности воспроизведения УРПП у предварительно обученных животных на установке «Восьмилучевой радиальный лабиринт» (табл. 1). В результате контрольного тестирования было показано, что

количество ошибок референтной и рабочей памяти у животных всех групп значимо не различалось. На 7, 14 и 21 сут после воздействия продуктов пиролиза древесины число ошибок референтной памяти у отравленных крыс было больше ($p<0,05$), чем у животных контрольной группы. Кроме того, на 7 и 21 сут после воздействия у отравленных крыс отмечалось значимое увеличение количества ошибок рабочей памяти по сравнению с контрольной группой животных. У животных, которые подверглись моделированию гипоксической гипоксии, значимых различий по количеству ошибок референтной и рабочей памяти отмечено не было (табл. 1).

Таблица 1 – Число ошибок референтной и рабочей памяти, оцененных на установке «Восьмилучевой радиальный лабиринт» у предварительно обученных крыс, отн. ед. ($X \pm s_x$)

Ошибки памяти	Группы животных	Исходный уровень перед воздействием СО	Сроки после воздействия оксида углерода, сут			
			1	7	14	21
Референтной	Контроль	0,82±0,32	1,12±0,87	1,11±0,66	1,07±0,67	0,7±0,19
	Интоксикация продуктами пиролиза	0,91±0,21	1,51±1,08	2,21±1,14*	2,53±0,97*	2,45±1,07*
	Гипоксическая гипоксия	0,62±0,11	1,13±0,71	0,91±0,86	1,12±0,81	0,55±0,61
Рабочей	Контроль	0,51±0,21	0,51±0,21	0,42±0,15	0,31±0,14	0,41±0,15
	Интоксикация продуктами пиролиза	0,42±0,21	0,52±0,15	1,22±0,18*	1,12±1,05	1,15±0,57*
	Гипоксическая гипоксия	0,18±0,11	0,56±0,21	0,22±0,11	0,25±0,11	0,33±0,21
Примечание: * – различия значимы по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$); в каждой группе n = 6						

При гистологическом исследовании поля СА₃ гиппокампа на 21 сут после воздействия продуктов пиролиза отмечали выраженные изменения: интенсивный гиперхроматоз пирамидных нейронов, выраженную реакцию микроглии вокруг изменённых нейронов, обширные очаговые участки выпадения нейроцитов (рис. 1).

При исследовании материала, полученного на 21 сут после моделирования гипоксической гипоксии, качественные изменения в исследуемой области характеризовались наличием единичных гиперхроматизированных нейронов и умеренной микроглиальной реакцией, целостность пирамидных нейронов сохранена. В целом выраженных различий с микропрепаратами группы контроль не наблюдали (рис. 2).

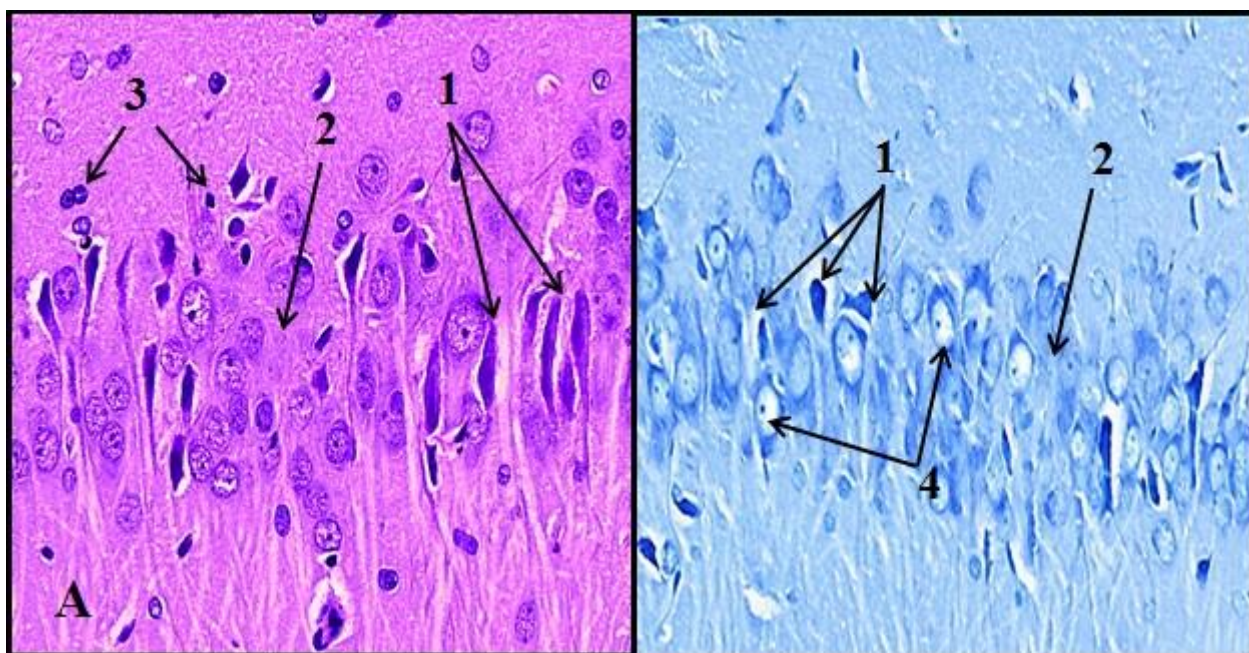


Рисунок 1 – Поле СА₃ гиппокампа крыс на 21 сут после воздействия продуктов пиролиза (окраска гематоксилином и эозином (А), крезильовым фиолетовым по Нисслю (Б), увеличение × 400). 1 – Глыбчатый гиперхроматоз цитоплазмы. 2 – Участки очагового выпадения нейроцитов. 3 – Выраженная микроглиальная реакция. 4– Изменения хроматофильного вещества в виде хроматолиза.

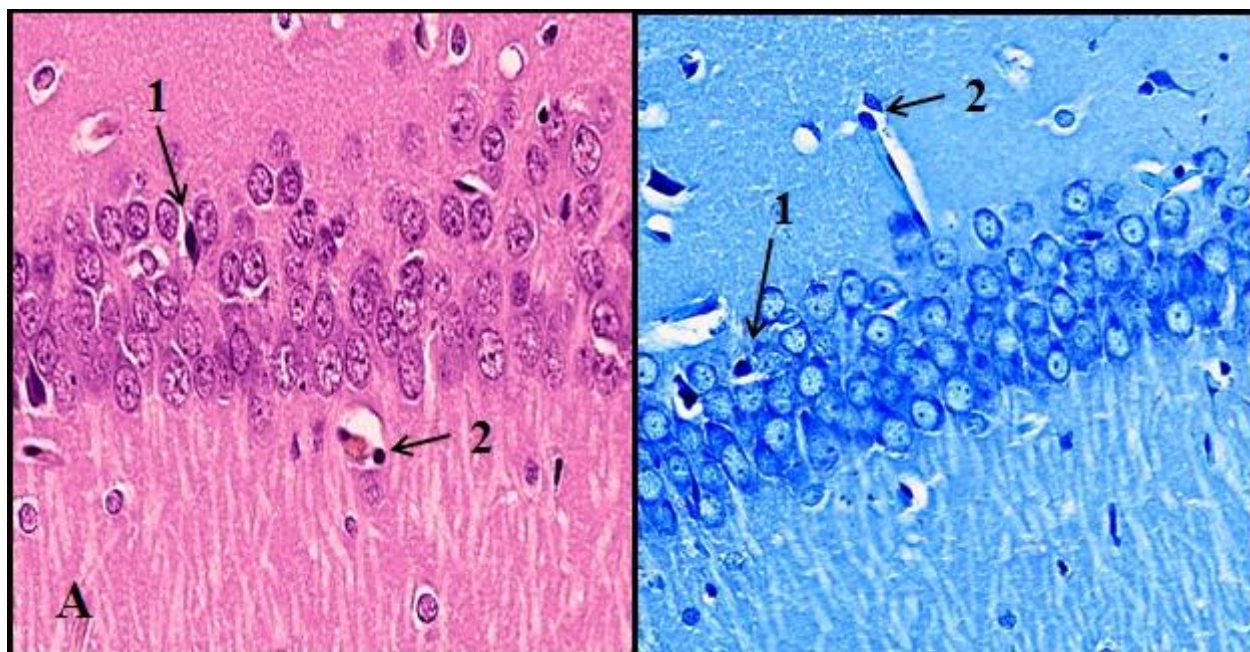


Рисунок 2 – Поле СА₃ гиппокампа крыс на 21 сут после моделирования гипоксической гипоксии (окраска гематоксилином и эозином (А), крезильовым фиолетовым по Нисслю (Б), увеличение × 400). 1 – Единичные гиперхромированные нейроны. 2 – Умеренная микроглиальная реакция.

Обсуждение полученных результатов

В проведённом экспериментальном исследовании лабораторные животные подвергались острому тяжёлому отравлению продуктами пиролиза древесины, содержащими высокую концентрацию СО и воздействию номобарической гипоксической гипоксии.

При термической деструкции древесины образовывался белый дым, который при контакте оказывал раздражающее действие на животных, что можно объяснить наличием в нём акролеина и формальдегида. Воздействие продуктов пиролиза приводило к тяжёлой интоксикации, что подтверждалось клиническими проявлениями и содержанием карбоксигемоглобина в крови ($58,7 \pm 4,2\%$).

Для оценки влияния продуктов пиролиза древесины, содержащих высокую концентрацию СО, на функции ЦНС оценивали путём воспроизведения УРПП на установке «Восьмилучевой радиальный лабиринт» у предварительно обученных животных в различные сроки после интоксикации. Было обнаружено увеличение ($p < 0,05$) количества ошибок референтной и рабочей в отдалённом периоде интоксикации (табл. 1). Данные изменения сопровождались нарушением гистоархитектоники поля СА₃ гиппокампа (рис. 1).

Вопрос о механизмах развития нарушений функций ЦНС после интоксикации СО на сегодняшний день остаётся открытым. Данные нарушения могут быть связаны с развитием гипоксии вследствие образования карбоксигемоглобина [1, 13] и обусловлены непосредственными нейротоксическими механизмами действия СО [15]. Для определения роли гипоксии в развитии данных нарушений была проведена оценка нарушений функций ЦНС у лабораторных животных при экспериментальном моделировании гипоксической гипоксии.

Снижение содержания кислорода во вдыхаемой газовой смеси до 6÷8 об. % приводило к развитию неврологических нарушений (снижение двигательной активности, положение тела в пространстве – «на животе»), которые регрессировали в течение первых суток. Механизм развития данных нарушений связан с развитием гипоксии и дефицитом энергии в головном мозге [5]. Важно отметить, что после регресса острых клинических проявлений, в отдалённом периоде не наблюдалось нарушения воспроизведения УРПП (табл. 1), что свидетельствует о сохранении пространственной памяти у лабораторных животных после моделирования гипоксической гипоксии. Более того, при исследовании микропрепаратов поля СА₃ гиппокампа не наблюдалось выраженных патологических изменений (рис. 2) по сравнению с животными, подвергшихся острой интоксикации продуктами пиролиза древесины (рис. 1).

Результаты проведённого экспериментального исследования позволяют предположить, что развитие гипоксии вследствие образования HbCO не является ведущим патогенетическим механизмом развития отдалённых нарушений функций ЦНС после интоксикации СО. Полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что механизм развития данных нарушений связан с опосредованными нейротоксическими механизмами действия СО [15,16].

Список литературы

1. Отравление монооксидом углерода (угарным газом) / Ю.В. Зобнин, Т.Н. Саватеева-Любимова, А.Л. Коваленко [и др.]; науч. ред. Ю.В. Зобнин. – СПб.: Тактик-Студио, 2011. – 86 с.
2. Рожков, П.Г. Токсикологическая ситуация в России: тенденции последних лет / П.Г. Рожков, Ю.Н. Остапенко, В.И. Казачков [и др.] // Сборник материалов Первой Всероссийской научной конференции «Токсикология и радиобиология XXI века». – Известия Российской Военно-медицинской академии. – 2017. – Т. 36, № 2, прил. 1. – С. 21-22.
3. Сведения о пожарах и их последствиях за январь-декабрь 2017 г. – Режим доступа: <http://www.mchs.gov.ru>, свободный.
4. Софронов, Г.А. Качество жизни лиц, перенесших острые отравления продуктами горения / Г.А. Софронов, В.С. Черный, М.В. Александров // Вестн. Рос. Воен.-мед. акад. – 2012. – Т. 2, № 38. – С. 6-10.
5. Тиунов, Л.А. Токсикология окиси углерода / Л.А. Тиунов, В.В. Кустов. – М., 1980. – 285 с.
6. Толкач П.Г. Оценка нарушений функций центральной нервной системы после тяжёлого отравления оксидом углерода в эксперименте / П.Г. Толкач, В.А. Башарин, А.Н. Гребенюк // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2015. – Т. 160, № 10. – С. 464-467.
7. Blomqvist, P. Characterization of the combustion products in large-scale fire tests: comparison of three experimental configurations / P. Blomqvist, A. Lonnermark // Fire Materials. – 2001. – Vol. 25, N 2. – P. 71-81.
8. Braubach, M. Mortality associated with exposure to carbon monoxide in WHO European member states / M. Braubach, A. Algoet, M. Beaton [et al.] // Indoor Air. – 2013. – Vol. 23. – P. 115-125.
9. Kao, L.W. Carbon monoxide poisoning / L.W. Kao, K.A. Nanagas // Med. Clin. North. Am. – 2005. – Vol. 89, N 6. – P. 1161-1191.

10. Oh, S. Acute carbon monoxide poisoning and delayed neurological sequelae: a potential neuroprotection bundle therapy / S. Oh, S. Choi // *Neural. Regen. Res.* – 2015. – Vol. 10, N 1. – P. 36-38.
11. Pauluhn, J.A. Retrospective analysis of predicted and observed smoke lethal toxic potency values /J.A. Pauluhn // *J. Fire Sciences.* – 1993. – Vol. 11, N 2. – P. 109-130.
12. Piantadosi, C.A. Carbon monoxide, oxidative stress and mitochondrial permeability pore transition / C.A. Piantadosi, M.S. Carraway, H.B. Suliman // *Free Radic. Biol. Med.* – 2006. – Vol. 40, N 8. – P. 1332-1339.
13. Prockop, L.D. Carbon monoxide intoxication: an updated review / L.D. Prockop, R.I. Chichkova // *J. Neurol. Sci.* – 2007. – Vol. 262, N 1-2. – P. 122-130.
14. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in carbon monoxide toxicity: an in-depth analysis / S. Akyol, S. Erdogan, F. Ucar et al. // *Redox. rep.* - 2014.- Vol.19. - P. 180-189
15. Thom, S.R. Delayed neuropathology after carbon monoxide poisoning is immune-mediated / S.R. Thom, V.M. Bhopale, D. Fisher // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101, N 37. – P. 13660-13665.
16. Wang, W. Effects of hydrogen-rich saline on rats with acute carbon monoxide poisoning / W. Wang, L. Tian, Y. Li [et al.] // *J. Emerg. Med.* – 2013. – Vol. 44, N 1. – P. 107-115.

Статья опубликована в журнале Medline.ru, том 20, ст.2 2019 год.