
ИММУНОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ ОТСТАВЛЕННОЙ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

*А.С. Пушкин, С.И. Дворецкая, Е.И. Малочкина,
Н.В. Образцов, В.А. Петрунин*

Федеральное Государственное унитарное предприятие
Государственный научно-исследовательский институт
органической химии и технологии

В статье сделана попытка выйти за рамки традиционного понимания отставленных полинейропатий (ОНТ) как результата сугубо нейротропного действия фосфорорганических соединений. С позиции авторов патогенетический механизм данного токсического поражения скорее связан с влиянием на всю триаду регуляции гомеостаза, а именно – ее эндокринные, иммунные и нервные звенья. Обнаруженный в ходе выполненных экспериментов факт ранней и высокочувствительной реакции циркулирующих лимфоцитов в виде отчетливых цитопатологических изменений побудил рассмотреть гипотезу о существовании иммунно-протекторного механизма. Последний, предположительно, оказывается самым уязвимым при воздействии веществ на особей, чей тимус находится в стадии субинволюции. В статье приведены цитоморфологические данные об изменениях циркулирующих лимфоцитов в крови половозрелых кур и крыс, а также сообщены некоторые результаты патогистологического обследования тимуса и надпочечников у крыс при системном воздействии модельными веществами, вызывающими ОНТ, – триортокрезилфосфатом и трифенилфосфитом. Правомочность выдвинутой гипотезы обсуждается.

An attempt to exceed the limits of traditional understanding of delayed polyneuropathy (DNT) as a result of particular neurotropic effect of organophosphorus compounds has been made in this paper. In authors' opinion, pathogenetic mechanism of this toxic damage must be connected with the influence on all homeostasis regulation triad that is its endocrine, immune, and nervous links. Early and high sensitive response of circulating lymphocytes as marked cytopathologic changes, found out experimentally, made the authors to examine a hypothesis of existence of immunoprotective mechanism that, possibly, is the most vulnerable when affecting individuals whose thymus is at a subinvolution stage. Cytomorphological data on changes of circulating lymphocytes in blood of pubertal hens and rats are cited in the article. Some results of pathohistologic investigation of thymus and adrenal glands in rats after systemic exposure to model substances inducing DNT – triorthocresyl phosphate and triphenyl phosphite – are reported. Correctness of the hypothesis is discussed.

Введение

Исследования в области обеспечения безопасности при контакте с фосфорорганическими соединениями (ФОС) актуальны в связи с масштабной распространенностью пестицидов и гербицидов. Известно, что самой частой формой отдаленных последствий воздействия ФОС являются энцефалополинейропатии, приводящие к тяжелой инвалидизации пораженных. В последние десятилетия выделена и пристально изучается в клинике и в эксперименте весьма

характерная форма неврологических расстройств, названная «синдромом отставленной нейропатии, вызываемой ФОС» – ОНТ [1, 2]. Выявлен ряд соединений, способных при однократной или субхронической аппликации индуцировать соответствующие биохимические, патофизиологические и патонейрогистологические проявления [3, 4]. Идентифицирован и локализован фермент-маркер – нейротоксическая эстераза (НТЭ), по ингибированию которого прогнозируют развитие ОНТ-синдрома. Однако эту задачу, несмотря на значительный круг уже

проведенных исследований [5–7], окончательно решенной считать нельзя.

Данная работа явилась частью комплекса медико-биологических исследований, направленных на раннюю диагностику ОНТ в преморбидном периоде, дальнейшее изучение механизмов отставленных поражений ФОС и создание прогнозной модели для скрининга потенциально опасных в этом отношении химических веществ.

Любой путь поступления ФОС в организм неизбежно проходит через структуры, из которых состоят гистогематические барьеры (ГГБ). Клеточные компоненты экстравазальной части ГГБ помимо покровного эпителия (эндотелия) и клеток соединительной ткани (фибробластов), включают тканевые макрофаги и лимфоциты, полиморфно-ядерные лейкоциты и тучные клетки. Внутрисосудистая часть ГГБ представлена клетками эндотелия. В просвете сосудов, кроме того, находятся циркулирующие клетки – лейкоциты, тромбоциты. Все названные типы клеток в первую очередь подвергаются воздействию веществом, что способно резко нарушать их сбалансированную функциональную кооперацию. Под влиянием мембранотропного действия веществ изменяется секреторная активность клеток и, в частности, выработка постоянных и временных межклеточных медиаторов, тканевых регуляторов проницаемости. Иницируется также хемотаксис лейкоцитов и освобождение цитокинов, кардинально меняется сложный каскад взаимодействий в системе иммунокомпетентных клеток – эффекторов и модуляторов. Таким образом, ФОС в самом начале своего действия способны инициировать освобождение и генерализацию большого количества эндогенных гуморальных стимулов, оказывающих неспецифическое воздействие на органы управления эндокринной и иммунной системой.

Названные процессы, по-видимому, происходят еще до того, как вещество полностью распределилось в клетках и волокнах нервной системы. Это рассуждение приводит к логичному предположению о том, что поиск ранних изменений следует начинать с выявления признаков клеточных реакций на уровне структур ГГБ.

Лейкоциты и тромбоциты циркулирующей крови, являясь представителями ГГБ, содержат НТЭ и поэтому могут служить доступным для прижизненных наблюдений и вполне адекватным материалом для решения задачи ранней диагностики скрытого периода ОНТ-синдрома. В данной работе использован именно этот подход при проведении цитоморфологических и биохимических исследований, объектом которых были выбраны лимфоциты.

При создании экспериментальной модели были использованы вещества, которые широко известны своей способностью вызывать отставленную нейропатию. Характер, динамика и топографические особенности распределения пораженных нейронов, миелиновых волокон и их окончаний при действии этих веществ довольно подробно изучены и описаны [8–10].

В этой работе действие разных доз веществ испытывалось на взрослых курах, у которых ОНТ-синдром клинически отчетливо воспроизводится на 8–21-й день после однократного воздействия. Аналогичные опыты были проведены на половозрелых крысах, неврологические проявления ОНТ ФОС у которых после однократного воздействия не зарегистрированы. Наличие или отсутствие органических расстройств нервной системы в проведенных опытах подтверждалось нейрогистологическими наблюдениями. Работа с крысами представляла интерес для выяснения характера *не неврологических* проявлений интоксикации и, в частности, для патоморфологического изучения тимуса и надпочечников, ответственных за организацию иммунного и эндокринного контроля гомеостаза. Следует отметить, что у половозрелых кур тимус редуцирован почти полностью.

Итак, основная цель работы состояла в морфологическом анализе возможных изменений цитоструктуры лимфоцитов, которые одними из первых клеточных типов взаимодействуют с веществами. Следовательно, такие изменения могут быть симптоматичными для раннего периода интоксикации.

Для выяснения возможного участия в патогенезе ОНТ-синдрома эндокринной системы и

центрального звена управления иммунным статусом было предпринято гистологическое обследование функционально тесно сопряженных органов надпочечников и зубных желез у крыс, подвергавшихся действию триортокрезилфосфата (ТОКФ) и трифенилфосфита (ТФФ).

Для проверки предположения об иммуннопротекторной роли тимуса начаты эксперименты на крысах с искусственной инактивацией Т-лимфоцитарного пула дексаметазоном и последующим введением ТОКФ.

Материалы и методы

В работе использовано 40 кур породы русская белая и голландской породы Родонит, весом около 1,5 кг, в возрасте 8–16 месяцев и 46 белых крыс линий Wistar и Sprague Dowly шестимесячного возраста. Животным для моделирования нейроинтоксикации вводили однократно внутрижелудочно ТОКФ и ТФФ в подсолнечном масле. Дозовый уровень вводимых веществ варьировал от близкого к 1 LD₅₀ до 0,002 LD₅₀. В качестве контрольных использовались интактные животные, которым вводили растворитель. Поступавшие из питомника животные проходили карантин в течение 14 дней. Общее содержание животных, рацион питания был организован в соответствии с ветеринарно-санитарными правилами.

Отдельной группе из 18 крыс для искусственного подавления иммунитета вводили дексаметазон в количестве 2,0 мг на животное ежедневно в течение 5 дней, а после этого вводили ТОКФ в дозе 1,0 г/кг внутрижелудочно, ежедневно в течение 4 дней. Материалы для морфологических исследований в этом эксперименте группировались следующим образом: 3 интактных крысы служили контролем, 3 крысы были умерщвлены через 2 дня после окончания курса дексаметазона, 3 крысы были забиты сразу после окончания введений ТОКФ, 3 крысы – через 8 дней, 2 – через 20 и 4 – через 40 дней после окончания введений ТОКФ.

Пробы крови у кур отбирались прижизненно в различные сроки после введения веществ и

при декапитации в конце опытов. Из образцов отобранной крови готовили мазки, которые подвергались окрашиванию и микроскопическому обследованию с подсчетом патологически измененных лимфоцитов в случайно выбранных полях зрения. На каждой мазке осматривалось не менее 100 клеток. Для нейрогистопатологического контроля за развитием ОНТ-синдрома у кур при вскрытиях иссекали образцы продолговатого мозга, спинного мозга на уровне поясничного утолщения и седалищного нерва. Далее готовили из них гистологические препараты. При вскрытиях умерщвленных крыс извлекали надпочечники и тимус и также готовили из этих органов гистологические препараты. В опытах с применением дексаметазона, помимо зубных желез и надпочечников, брались образцы продолговатого мозга и седалищного нерва. В ряде опытов определяли массовый коэффициент тимуса и надпочечников. Данный показатель исчислялся как частное от деления массы органа в граммах на величину массы тела в килограммах.

Цитологические и гистологические методы. Мазки крови окрашивались экспресс-методом, рекомендованным фирмой-производителем стандартных гематологических красителей Май-Грюнвальда и Романовского-Гимза. После пятиминутного окрашивания в неразбавленном маточном растворе первого красителя мазки переносили в тот же, но разбавленный фосфатным буфером в соотношении 2:3 раствор, а затем – в разбавленный 3:4 раствор красителя Романовского-Гимза на 10 мин. После отмытки в проточной воде и высушивания мазки микроскопировали с использованием масляной иммерсии и объектива $\times 90$.

Образцы тканей, взятые для гистологических исследований, фиксировали в 4%-ном растворе нейтрального формалина в течение 2–5 дней, промывали проточной водой, обезвоживали в спиртовых растворах восходящей крепости (30, 50, 70, 96 и 100%) и пропитывали в трех последовательно сменяемых порциях парафина при температуре 56°C в течение 2 суток. Далее кусочки тканей заливали в парафиновые блоки,

и готовые блоки резали на микротоме. Толщина срезов составляла 5–10 мкм. Срезы депарафинировали и подвергали окрашиванию. Для окраски использовали обычные красители: гематоксилин и эозин, крезильовый фиолетовый, метиленовый синий, Романовского-Гимза. Для выявления дегенерированных нервных проводников использовали импрегнацию срезов в 1%-ном растворе OsO_4 с последующей докраской в 1%-ном растворе парафенилендиамина. Микроскопию гистологических препаратов проводили при различных оптических увеличениях.

Статистические методы. При анализе процента измененных лимфоцитов в мазках крови и дегранулированных тучных клеток в препаратах тимуса исчисление полуширины доверительного интервала средних значений и их сравнение производилось с использованием критерия «U», предназначенного для биномиальных распределений чисел [11]. Статистическая обработка данных по изменениям массовых коэффициентов органов проводилась по Стьюденту.

Результаты

Нейрогистологические наблюдения. Данные нейрогистологического контроля за развитием гистопатологических изменений у кур подтвердили наличие дегенерации миелиновых волокон в продолговатом и спинном мозге, а также в отдельных пучках седалищного нерва при действии близких к LD_{50} доз испытывавшихся веществ через 8, 12, 21 и 35 дней после однократных воздействий. У большинства подопытных кур именно в эти сроки развивались отчетливые проявления нейропатии в форме парезов и атаксии. Таким образом, отмечавшиеся в ходе клинических наблюдений двигательные нарушения, действительно, имели свою органическую природу.

Цитология мазков крови. Цитологическое изучение лимфоцитов в мазках цельной крови кур и крыс, подвергавшихся воздействию веществ, позволило обнаружить ряд патологических изменений в этих клетках. Выявленные аномалии в строении лимфоцитов характеризо-

вались эктопией ядер и снижением их базофилии, вакуолизацией и/или набуханием цитоплазмы, а также образованием многочисленных протоплазматических выростов, напоминающих псевдоподии амебы. Примеры подобных изменений приведены на рис. 1. Эти патологические признаки выявлялись либо вместе, либо по отдельности. Однако все они явно свидетельствовали о нарушении формы клеток и грубом изменении их поверхности. Клетки с измененной формой подсчитывались, и их содержание в мазках исчислялось в процентах к общему числу просмотренных клеток. Величина этого показателя расценивалась как величина эффекта веществ. Обобщенные данные представлены в табл. 1.

В ситуациях с воздействием ТОКФ как на материале крови кур, так и у крыс прослеживается тенденция к дозовой зависимости эффекта. Интересно, что 12 мг/кг ТОКФ, составившие 0,004 LD_{50} у крыс-«переростков», вызвали почти тотальное поражение лимфоцитов, что можно было бы объяснить инволюцией тимуса, но не торможением пролиферативной активности лимфоидного ростка костного мозга, поскольку через трое суток доля аномальных лимфоцитов

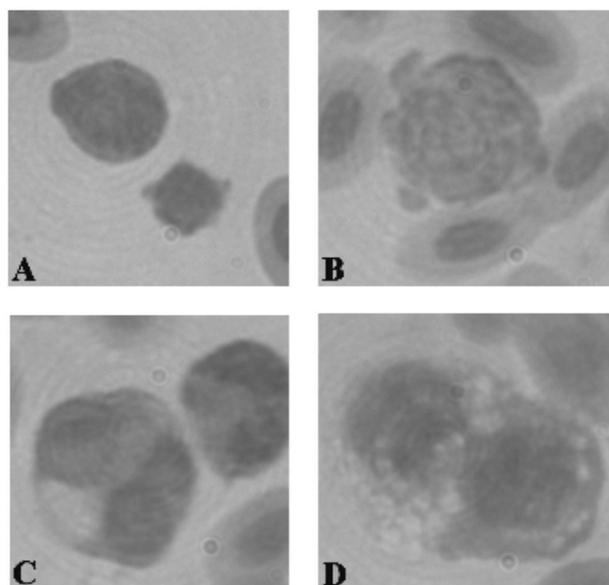


Рис. 1. Типичные формы цитоморфологических изменений в лимфоцитах и моноцитах крови после введения ФОС.

А, В – деформация наружной поверхности клетки
С, D – фагоцитоз и вакуолизация моноцитов

Таблица 1. Изменение содержания аномальных форм лимфоцитов в мазках из цельной крови кур и крыс в наиболее ранние сроки наблюдений после воздействия ТОКФ и ТФФ*

Вещество	Лимфоциты крови кур			Лимфоциты крови крыс		
	доза, мг/кг	экспозиция, мин	X % ± I**	доза, мг/кг	экспозиция, мин	X % ± I**
ТОКФ	1500,0	120	41,1 ± 3,93	1500,0	180	52,6 ± 5,60
	1500,0	60	38,0 ± 3,88	300,0	180	43,0 ± 5,61
	1000,0	120	36,5 ± 4,71	30,0	180	29,3 ± 5,15
	контроль	–	14,8 ± 0,94	контроль	–	5,18 ± 0,83
				12 мг/кг***	180	81,7 ± 2,86
				контроль	–	9,5 ± 2,03
ТФФ	500,0	120	50,0 ± 6,92	1900,0	180	24,0 ± 4,89
	500,0	80	43,6 ± 5,61	390,0	180	23,6 ± 4,80
	650,0	120	31,3 ± 0,86	39,0	180	25,6 ± 4,93
	650,0	60	37,3 ± 2,79	контроль	–	5,18 ± 0,83
	650,0	30	58,5 ± 2,46			
	контроль	–	14,8 ± 0,94			

* В таблицу включены данные, полученные при испытании наименьших из обследованных доз веществ.

** Жирным шрифтом обозначены величины среднего процента аномальных форм лимфоцитов, отличающиеся от контроля с вероятностью $\geq 95\%$.

*** Этот опыт проведен отдельно (на крысах с массой тела более 0,3 кг) с целью установить порог повреждающего лимфоциты действия токсикантов. С учетом новых условий опыта сделан дополнительный контроль.

(10,9 ± 2,3) практически не отличалась от контроля (9,5 ± 2,03).

Изменение формы лимфоцитов находит свое наиболее вероятное объяснение в действии веществ на мембранные белки и, в том числе, возможно, на кальциевые каналы, благодаря чему запускается Ca^{2+} -зависимый механизм перестройки цитоскелета. В этой связи уместно напомнить, что последние исследования возможного механизма нейрональной деструкции при отставленной нейропатии связывают с первоначальной дезорганизацией тубулина – одного из основных цитоскелетных белков [12].

Эффекты иных доз веществ и экспозиций после воздействий ими, как в опытах на курах, так и на крысах, различаются не существенно. Это свидетельствует о том, что средний процент поврежденных лимфоцитов не является показателем, пригодным для суждений о специфичности влияния веществ на НТЭ этих клеток. Тем

не менее, этот показатель достоверно и значимо изменялся даже при воздействии веществами на уровне 0,004–0,002 LD₅₀, что указывает на весьма высокую чувствительность лимфоцитов к примененным воздействиям.

Гистопатология тимуса крыс. Предметом исследования в вилочковой железе была оценка дегрануляции тучных клеток, локализованных в соединительной ткани капсулы и междольковых прослоек. В обследованных срезах обычно насчитывалось от 130 до 200 и более тучных клеток, вполне определенно идентифицируемых по наличию крупных базофильных гранул, имеющих метакроматическую ярко-фиолетовую окраску с малиновым оттенком. По количеству, плотности расположения и локализации гранул наблюдавшиеся тучные клетки разделялись на три типа, что демонстрируется на рис. 2. Первый тип клеток характеризовался овоидной формой и крупными размерами, наличием хо-

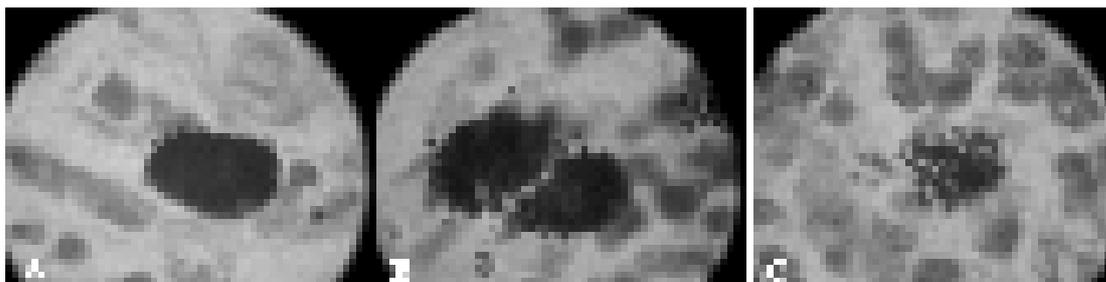


Рис. 2. А – тучная клетка стромы тимуса; В – умеренная дегрануляция тучных клеток в строме тимуса; С – сильная дегрануляция тучных клеток в строме тимуса

рошо заметной оболочкой и локализацией гранул строго в пределах цитоплазматического контура. При этом у большинства клеток подобного типа плотность расположения гранул в цитоплазме была чрезвычайно высокой. Второй тип клеток характеризовался частичной или полной неразличимостью оболочки и отчетливым выходом гранул за ее пределы. Экзоцитированные гранулы располагались вблизи клетки в небольшом или значительном количестве. Тем не менее, и цитоплазма, и ядро клетки выглядели вполне сохранными. Третий тип клеток характеризовался полным отсутствием цитоплазматической оболочки и ядра, что являлось, по существу, признаком цитолиза. При этом оставшиеся на месте клетки гранулы образовывали характерные пылевидные скопления.

Как следует из этого описания и приведенных иллюстраций, вышеобозначенные типы

тучных клеток морфологически соответствуют различным уровням их функционирования, главным образом, в отношении дегрануляции. Анализ дегрануляции производился на основании подсчета тучных клеток вышеописанных типов и определения их процентного содержания в срезах железы. Обобщенные данные обследования дегрануляции в тимусе через 3 часа после воздействия веществами представлены в табл. 2.

Предпринятое обследование тучных клеток тимуса показало, что оба вещества оказали значительное влияние на функциональную активность этих клеток и вызвали достоверное и существенное усиление дегрануляции.

По сравнению с контролем во всех опытах проявилась заметная диспропорция в содержании клеток различных типов. С наибольшей наглядностью обнаруживается увеличение содержания

тотально дегранулированных клеток. Как видно из приведенных в таблице данных, через 3 часа максимум тотальной дегрануляции (тип III) имел место при действии 390,0 мг/кг и 0,92 мг/кг ТФФ, а минимум – при действии 30,0 мг/кг ТОКФ. Предпринятые подсчеты не обнаруживают дозовой зависимости. Однако остается фактом, что дегрануляция тучных клеток усиливается даже при действии самых низ-

Таблица 2. Влияние ТОКФ и ТФФ на дегрануляцию тучных клеток в тимусе крыс через 3 часа после воздействия*

Вещество	Доза, мг/кг	Средний % тучных клеток		
		тип 1	тип 2	тип 3
Контроль	–	43,9 ± 2,29	40,2 ± 2,26	5,1 ± 1,01
ТФФ	1900,0	32,5 ± 3,74	49,8 ± 4,00	17,7 ± 3,05
	390,0	30,3 ± 3,67	50,3 ± 4,00	19,3 ± 3,15
	39,0	28,2 ± 3,59	60,5 ± 3,96	14,7 ± 2,83
ТОКФ	1500,0	24,3 ± 3,43	58,0 ± 3,92	15,6 ± 2,90
	300,0	30,0 ± 3,66	58,0 ± 3,99	16,6 ± 2,97
	30,0	33,5 ± 3,77	54,0 ± 3,98	12,5 ± 2,64

* Жирным шрифтом показаны значения % тех или иных типов тучных клеток, отличающиеся от контроля с вероятностью ≥ 95%.

ких из примененных дозировок, соответствующих уровню 0,01 LD₅₀.

Исследования массового коэффициента тимуса крыс через 24 часа после воздействия выявило значительное и достоверное возрастание этого показателя при воздействии на уровне 0,5, 0,2, 0,1 и 0,01 LD₅₀ ТФФ (от $0,118 \pm 0,132$ до $0,147 \pm 0,076$ в опыте против $0,07 \pm 0,032$ в контроле). Данные анализа дегрануляции тучных клеток через сутки после воздействия примененными дозами ТФФ также демонстрируют высоко достоверное ее усиление в тимусе. Это в определенной мере объясняет увеличение массы органа тем, что усиленная экскреция гистамина и других факторов способствует капиллярному полнокровию, повышению проницаемости и миграции в строму полиморфно-ядерных лейкоцитов. Все эти проявления зафиксированы нами при гистологическом изучении препаратов тимуса. Интересен также и выявленный нами факт угнетения митотической активности лимфоцитов в наружных зонах лимфатических долек при воздействии 0,2 LD₅₀ ТФФ (1500,0 мг/кг). Среднее число митозов при этом составило $1,45 \pm 0,43$ против $2,75 \pm 0,81$ в контроле.

Обследование тимуса крыс, таким образом, демонстрирует его отчетливую функциональную вовлеченность в целостную реакцию организма на введение веществ, потенциальных в отношении ОНТ ФОС.

Гистопатология надпочечников. Опыты с крысами предусматривали использование дозировок, рассчитанных как 0,2, 0,1, 0,01 от LD₅₀ для ТФФ и ТОКФ. В этой статье влияние каждой из доз рассмотрено только в части материалов трехчасовой экспозиции. При вскрытиях у большинства опытных животных было отмечено, что над верхним полюсом обеих почек имеется полнокровие надпочечниковых сосудов и в отдельных случаях – видимое на глаз геморрагическое пропитывание околопочечной клетчатки. У контрольных животных подобное расстройство кровообращения не обнаруживалось. Микроскопия препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, позволила подтвердить чрезвычайное полнокровие внутриорганных

сосудов. Наиболее сильно полнокровие проявилось после введения ТФФ, однако различий выраженности и распространенности этого признака при действии кратно уменьшающихся доз не обнаружено. Полнокровие при действии ТОКФ оказалось менее выраженным в этот срок, причем данный эффект вещества также не зависел от дозового уровня воздействий. Еще одним, достаточно ярким признаком повреждения тканевой структуры надпочечника оказалась вакуольная дистрофия и цитонекроз значительного числа хромаффинных клеток мозгового вещества.

Влияние последовательного субхронического введения дексаметазона и ТОКФ. Известная способность синтетических аналогов глюкокортикоидов подавлять иммунитет, по-видимому, не может не сказаться на структурно-функциональной состоятельности тимуса, надпочечников и костного мозга и, следовательно, иммунной реактивности в целом. Гормональное угнетение деятельности тимуса использовано нами для проверки гипотезы о том, что полноценное функционирование этого органа тормозит или предотвращает развитие ОНТ-синдрома, который вызывают ФОС.

В опытах на крысах обследованы массовые коэффициенты тимуса и надпочечников и проведена предварительная гистологическая оценка состояния миелиновых волокон продолговатого мозга и седалищного нерва при воздействии на животных дексаметазоном в течение 5 дней (по 2,0 мг на животное ежедневно внутрибрюшинно) и последующем введении ТОКФ в субклинической дозе (1/3 LD₅₀ – 1,0 г/кг) при ежедневных аппликациях в течение 4 дней.

В соответствующие выбранным экспозициям сроки животных декапитировали и подвергали вскрытию. Иссеченные образцы продолговатого мозга и седалищного нерва фиксировали смесью 2,5% глютарового альдегида и 4% формалина, затем импрегнировали 1%-ным раствором OsO₄, обезвоживали и заключали в эпон 812. С помощью ультрамикротомы ЛКВ-III изготавливали срезы толщиной 2,5–5 мкм и монтировали их на предметные стекла, после чего

окрашивали 1 мин в 1%-ном растворе парафенилендиамина и подвергали светооптической микроскопии. Препараты обследовали на предмет выявления дегенерирующих миелиновых волокон во всем поперечнике нерва и в половине поперечника продолговатого мозга. Перед забоем животных взвешивали, а также взвешивали извлеченные при вскрытии вилочковые железы и надпочечники.

Данные, касающиеся изучения массовых коэффициентов тимуса и надпочечников, приведены в табл. 3.

Таким образом, дисфункция, вызываемая воздействием дексаметазона, приводит к значимой редукации массы тимуса и нарастанию массы надпочечника, что усугубляется дополнительным введением ТОКФ. Однако массовый коэффициент тимуса проявляет тенденцию вновь увеличиваться через 20 и 40 дней после прекращения введения ТОКФ.

Начато систематическое микроскопическое изучение препаратов нервной системы. В порядке предварительного сообщения можно отметить, что, в отличие от контроля, в ряде препаратов седалищного нерва, полученных через 20 и 40 дней после окончания введений ТОКФ,

обнаружены многочисленные дегенерирующие миелиновые волокна.

Обсуждение

Результаты проведенных морфологических исследований позволили установить следующие факты: в самые ранние сроки после введения модельных ФОС изменяется морфология значительного числа лимфоцитов циркулирующей крови. Эти клетки подвергаются деструктивным изменениям, характеризующимся набуханием и вакуолизацией цитоплазмы, появлением полипообразных цитоплазматических выростов, снижением тинкториальных свойств и эктопической дислокацией их ядер. Подсчеты содержания таких клеток в условиях воздействия различными веществами, различными дозами и через различные промежутки времени после аппликаций не выявили принципиальных различий, которые смогли бы указать на ту или иную специфику действия веществ. Вместе с тем то, что доля измененных клеток в среднем составляла примерно от трети до половины всех наблюдавшихся лимфоцитов, а также то, что даже самые малые из примененных доз приводили к подобным поражениям, свидетельство-

вало о чрезвычайной чувствительности лимфоцитов к воздействиям веществами. Хотя мы не имеем прямых доказательств связи этих морфологических изменений с ингибированием НТЭ лимфоцитов, это обстоятельство не мешает придавать им значение одного из ранних симптомов интоксикации ФОС, который в совокупности с биохимическими показателями позволил бы более обоснованно подойти к описанию преморбидной стадии ОНТ.

Выявленные изменения лимфоцитов указывают на их массовую гибель в результате интоксикации, что согласуется с давно описанным гематологическим симптомом острых и хронических поражений ФОС у человека – лимфопенией.

Таблица 3. Данные изучения коэффициентов массы тимуса и надпочечников при воздействиях дексаметазоном и ТОКФ

Воздействие	Средняя величина массового коэффициента тимуса	Средняя величина массового коэффициента надпочечника
Контроль	1,037 ± 0,0299	0,053 ± 0,0027
Дексаметазон (2 мг, 5 дней)	0,440 ± 0,0706	0,057 ± 0,0033
Дексаметазон (2 мг, 5 дней) + ТОКФ (1,0 г/кг)	0,347 ± 0,0688	0,093 ± 0,0205
20 дней после прекращения ТОКФ	0,661 ± 0,0191	0,069 ± 0,0230
40 дней после прекращения ТОКФ	0,698 ± 0,0643	0,11 ± 0,0380

Ранняя и столь выраженная поражаемость лимфоцитарного пула со всей очевидностью демонстрирует тот факт, что патогенез интоксикации ФОС в первую очередь инициируется при посредстве иммунной системы, клетки которой представляют собой распространенную во всех органах и тканях гуморально-связанную единую иммунную сеть. Согласно современным воззрениям, иммунная, нервная и эндокринная системы являют собой целостную регуляторно-управленческую метасистему [13]. Они обладают перекрестной чувствительностью к влияниям гормонов, иммуно- и нейромедиаторов, олигопептидов и других факторов эндогенной природы, секретируемых такими клетками, как эндотелий сосудов и клетки сосудистого микроокружения. В головном мозге к ним относятся клетки астро- и олигодендроглии, а в периферических нервах еще и шванновские клетки. Именно эти структуры формируют гемато-невральный барьер, нарушение проницаемости которого и обуславливает специфику их нейротропного действия.

Таким образом, протекторная роль барьерных образований и сохранность механизмов управления их проницаемостью, со всей очевидностью, представляется необходимой для предотвращения генерализованных токсических поражений, к числу которых можно с полным основанием отнести и ОНТ-синдром. Очевидно также, что тимус и надпочечник, будучи железами, ответственными за такое управление, не могут не вовлекаться в реакцию организма биообъекта на действие ФОС.

Проведенные нами морфологические исследования отчетливо подтвердили это. В тимусе выявлено усиление дегрануляции тучных клеток и уменьшение митотической активности Т-лимфоцитов. В надпочечниках обнаружено полнокровие внутриорганных сосудов и некробиотические повреждения клеток мозгового вещества. Весьма вероятно, что при более подробном морфологическом изучении состояния этих органов другими, более тонкими методами – электронной микроскопии, иммуно-гистохимическим маркированием специфических ре-

цепторов поверхности, а также гистохимической оценкой содержания катехоламинов в клетках надпочечников, станет возможным конкретизировать детали развивающихся нарушений. Однако и тех признаков, которые установлены в данной работе, на наш взгляд достаточно, чтобы вполне определенно судить об обязательной причастности лимфоцитов, тимуса и надпочечников к закономерному развитию последующих повреждений ГГБ и, соответственно, – непосредственному действию веществ на нервную ткань.

Для дополнительной проверки правомочности выдвинутого нами предположения о протекторной роли этих органов при воздействии токсикантами были предприняты модельные опыты с прицельным повреждением их функционирования с помощью предварительного введения синтетического гормона дексаметазона.

Известно [14], что физиологическое действие дексаметазона индуцирует активность ряда ферментов углеводного и аминокислотного обмена, усиливает действие катехоламинов, приводит к иммуносупрессии с подавлением синтеза, выброса и рецепторного связывания медиаторов воспаления. Особое значение имеют данные о влиянии кортикостероидов на лимфоциты и моноциты (макрофаги). В опытах *in vivo* и *in vitro* показано, что гормон подавляет пролиферацию лимфоцитов, вызванную митогенами, подавляет освобождение лимфокинов, снижает цитотоксичность Т-киллеров и повышает активность Т-супрессоров. Отмечается, что дексаметазон преимущественно влияет на пул Т-клеток. Он также подавляет хемотаксис, фагоцитарную бактерицидность и секреторную активность моноцитов. Под влиянием гормона снижается рецепторная чувствительность моноцитов и других клеток-мишеней к действию лимфокинов. Таким образом, нарушаются локальные межклеточные взаимодействия, что чревато существенными сдвигами в соотношении численности клонов различных Т-лимфоцитов. В этой связи полученные в ходе данного исследования результаты по уменьшению мас-

сы тимуса, ответственного за дифференцировку именно этих клеток, существенно дополняют картину механизма иммуносупрессивного действия дексаметазона.

Стимуляция дексаметазоном синтеза и освобождения катехоламинов находит, как показали проведенные в этой работе измерения, выражение в приросте массы надпочечников. Неожиданным фактом оказалось резкое усиление этого прироста после воздействия на крыс, получивших курс дексаметазона, триортокрезилфосфатом. Это, вероятно, может быть вызвано нарастающим в динамике интоксикации полнокровием и отеком органа, усугубляемыми резорбцией некротизированных хромаффинных клеток мозгового вещества. Такая возможность, однако, нуждается в детальном гистопатологическом подтверждении.

Итак, приведенные результаты патоморфологических исследований указывают на раннюю вовлеченность в патогенез интоксикации ТОКФ и ТФФ циркулирующих лимфоцитов, тимуса и надпочечников. Кроме того, применение иммуносупрессанта – дексаметазона, предшествующее аппликации ТОКФ, как показали предварительные наблюдения, возможно, промотирует деструкцию миелиновых волокон в нервной системе у крыс. Эти факты подтверждают правомочность гипотезы о причастности иммунных механизмов к развитию ОНТ ФОС.

Работа выполнена при поддержке МНТЦ, проект № 574.

Литература

1. *Khurana D., Prabhar S.* Organophosphorus intoxication // *Arch. Neurol.* 2000. V. 57, № 4, p. 600–602.
2. *Aldndge N.* Postscript to the symposium on organophosphorus compound induced delayed neuropathy // *Chem.-Biol. Interact.* 1993. V. 87, № 1–3, p. 463–466.
3. *Abdelsalain E.B.* Neurotoxic potential of six organophosphorus compounds in adult hens // *Vet. and Hum. Toxicol.* 1999. V. 41, № 5, p. 290–292.
4. *Richardson R.J.* Assessment of neurotoxic potential of clorpyrifos relative to other organophosphorus compounds – a critical review of the literature // *J. Toxicol. and Environ. Health.* 1995. V. 44, № 2, p. 135–165.
5. *Kamijuma M., Casida J.I.* Localization of [³H]octylphosphonyl-labeled neuropathy target esterase by chicken nervous tissue autoradiography // *Neurosci. Lett.* 1999. 1, V. 273, № 2, p. 101–104.
6. *Katoh K.* A review of studies of delayed neurotoxicity induced by organophosphorus esters // *Sangyo Eieigaku Zasshi.* 1995. V. 37, № 5, p. 309–319.
7. *Glynn P.* Neural development and neurodegeneration – two faces of neuropathy target esterase // *Progr. Neurobiol.* 2000. V. 61, № 1, p. 61–74.
8. *Fioroni F., Moretto A., Lotti M.* Triphenylphosphite neuropathy in hens // *Arch. Toxicol.* 1995. V. 69, № 10, p. 705–711.
9. *Lehning E.J. et al.* Triphenyl phosphite and diisopropylphosphofluoridate produce separate and distinct axonal degeneration pattern in the central nervous system of the rat // *Fundam. and Appl. Toxicol.* 1990. V. 29, № 2, p. 110–118.
10. *Randall J.C., Yano B.I., Richardson R.J.* Potentiation of organophosphorus compound induced delayed neurotoxicity (OPIDN) in central and peripheral nervous system of adult hen – distribution of axonal lesions // *J. Toxicol. and Environ. Health.* 1997. V. 51, № 6, p. 571–590.
11. *Урбах Ю.* Статистический анализ в медицинских и биологических исследованиях. М., 1975.
12. *Chloudhary S. et al.* Possibility of enhanced microtubule phosphorylation in dichlorvos induced delayed neurotoxicity in rat // *Brain Res.*, 2001. 6, V. 897, № 1–2, p. 60–70.
13. *Полетаев А.Б., Морозов С.Г., Ковалев И.Е.* Регуляторная метасистема – иммунонейроэндокринная регуляция гомеостаза. М.: Медицина, 2002.
14. В кн.: «Клиническая иммунология и аллергология» (пер. с нем.). Ред. Л. Йегер. М., 1986.