

УДК: 616.021; 616-099; 614.8.084

Влияние фосфорорганических соединений на функцию внешнего дыхания крыс при интратрахеальном и внутрижелудочном введении

©2021. А.А. Кряжевских^{1,2*}, А.А. Кряжевских^{1,2}, С.Н. Субботина¹, Н.А. Складорова²¹ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия² Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

* e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Поступила в редакцию 23.06.2021 г.

После доработки 28.06.2021 г.

Принята к публикации 30.06.2021 г.

В связи с ростом риска воздействия факторов химической природы на организм человека нами были смоделированы случаи возможного отравления фосфорорганическими соединениями на производствах. Учитывая, что специфическим проявлением интоксикации ядами данного класса является развитие дыхательной недостаточности, в эксперименте проведен сравнительный анализ функции внешнего дыхания крыс при интратрахеальном и внутрижелудочном введении диизопропилфторфосфата. В ходе проведения исследования были установлены средние летальные дозы токсиканта, на основе которых смоделированы условия интоксикации ДФФ. Так, при интратрахеальном введении LD₁₆ составила 0,284 мг/кг, а при внутрижелудочном введении – 1,6 мг/кг. Экспериментальные данные показали, что интратрахеальное поступление ФОС вызывает развитие дыхательной недостаточности уже в первые минуты после отравления. Восстановление показателей ФВД до фоновых значений отмечается через сутки после отравления. При внутрижелудочном пути поступления токсиканта скорость развития нарушений ФВД ниже, токсические эффекты сохраняются в течение двух суток. Полученные данные могут быть использованы при составлении соответствующих рекомендаций по предотвращению аварий и несчастных случаев на производствах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фосфорорганические отравляющие соединения; диизопропилфторфосфат; функция внешнего дыхания; дыхательная недостаточность; бронхоспазм; риски на предприятии; интратрахеальное введение; внутрижелудочное введение

DOI: <https://doi.org/10.17816/phf72068>

СОКРАЩЕНИЯ:

ДФФ – диизопропилфторфосфат;

LD₁₆ – доза токсиканта, вызывающая гибель 16% объектов эксперимента;

ФОС – фосфорорганические соединения;

ФВД – функция внешнего дыхания;

И/т – интратрахеальное введение;

В/ж – внутрижелудочное введение;

LD₅₀ – доза токсиканта, вызывающая гибель 50% объектов эксперимента;

ЕЕР – пауза после вдоха;

ЧДД – частота дыхательных движений;

Ренh – показатель бронхоконстрикции;

Тi – время вдоха;

РЕF – максимальная скорость выдоха;

ДО – дыхательный объем;

МОД – минутный объем дыхания.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время воздействие факторов химической природы на организм человека представляет серьезную угрозу для жизни работников профессионально вредных производств, таких как объекты по изготовлению и хранению фосфорорганических соединений, химические и сельскохозяйственные производства [1, 2]. В связи с нарушением правил техники безопасности, пренебрежением средствами индивидуальной защиты, а также использованием ФОС в больших дозах, как на производстве, так и в личных целях, ежегодно регистрируются миллионы случаев отравлений, из которых сотни тысяч – смертельные [3–5].

Известно, что одним из угрожающих жизни проявлений отравления ФОС является дыхательная недостаточность, выраженность которой зависит от дозы и пути поступления токсиканта [6]. Giyanwani PR, et al, проводившие анализ встречающихся в литературе данных по отравлениям ФОС, отмечают, что в 67,7% случаев дыхательная недостаточность развивается в ранние сроки после отравления, в первые 24 часа.

Основными механизмами патогенеза дыхательной недостаточности являются угнетение в вентролатеральном мозговом веществе центрального респираторного импульса из дыхательного центра, слабость дыхательной мускулатуры, бронхоспазм и бронхорея. Поздняя форма дыхательной недостаточности обусловлена периферической дисфункцией из-за длительной чрезмерной стимуляции нервно-мышечного соединения. Данная форма проявляется лишь у 30–32% пациентов [7].

Многообразие механизмов токсического действия ФОС обуславливает необходимость понимания патофизиологических механизмов, вызывающих дыхательную недостаточность. Изучение динамики показателей ФВД на фоне отравления ДФФ в сублетальных дозах позволит найти новые подходы к разработке средств купирования дыхательной недостаточности.

Цель исследования состояла в проведении сравнительного анализа влияния ФОС (на примере модельного соединения – диизопропилфторфосфата) на функцию внешнего дыхания крыс при интратрахеальном и внутрижелудочном введении в дозе LD_{16} .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ проводился на белых беспородных крысах, полученных из питомника «Рапполово» и прошедших карантин в течение 14 суток. Все работы выполняли по общепринятым этическим нормам обращения с животными, соответствующим правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Введение токсиканта в дозе LD_{16} осуществляли и/т из расчета 0,1 мл на 100 г и в/ж из расчета 1 мл на 100 г веса животного.

Регистрацию параметров ФВД проводили с помощью плетизмографа ecgTUNNEL (Emka Technologies, Франция) на протяжении минуты после стабилизации показателей, с использованием программы «IOXv 2.8».

Осуществляли анализ следующих показателей ФВД:

- время вдоха и выдоха;
- дыхательный объем;
- минутный объем дыхания;
- частота дыхательных движений;
- пауза после вдоха;
- максимальная скорость выдоха;
- интегральный показатель бронхоконстрикции.

Регистрацию показателей осуществляли за 30 мин (фон) до эксперимента, а также через 10, 30, 60, 120, 240 мин, 24 и 48 часов после введения ДФФ.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы STATISTICA, а полученные данные выражали в виде медианы и процентов [25; 75]. В ходе проведения анализа использовали непараметрические методы статистики: для сравнения количественных показателей – критерий Краскела-Уоллиса, для качественных показателей – критерий χ^2 . Критическое значение уровня статистической значимости принимали равным 0,05. Долю животных представляли в виде отношения количества животных с признаком к общему количеству их в группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов проводили оценку острой токсичности ДФФ при и/т и в/ж введении крысам, регистрировали срок развития признаков интоксикации. Установлено, что при и/т и в/ж введении ДФФ у крыс последовательно развиваются следующие признаки интоксикации: саливация, тремор жевательной мускулатуры, генерализованный тремор, клонико-тонические судороги.

Время развития симптомов отравления носит дозозависимый характер. В результате исследования были рассчитаны средние летальные дозы ДФФ. При и/т введении крысам LD_{16} и LD_{50} составили 0,284 и 0,886 мг/кг, при в/ж – 1,6 мг/кг и 5 мг/кг соответственно. Таким образом, LD_{16} при в/ж введении практически в шесть раз превышает аналогичный показатель, полученный в ходе определения средних летальных доз при и/т введении. Результаты экспериментального исследования согласуются с данными литературы [8].

При анализе параметров ФВД крыс после и/т введения ДФФ в дозе LD_{16} было выявлено, что в течение первых четырех часов после отравления модельный токсикант вызывает развитие затрудненного дыхания, а, следовательно, ухудшение вентиляции легких. Отмечали дву- или трехкратное увеличение пауз между вдохами (на 10-й минуте длительность ЕЕР составила 77 [61,1; 99,4] м/сек против фоновых значений 24 [19,3; 30] м/сек), уменьшение скорости выдоха (минимальное значение показателя отмечали на 120 мин – 13 [11,1; 15,9] мл/сек при 21 [12,3; 25,2] мл/сек в фоне). Частота дыхательных движений крыс в течение первых 30 минут после отравления была достоверно ниже исходных значений (рис. 1). Изменения показателя относительно фоновых значений составили более 55%. Полученные данные могли свидетельствовать об угнетении работы дыхательного центра животных. В свою очередь, снижение ЧДД приводило практически к двукратному снижению минутного объема дыхания крыс уже на 10-й минуте после введения ДФФ.

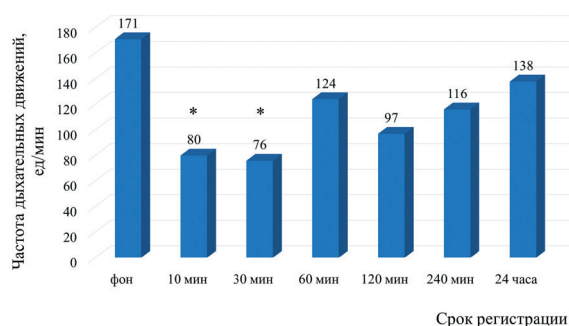


Рис. 1. Динамика частоты дыхательных движений крыс после и/т введения ДФФ в дозе LD₁₆.
Примечания: * значимые отличия от фоновых значений, при p<0,05; количество животных в группе n=12.
Fig. 1. Trends in the frequency of respiratory movements in rats after intratracheal administration (IA) of diisopropyl fluorophosphate (DFP) at a dose of LD₁₆.
Note: * significant differences from the background values, at p<0.05; number of animals in the group n=12.

Учитывая, что влияние ДФФ на развитие дыхательной недостаточности опосредуется через блокирование рецепторов симпатoadrenalовой системы и гипертрофирование бронхиальных желез, приводящее к увеличению секреции слизи, отмечали рост интегрального показателя бронхоконстрикции Penh. По отношению к фоновым значениям регистрировали практически двукратное повышение показателя на 10, 30 и 120 мин после и/т введения ДФФ. Так, в эти сроки значения показателя составили 1,3 [1,2; 2,5], 1,1 [1; 1,1] и 1 [1; 1,2] соответственно, против исходных 0,6 [0,5; 0,7]. Указанные изменения носили статистически значимый характер (рис. 2).

Частичное восстановление параметров ФВД регистрировали через сутки после начала эксперимента. Отмечали постепенное восстановление скоростных характеристик дыхания, объема вдыхаемого воздуха, снижение значений коэффициента бронхоконстрикции Penh. В то же время ЧДД через сутки составила 138 ед./мин, что было на 19% ниже исходного уровня. Подобные изме-

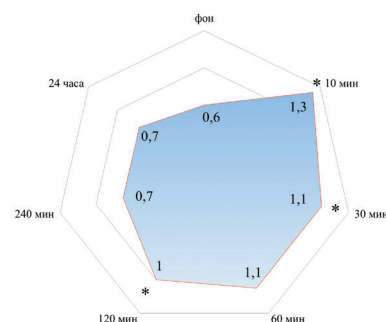


Рис. 2. Динамика показателя бронхоконстрикции Penh у крыс после и/т введения ДФФ в дозе LD₁₆.
Примечания: * значимые отличия от фоновых значений, при p<0,05; количество животных в группе n=12.
Fig. 2. Trends in Penh index of bronchoconstriction in rats after intratracheal administration of DFP at a dose of LD₁₆.
Note: * significant differences from the background values, at p<0.05; number of animals in the group n=12.

нения показателей ФВД свидетельствовали о снижении газообмена и развитии гипоксии у крыс на фоне острого отравления ДФФ.

Результаты оценки влияния ДФФ при в/ж введении в дозе LD₁₆ на показатели ФВД крыс представлены в таблице 1.

Внутрижелудочное введение ДФФ в дозе LD₁₆ вызывало у крыс развитие дыхательной недостаточности через 30 мин после аппликации. К этому сроку дыхание становилось редким, поверхностным.

Изменение характера дыхания опосредовалось статистически значимым увеличением потокового времени вдоха, пауз после вдоха, снижением объема вдыхаемого воздуха, частоты дыхательных движений. Достоверное снижение МОД также свидетельствовало об ухудшении вентиляции легких. О наличии повышенного сопротивления в дыхательных путях судили по повышению значений показателя бронхоконстрикции Penh.

Указанные изменения сохранялись на протяжении 24 часов. При оценке ФВД крыс через 48 часов

Динамика показателей ФВД крыс после в/ж введения ДФФ в дозе LD₁₆ (M [Q25; Q75]), n=12

Trends in the external respiratory function (ERF) indicators in rats after intraperitoneal (IP) administration of DFP at a dose of LD₁₆ (M [Q25; Q75]), n=12

Табл. 1.

Table 1.

Срок регистрации	Ti, м/сек	PEF, мл/с	ДО, мл	МОД, мл	ЧДД, ед./мин	ЕЕР, м/сек	Penh, мл/с
Фон	195 [151; 218,3]	21 [15,2; 24,5]	2,7 [2,3; 4]	449 [334,6; 530,9]	130 [120; 185]	25 [22,5; 32]	0,5 [0,4; 0,7]
10 мин	228 [201; 243]	28 [26,7; 31,8]	2,4 [2; 2,9]	340 [283; 442,5]	140 [132,1; 154,5]	25 [24; 30,5]	1,3 [1,2; 1,4]*
30 мин	265 [244,9; 276,3]*	19 [15,5; 21]	2,1 [1,6; 2,5]*	171 [142,8; 198,4]*	87 [69,9; 104,9]*	70 [40; 103,1]*	1,7 [1,4; 1,9]*
60 мин	267 [259; 293]*	17 [14,9; 19]	2,1 [1,6; 2,8]	192 [176,8; 247,0]*	98 [88,8; 112,1]*	43 [35,9; 63,3]*	1,3 [1,1; 1,5]*
120 мин	271 [268,5; 278]*	15 [13,1; 17,4]	2,0 [1,3; 2,7]*	229 [157,8; 295,1]*	106 [101; 107,4]*	43 [35,5; 52,1]*	1,2 [0,9; 1,4]*
240 мин	245 [232,5; 264,8]*	15 [11,7; 17,2]	1,5 [1,4; 2,2]*	183 [175,6; 189,3]*	121 [110,8; 128]*	26 [23; 28,8]	1,1 [0,9; 1,3]*
24 часа	247 [220,5; 265,6]*	22 [17,5; 25,3]	1,7 [1,3; 2,2]*	209 [142,3; 262,6]*	118 [101; 126,8]*	29 [24,8; 31,5]	0,9 [0,8; 1,2]
48 часов	182 [178,1; 198]	28 [21; 32,3]	3,1 [2,1; 3,5]	544 [407,5; 607]	159 [148,8; 168,5]	23 [22; 25,5]	0,7 [0,6; 0,9]

после интоксикации было установлено отсутствие значимых изменений параметров дыхания относительно фоновых значений, что свидетельствовало о восстановлении дыхательной функции животных. К этому же сроку отмечали улучшение общего состояния крыс.

Данные о распределении в опытных группах животных, у которых на фоне введения модельного токсиканта регистрировали развитие нарушений ФВД, подтверждают предположение о том, что при и/т введении скорость проявления дисфункции внешнего дыхания крыс выше, чем при в/ж введении (рис. 3).

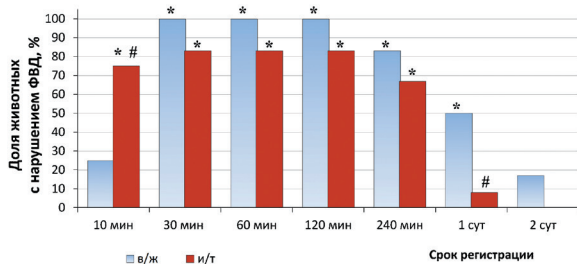


Рис. 3. Доля животных с нарушениями ФВД при и/т и в/ж введении ДФФ.

Примечания: критерий развития нарушений ФВД – снижение МОД ниже значений 25 процентиля; * – значимые отличия от фоновых значений, при $p < 0,05$; # – значимые отличия от значений животных, получавших ДФФ в/ж, при $p < 0,05$. Количество животных в каждой группе $n=12$.

Fig. 3. The proportion of animals with impaired ERF during IA and IPadministration of DFP.

Note: the criterion for the development of ERF disorders is a decrease in the respiratory minute volume (RMV) below the values of the 25 percentile; * – significant differences from the background values, at $p < 0,05$; # – significant differences from the values of animals receiving DFP, at $p < 0,05$; Number of animals in the group $n=12$.

Через десять минут после аппликации (и/т) снижение минутного объема вентиляции легких отмечали у девяти животных из двенадцати. В группе с внутрижелудочным введением ДФФ в этот срок нарушения по указанному показателю отмечали в 33% случаев (четыре из двенадцати). Различия носили статистически значимый характер.

Анализ показателя «доля животных с нарушениями ФВД» через сутки после интоксикации свидетельствовал о сохранении дисфункции внешнего дыхания у половины животных в группе при в/ж введении токсиканта. Аналогичный показатель в группе с и/т введением ДФФ не превышал 8,3% (одна из двенадцати).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boostani R, Mellat A, Afshari R, et al. Delayed polyneuropathy in farm sprayers due to chronic low dose pesticide exposure. *Iran Red Crescent Med J.* 2014 May; 16 (5): e5072.
2. Brenet A, Somkhit J, Hassan-Abdi R, et al. Organophosphorus diisopropylfluorophosphates (DFP)

Таким образом, длительность нарушений ФВД крыс, вызванных в/ж введением ДФФ, превышает аналогичные показатели, полученные при и/т введении.

ВЫВОДЫ

В ходе проведения исследования установлены средние летальные дозы ДФФ при интратрахеальном и внутрижелудочном введении крысам. При и/т введении LD₁₆ и LD₅₀ составили 0,284 и 0,886 мг/кг, при в/ж – 1,6 и 5 мг/кг соответственно.

На модели острого отравления крыс ДФФ в дозе LD₁₆ показано, что интратрахеальное поступление токсиканта вызывает развитие нарушений ФВД у крыс в течение первых десяти минут после введения. Наиболее выраженные изменения отмечали в период с десятой по сто двадцатую минуту после аппликации яда.

Высокая скорость развития при и/т введении признаков интоксикации, в том числе, скорость развития нарушений дыхания, свидетельствовали о запуске центральных механизмов развития органофосфат-индуцированной дыхательной недостаточности, связанных с угнетением активности дыхательного центра. В свою очередь, периферические эффекты влияния ДФФ на дыхание крыс проявлялись в значимом повышении интегрального показателя бронхоконстрикции Penh. Полученные данные свидетельствовали о запуске «вагусных» механизмов развития дыхательной недостаточности, которые опосредовали повышение легочной секреции и, как следствие, снижение вентиляции легких. Восстановление параметров ФВД (скоростных и объемных характеристик дыхания, а также коэффициента бронхоконстрикции Penh) до исходного уровня наблюдали через сутки после отравления.

Поступление токсиканта через желудок вызвало более позднее развитие аналогичных нарушений ФВД у крыс. Значимые изменения параметров отмечали, начиная с 30 мин после отравления. Длительность нарушений дыхательной функции при в/ж введении составляла 24 часа. Полученные результаты согласуются с данными Giyanwani PR, et al [7], в работе которых показано, что развитие поздней органофосфат-индуцированной дыхательной недостаточности связано с длительной чрезмерной стимуляцией нервно-мышечных синапсов, вызывающей слабость (в некоторых случаях, некроз) дыхательной мускулатуры.

Результаты проведенного исследования могут быть использованы при разработке новых схем купирования дыхательной недостаточности, вызванной острыми отравлениями фосфорорганическими соединениями на предприятиях, а также при составлении соответствующих рекомендаций по предотвращению аварий и несчастных случаев на производствах.

intoxication in zebrafish larvae causes behavioral defects, neuronal hyperexcitation and neuronal death. *Sci Rep.* 2020 Nov 5; 10 (1). DOI: 10.1038/s41598-020-76056-8.

3. Gorecki L, Korabecny J, Musilek K, et al. SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides. *Archives and Toxicology.* 2016; 90 (12): 2831–59. DOI: 10.1007/s00204-016-1827-3.

4. Mew EJ, Padmanathan P, Konradsen F, et al. The global burden of fatal self-poisoning with pesticides 2006–15: systematic review. *J Affect Disord.* 2017 Sep; 219: 93–104. DOI: 10.1016/j.jad.2017.05.002.

5. Putra M, Gage M, Sharma S, et al. Diapocynin, an NADPH oxidase inhibitor, counteracts diisopropylfluorophosphate-induced long-term neurotoxicity in the rat model. *Ann N Y Acad Sci.* 2020. Nov; 1479 (1): 75–93. DOI: 10.1111/nvas.14314.

6. Mc Garry KG, Schill KE, Winters TP, et al. Characterization of Cholinesterases from Multiple Large Animal Species for Medical Countermeasure development

against Chemical Warfare Nerve Agents. *Toxicological Sciences.* 2019; 174 (1): 124–32. DOI: 10.1093/toxsci/kfz250.

7. Giyanwani PR, Zubair U, Salam O, et al. Respiratory Failure Following Organophosphate Poisoning: A literature Review. *Cureus.* 2017 Sep 3; 9(9): e1651. DOI: 10.7759/cureus.1651.

8. Vengerovich NG, Drachkova IM, Yudin MA, et al. Experimental Substantiation of Inhalation Administration of Pathogenic Therapy of Toxic Convulsive Disorder for Correction of External Respiration Disorders. *Bull Exp Biol Med.* 2018. 165(2): 225–9. DOI: 10.1007/s10517-018-4135-5.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Анастасия Альбертовна Кряжевских, лаборант-исследователь научно-исследовательского отдела Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; магистрант Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Алексей Александрович Кряжевских, лаборант-исследователь научно-исследовательского отдела Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; магистрант Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Светлана Николаевна Субботина, канд. биол. наук, старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела Государственного научно-исследовательского испытательного института военной медицины Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия e-mail: gniiivm_15@mil.ru

Наталья Анатольевна Склярва, канд. техн. наук, доцент кафедры промышленной экологии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: natalia.sklyarova@pharminnotech.com

ADDITIONAL INFORMATION ABOUT AUTHORS

Anastasiya A. Kryazhevskikh, Research Assistant at the Research Department, State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia; Master Student, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia; email: gniiivm_15@mil.ru

Aleksey A. Kryazhevskikh, Research Assistant at the Research Department, State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia; Master Student, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia; email: gniiivm_15@mil.ru

Svetlana N. Subbotina, Ph. D. In Biology, Senior Researcher at the Research Department State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia; email: gniiivm_15@mil.ru

Nataliya A. Sklyarova, Ph. D. in Engineering Sciences, Associate Professor at the Industrial Ecology Department, Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia; email: natalia.sklyarova@pharminnotech.com

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Effect of organophosphorus compounds on the external respiratory function in rats during intratracheal and intraperitoneal administration

©2021. A.A. Kryazhevskikh^{1,2*}, A.A. Kryazhevskikh^{1,2}, S.N. Subbotina¹, N.A. Sklyarova²

¹ State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia

* e-mail: gniivm_15@mil.ru

Received June 23, 2021;

Revised June 28, 2021;

Accepted June 30, 2021

Due to the increasing influence of chemical factors on the human body, the experiment has been conducted using organophosphorus compounds (OPC) to stimulate poisoning cases in the production facilities. Given that the development of respiratory failure is a specific organophosphate poisoning symptom, a comparative analysis of external respiratory function (ERF) in rats with intratracheal and intraperitoneal administration of diisopropyl fluorophosphates (DFP) has been carried out. During the research, the average lethal doses of the toxic chemicals have been established, the conditions of DFP intoxication have been modeled. Thus, LD_{50} was 0.284 mg/kg by intratracheal administration, 1.6 mg/kg – by intraperitoneal administration. Experimental data have shown that the intratracheal intake of OPC causes the development of respiratory failure in the first minutes after poisoning. The return of the ERF indicators to the background values was noted a day after poisoning. With the intraperitoneal administration of the toxic chemical, the rate of development of ERF disorders was lower, toxic effects persisted for two days. The data obtained can be used to make appropriate recommendations for the prevention of accidents and non-emergency cases in a production facility.

KEYWORDS: organophosphorus poisoning; diisopropyl fluorophosphate; external respiration; respiratory failure; bronchospasm; enterprise risks; intratracheal administration; intraperitoneal administration