

УДК 615.099.08:616.85(045)

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ АТРОПИНА НА ЭСТЕРАЗНЫЙ СТАТУС КРОВИ КРЫС ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПУТЯХ ПОСТУПЛЕНИЯ МАЛАТИОНА В ОРГАНИЗМ

М.А. Юдин¹, В.Н. Быков¹,
А.М. Колесников¹, А.М. Сарана²,
И.В. Юдников¹

¹Научно-исследовательский испытательный институт (военной медицины) Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

²СПб ГБУЗ «Городская больница № 40», 197706, г. Сестрорецк, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Проведена оценка лечебного действия атропина (0,4, 2 и 20 мг/кг) на моделях внутримышечного и внутрижелудочного отравления крыс малатионом в дозе 1 ЛД₅₀. Показано, что препарат предупреждал гибель животных после внутримышечного введения токсиканта, способствовал уменьшению выраженности холинопозитивной симптоматики и восстановлению активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) крови крыс до 80% через 8 ч после терапии. Через 24 ч после введения малатиона показатель достигал значений интактной группы.

На модели внутрижелудочного отравления малатионом препарат не оказывал защитного действия независимо от его дозы. У животных, которым вводили атропин (2 мг/кг) через 1 ч после отравления, активность фермента в крови составляла 40 % при 80 % в контрольной группе. Полученные данные целесообразно учитывать при поиске и отборе эффективных средств неотложной терапии отравлений ФОС.

Ключевые слова: малатион, атропин, защитная эффективность, угнетение холинэстеразы.

Введение. До настоящего времени фосфорорганические инсектициды (ФОИ) остаются наиболее востребованными средствами при проведении мероприятий дератизации и дезинсекции [6]. Широкое распространение ФОИ получили в сельском хозяйстве стран Средней и Юго-Восточной Азии [7].

В ряду отравлений ФОИ, трудно поддающихся лечению, особое место занимают интоксикации малатионом (карбофосом), относящимся к эфирам дитиофосфорной кислоты [10]. Промышленный образец малатиона обычно содержит до 5 % различных кислородных аналогов и других примесей, повышающих общую токсичность вещества. В организме в результате окислительной десульфурации образуются более ак-

тивные и токсичные метаболиты малатиона. В связи с этим большую опасность представляет пероральный путь поступления малатиона, когда яд быстро проникает в печень и подвергается метаболизму.

В отношении малатиона остро стоит проблема реактивации угнетенной холинэстеразы (ХЭ). Кроме того, малатион обладает неантхолинэстеразным действием, что в значительной степени осложняет течение интоксикации и определяет необходимость назначения дополнительных средств патогенетической терапии.

До настоящего времени порядок и схема применения атропина в остром периоде после пероральных отравлений малатионом подвергаются дискуссии [1]. Практически не изучена взаимо-

Юдин Михаил Анатольевич (Yudin Mikhail Anatol'evich), кандидат медицинских наук, доцент, заместитель начальника отдела НИИИ (ВМ) ВМедА им. С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, mihei_bridge@mail.ru

Быков Владимир Николаевич (Bykov Vladimir Nikolaevich), доктор медицинских наук, профессор, начальник НИИЦ (МБЗ) НИИИ (ВМ) ВМедА им. С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, bykov_imtm@mail.ru

Колесников Александр Маратович (Kolesnikov Alexandr Maratovich), лаборант-исследователь НИИИ (ВМ) ВМедА им. С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация, Alex9_6_89@mail.ru

Сарана Андрей Михайлович (Sarana Andrey Mikhailovich), кандидат медицинских наук, доцент, заместитель главного врача по реабилитации СПб ГБУЗ «Городская больница № 40», главный специалист по медицинской реабилитации и санитарно-курортному делу Комитета по Здравоохранению правительства г. Санкт-Петербурга, 197706, г. Сестрорецк, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Юдников Илья Владимирович (Yudnikov Ilya Vladimirovich), научный сотрудник НИИИ (ВМ) ВМедА им. С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

связь лечебной эффективности атропина при различных путях поступления малатиона и динамики эстеразного статуса крови.

Цель настоящего исследования состояла в экспериментальном изучении зависимости лечебного эффекта атропина и динамики эстеразного статуса крови после внутривентрикулярного и внутримышечного введения малатиона.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на 280 нелинейных крысах-самцах (180-200 г), которых содержали в условиях вивария. Все крысы проходили карантин (2 нед.), пребывали на обычном пищевом рационе со свободным доступом к воде.

Эксперименты проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (Приказ Минздравсоцразвития от 23.08.2010 N 708н).

Интоксикацию малатионом моделировали путём однократного внутримышечного (в/м) и внутривентрикулярного (в/ж) введения яда животным в дозе 1 ЛД₅₀ (400 мг/кг). Атропин вводили крысам однократно внутримышечно при возникновении первых признаков интоксикации. На первом этапе изучали эффективность атропина при введении в диапазоне доз (0,4; 2 и 20 мг/кг), выбранных с использованием метода межвидового переноса доз согласно «Руководства...» [2]. При экстраполяции на человека исследованные дозы атропина соответствовали 2 мг/чел (разовая доза для лечения легких форм отравлений ФОС), 10 мг/чел (курсовая доза для лечения тяжелых форм отравлений ФОС) и 100 мг/чел (суточная доза лечения тяжелых форм отравлений ФОС – 100 ампул),

соответственно. Увеличение дозы атропина до 40-60 мг/кг было нецелесообразно в связи с высокими рисками возникновения нежелательных реакций, учитывая, что ЛД₅₀ препарата для крыс составляет 215±37 мг/кг. Крысам контрольной группы вводили внутримышечно воду для инъекций. Выраженность интоксикации оценивали по времени развития и продолжительности судорог. Кроме того, регистрировали гибель животных и рассчитывали скорость её наступления для каждого животного по формуле: 1/время жизни (ч⁻¹). В динамике оценивали активность АХЭ крови крыс в острый (1-24 ч) и подострый (1-7 сут) периоды отравления. Выбор дозы атропина (2 мг/кг) определялся минимальной дозой препарата, на фоне применения которой достоверно возрастала выживаемость животных при отравлении малатионом в дозе 1 ЛД₅₀. Скорость гидролиза ацетилтихолин йодида определяли методом Элмана [4]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре «Hitachi U-2900» при длине волны 412 нм.

Статистическую обработку данных проводили с помощью t-критерия Стьюдента и теста Манна-Уитни. Расчет средних доз осуществляли методом пробит-анализа по Финни. Для оценки значимости межгрупповых альтернативных показателей использовали χ²-критерий Пирсона.

Результаты и обсуждение. Введение атропина способствовало снижению показателя гибели животных после в/м введения малатиона и не оказывало влияния на данный показатель после в/ж введения яда (табл. 1).

Таблица 1

Лечебная эффективность атропина при различных путях введения малатиона в дозе 1 ЛД₅₀ (X±mх, n=8)

Путь введения яда	Группа / препарат, доза	Доля животных с судорогами, %	Доля погибших животных, %	Скорость гибели, ч ⁻¹
Внутримышечно	Контроль (дист. вода)	62±18,3 (5/8)	50±18,9 (4/8)	0,3±0,06
	Атропин 0,4 мг/кг	50±18,9 (4/8)	0 (0/8)	-
	Атропин 2 мг/кг	25±16,3* (2/8)	0 (0/8)	-
	Атропин 20 мг/кг	25±16,3*(2/8)	0 (0/8)	-
Внутривентрикулярно	Контроль (дист. вода)	100 (8/8)	50±18,9 (4/8)	0,1±0,02
	Атропин 0,4 мг/кг	100 (8/8)	50±18,9 (4/8)	1,9±1,91
	Атропин 2 мг/кг	75±16,3 (6/8)	50±18,9 (4/8)	0,3±0,25
	Атропин 20 мг/кг	75±16,3 (6/8)	25±16,3* (2/8)	0,01±0,01

Примечание: в/ж отравление ЛД₅₀ = 387 мг/кг, ЛД₁₆ = 259 мг/кг, ЛД₉₉ = 675 мг/кг, в/м отравление ЛД₅₀ = 350 мг/кг, ЛД₁₆ = 265 мг/кг, ЛД₉₉ = 484 мг/кг, * - различия с группой контроля достоверны при p<0,05.

Несмотря на купирование судорожного синдрома у некоторых животных, количество выживших особей не увеличивалось. Для животных, которым вводили атропин в дозах 0,4 и 2 мг/кг, была характерна более высокая скорость гибели по сравнению с контролем. Напротив, использование М-холиноблокатора в максимальной дозе (20 мг/кг) увеличивало продолжительность жизни отравленных животных.

На модели внутримышечной интоксикации малатионом отмечали защитное действие атропина независимо от его дозы. Введение препарата во всем диапазоне доз (0,4-20 мг/кг) способствовало выживаемости всех экспериментальных животных. При введении холинолитика в дозах 2 и 20 мг/кг достоверно снижалось количество животных с судорогами. Полученные данные позволили считать дозу препарата 2 мг/кг минимальной дозой, обеспечивающей защитный эффект, пригодной для сравнительного анализа эффективности при различных путях поступления яда. В ходе экспериментов изучена динамика изменения активности АХЭ крови крыс через 1-24 ч, 3 и 7 сут после внутрижелудочного и внутримышечного отравления животных малатионом (контроль), а также при лечении их атропином в дозе 2 мг/кг (рис. 1).

Через 1 ч после внутрижелудочного введения малатиона крысам активность АХЭ крови со-

ставляла 80 ± 10 % (рис. 1). Через 2 ч активность фермента значительно уменьшалась до 50 ± 10 % и сохранялась в этом диапазоне в течение 1 суток. Через 1 ч после терапии атропином активность фермента в крови была более чем в 2 раза ниже аналогичного показателя в контрольной группе и составила 45 ± 2 % относительно значений интактной группы. В дальнейшем, динамика показателя в экспериментальной группе была сопоставима с контрольной группой.

При исследовании динамики активности ХЭ в подостром периоде интоксикации (1-7 сут) после внутрижелудочного введения малатиона отмечали восстановление активности ХЭ. Регистрировали транзиторный рост соответствующего показателя в группе контроля (7 сут) и в группе терапии атропином (3 сут) (рис. 1). В среднем, рост активности АХЭ относительно значений интактных крыс составил около 20 %.

Различие по времени восстановления активности АХЭ между экспериментальной и контрольной группой свидетельствует о негативном влиянии атропина на протекание интоксикации после внутрижелудочного поступления малатиона в организм.

При исследовании активности АХЭ крови у крыс после внутримышечного введения малатиона в дозе 1 LD_{50} и терапии атропином существенных различий в постинтоксикационном периоде активности фермента (50-57 %) между

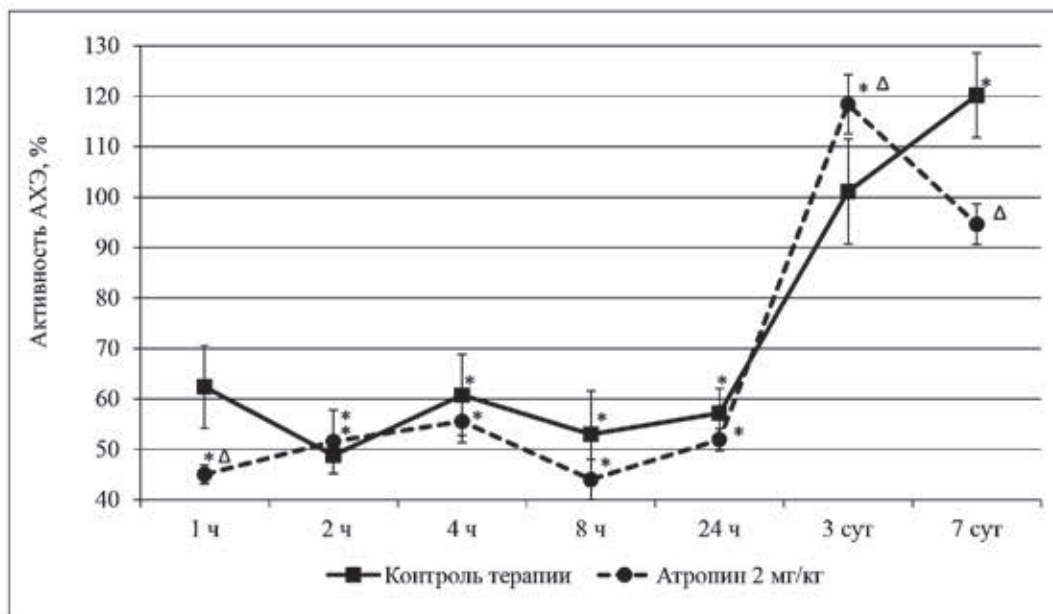


Рис. 1 – Влияние терапии атропином (2 мг/кг) на активность АХЭ крови после внутрижелудочного отравления крыс малатионом в дозе 1 LD_{50} ($\bar{X} \pm m_x$, $n=6$).

Примечание: темным участком выделен диапазон колебаний показателя интактных животных - 100 ± 6 %; * - отличия от показателей интактной группы достоверны при $p < 0,05$; Δ - отличия от показателей контрольной группы достоверны при $p < 0,05$

экспериментальной и контрольной группами в первые 1-8 ч не выявлено (рис 2). Через 1 сутки после отравления отмечали значительный подъем активности АХЭ в крови животных обеих групп. При этом у крыс на фоне введения атропина активность АХЭ крови была значительно больше (80 ± 5 %), чем у животных контрольной группы (67 ± 8 %).

Через 3 сут после начала эксперимента активность фермента у животных, которым вводили атропин, восстанавливалась до уровня значений интактной группы (100 ± 9 %), в то время как у крыс контрольной группы показатель составлял 60 ± 4 % (рис. 2). Восстановление активности АХЭ у нелеченых животных наблюдали через 7 суток.

Заключение. Применение атропина на фоне экспериментального внутрижелудочного отравления крыс малатионом не оказывает выраженного влияния на течение интоксикации и показатель гибели животных. В то же время введение холинолитика после внутримышечного отравления малатионом сопровождалось действием дозозависимого лечебного эффекта.

На модели внутрижелудочного отравления крыс малатионом через 1 ч после введения атропина (2 мг/кг) отмечено более выраженное снижение активности АХЭ крови животных (45 ± 2 %) по сравнению с контрольной группой (62 ± 8 %). Полученные данные коррелируют с

результатами других авторов, которые свидетельствуют о снижении частоты благоприятных исходов пероральных интоксикаций этим ФОИ, если на догоспитальном этапе пациенту вводили атропин до промывания желудка [1, 3].

Механизм негативного действия атропина связан с тем, что препарат оказывает спазмолитическое действие в отношении привратника желудка, при этом ускоряется эвакуация химуса в двенадцатиперстную кишку и последующая адсорбция яда в желудочно-кишечном тракте. Вместе с тем, по полученным данным атропин обеспечивает более раннее восстановление активности АХЭ крови (3 сут) против 7 сут в контроле.

Активность АХЭ крови крыс через 1-8 ч после внутримышечного отравления малатионом снижалась до 50-57 % как в контрольной группе, так и на фоне введения атропина. Через 24 ч после начала наблюдения активность фермента в группе животных, которым вводили атропин (2 мг/кг), восстанавливалась до 80 ± 5 %, в то время как активность АХЭ в крови крыс контрольной группы составляла 66 ± 8 %. В основе различий эстеразного статуса на фоне введения атропина могут лежать механизмы ресинтеза молекул фермента [3]

Различная динамика восстановления АХЭ крови животных в зависимости от пути поступления яда и назначения атропина свидетель-

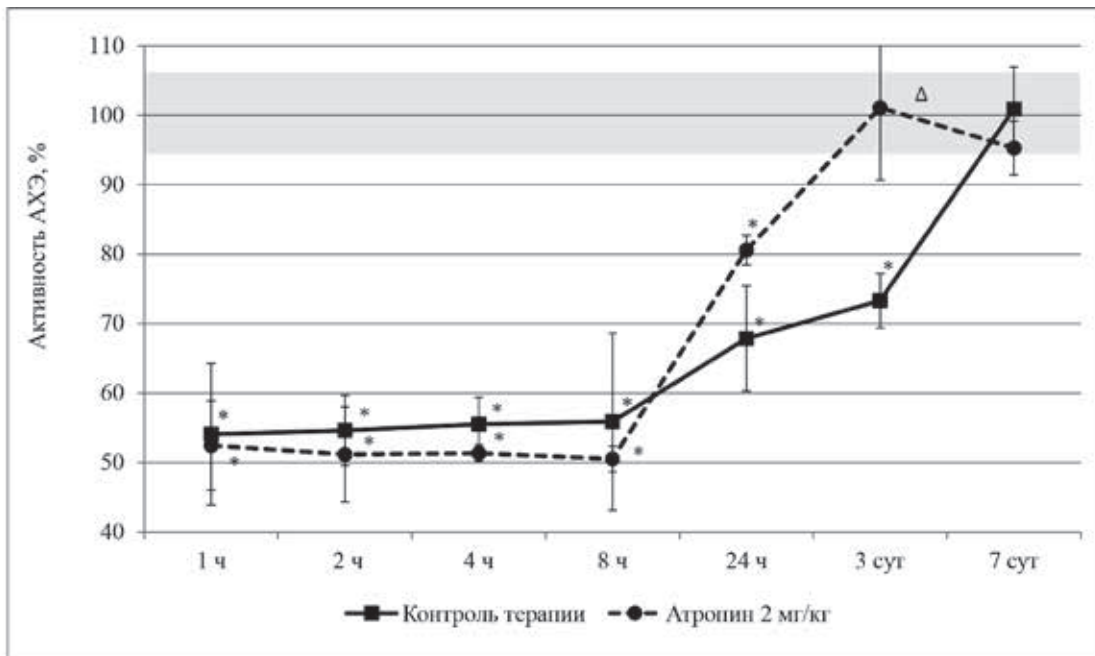


Рис.2 – Влияние терапии атропином (2 мг/кг) на активность АХЭ крови после внутримышечного отравления крыс малатионом в дозе 1 ЛД₅₀ ($X \pm m$, $n=6$).

Примечание: темным участком выделен диапазон колебаний показателя интактных животных - 100 ± 6 %; * - отличия от показателей интактной группы достоверны при $p < 0,05$; Δ - отличия от показателей контрольной группы достоверны при $p < 0,05$.

ствуется о необходимости продолжения исследований по установлению особенностей течения отравлений малатионом. Очевидно, что при применении атропина для оказания неотложной медицинской помощи отравленным ФОС следует учитывать путь поступления яда. Получен-

ные данные необходимо учитывать при поиске и отборе эффективных средств неотложной терапии отравлений фосфорорганическими соединениями, включая в план экспериментов модели с различными путями поступления токсиканта в организм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бидерман Ф.М. Интенсивная терапия при острых тяжелых отравлениях карбофосом на догоспитальном этапе: дисс. ... д-ра мед. наук / Ф.М. Бидерман, СПб 1991. ЛГИУВ имени С.М. Кирова. - 286 с.
2. Миронов А.Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, часть первая. М., 2012.
3. Сосюкин А.Е. Детоксикационная терапия при острых отравлениях фосфорорганическими соединениями: дисс. ... д-ра мед. наук / А.Е. Сосюкин, СПб, 1992 ВМедА, 333 с.

4. Ellman G.L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterases activity / G.L.Ellman, K.D.Courtney, V.Andres [et al.] // Biochem. pharmacol.-1961.-Vol. 7.-P.88-95.
5. Gupta C. Handbook of toxicology of chemical warfare agents / C. Gupta // Elsevier London. - 2009.
6. Isenring R. Pesticides reduce biodiversity / R. Isenring // Pesticides news - 2010. - No 88
7. Jokanovic M. Organophosphate Induced Delayed Polyneuropathy / M. Jokanovic, P. V. Stukalov, M. Kosanovic

// Toxicol Lett, N 190 (2) (2009).
8. Kuka K. Pralidoxime - the gold standard of acetylcholinesterase reactivators - reactivation in vitro efficacy / K. Kuka, M. Hrabanova, O. Soukup [et al.], Bratisl. Lek. Listy, Vol. 111, N. 9, P 502 - 504 (2010).
9. Milatovic D. Carbofuran-induced oxidative stress in slow and fast skeletal muscles: prevention by memantine and atropine / D. Milatovic, R.C. Gupta, A. Dekundy, [et al.] // Toxicology. 2005. Vol 208, №1. - P 13-24.
10. Musilova L. In vitro oxime-assisted reactivation of paraoxon-inhibited

human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase / L. Musilova, K. Kuca, Y. Jung [et al.], Clin. Toxicol. (Phila), Vol. 47, P. 545 - 550 (2009).
11. Vitorović-Todorović M.D. Structural modifications of 4-aryl-4-oxo-2-aminybutanamides and their acetyl- an dbutyrylcholinesterase inhibitory activity. Investigation of AChE-ligand interactions by docking calculations and molecular dynamics simulations / M.D. Vitorović-Todorović, C. Koukoulitsa, I.O. Juranić [et al.] // Eur J Med Chem. 2014 May 4;81C:158-175.

REFERENCES:

1. Biderman F. M. Intensive therapy under acute malathion poisonings at a preclinical stage: Doctoral dissertation thesis / F. M. Biderman, SPb 1991 LGIUV named by S. M. Kirov - 286 p. (in Russian)
2. Mironov A. N. Manual for preclinical research studies of medicinal preparations. Part I. M., 2012 (in Russian)
3. Sosyukin A. E. Detoxification therapy of acute organophosphorous compound poisonings. Doctoral dissertation thesis / A. E. Sosyukin SPb 1992 Kirov Military Medical Academy - 333 p.(in Russian)
4. Ellman G.L. A new and rapid colorimetric

determination of acetylcholinesterases activity / G.L.Ellman, K.D.Courtney, V.Andres [et al.] // Biochem. pharmacol.- 1961.-Vol. 7.-P.88-95.
5. Gupta C. Handbook of toxicology of chemical warfare agents / C. Gupta // Elsevier London. - 2009.
6. Isenring R. Pesticides reduce biodiversity / R. Isenring // Pesticides news - 2010. - No 88
7. Jokanovic M. Organophosphate Induced Delayed Polyneuropathy / M. Jokanovic, P. V. Stukalov, M. Kosanovic // Toxicol Lett, N 190 (2) (2009).

8. Kuka K. Pralidoxime - the gold standard of acetylcholinesterase reactivators - reactivation in vitro efficacy / K. Kuka, M. Hrabanova, O. Soukup [et al.], Bratisl. Lek. Listy, Vol. 111, N. 9, P 502 - 504 (2010).
9. Milatovic D. Carbofuran-induced oxidative stress in slow and fast skeletal muscles: prevention by memantine and atropine / D. Milatovic, R.C. Gupta, A. Dekundy, [et al.] // Toxicology. 2005. Vol 208, №1. - P 13-24.
10. Musilova L. In vitro oxime-assisted reactivation of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase and

butyrylcholinesterase / L. Musilova, K. Kuca, Y. Jung [et al.], Clin. Toxicol. (Phila), Vol. 47, P. 545 - 550 (2009).
11. Vitorović-Todorović M.D. Structural modifications of 4-aryl-4-oxo-2-aminybutanamides and their acetyl- an dbutyrylcholinesterase inhibitory activity. Investigation of AChE-ligand interactions by docking calculations and molecular dynamics simulations / M.D. Vitorović-Todorović, C. Koukoulitsa, I.O. Juranić [et al.] // Eur J Med Chem. 2014 May 4;81C:158-175.

M.A. Yudin¹, V.N. Bykov¹, A.M. Kolesnikov¹, A.M. Sarana², I. S. Yudnikov¹

THE STUDY OF ATROPINE EFFECT ON THE BLOOD ESTERASE STATUS IN RATS AT DIFFERENT WAYS OF UPTAKE OF MALATHION BY THE ORGANISM

¹ Scientific Research Test Institute of Military Medicine, S.M. Kirov Medical Military Academy, Ministry of Defense, 195043, Saint-Petersburg, Russian Federation

²City Hospital № 40, 197706, Sestroretsk, Saint-Petersburg, Russian Federation

The therapeutic action of atropine (0.4, 2, 20 mg/kg) was assessed on models of rats intramuscular and intragastric poisoning with malathion in a dose of 1 LD50. It was demonstrated that the drug prevented animals death after the intramuscular administration of malathion and promoted the reduction of intensity of a cholinopositive symptomatology. It also promoted the recovery of the acetyl cholinesterase activity in rats blood up to 80% 8 hours after the therapy, and 24 hours after the injection of malathion, this index reached levels in the control group.

The preparation had no protective effect on the modelled intragastric poisoning by malathion independently of its dose. In animals to which atropine (2mg/kg) was administrated an hour after intoxication, the enzyme activity in blood was 40% while in the control group it was 80%. It is practicable to take these findings into consideration while searching and selecting efficient medications for emergency treatment of organophosphorous intoxications.

Keywords: malathion, atropine, protective efficiency, cholinesterase depression.

Материал поступил в редакцию 20.01.2015 г.