

УДК 615.099.07, 612.174

## КРЫСА (*Rattus norvegicus*) КАК ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ В МОДЕЛИ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ. 3. КАРДИОРЕСПИРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ

© 2019 г. С. В. Кузнецов<sup>1</sup>, Н. В. Гончаров<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России, Ленинградская обл., г.п. Кузмоловский, Россия

\*e-mail: ngoncharov@gmail.com

Поступила в редакцию 15.06.2018 г.

После доработки 21.11.2018 г.

Принята к публикации 04.02.2019 г.

DOI: 10.1134/S0044452919030100

Острое отравление фосфорорганическими соединениями (ФОС) приводит к холинергическому кризу и развитию отставленной патологии, включающей в себя повреждение ЦНС, почек и эндотелия сосудов [1–3]. Влияние острого отравления на кардиореспираторные показатели изучено недостаточно. Имеются сведения об отсутствии повреждения сердечной мышцы при остром отравлении ФОС [4], а обнаруженные изменения давления и частоты сердечных сокращений (ЧСС) объясняют неспецифическим действием ФОС, не связанным с ингибированием ацетилхолинэстеразы (АХЭ) [5]. В этих и других экспериментах, проведенных на крысах, не учитывается возможная роль карбоксилэстеразы (КЭ) плазмы крови крысы в развитии патологии. В отличие от грызунов и зайцеобразных, в плазме крови человека, обезьян и полорогих парнокопытных нет КЭ. Подавление активности КЭ плазмы крови грызунов может в значительной степени повысить адекватность экспериментальных моделей при изучении механизма действия и разработки новых антидотов против таких высокотоксичных ФОС, как зоман, зарин, табун, параоксон. Нами разработана токсикологическая модель с применением ингибитора карбоксилэстеразы СВDP [6].

Целью настоящего исследования является исследование динамики кардиореспираторных показателей крыс на протяжении 12 нед после острого отравления параоксоном (РОХ) на фоне предварительного ингибирования КЭ либо самим параоксоном, либо ингибитором карбоксилэстеразы СВDP.

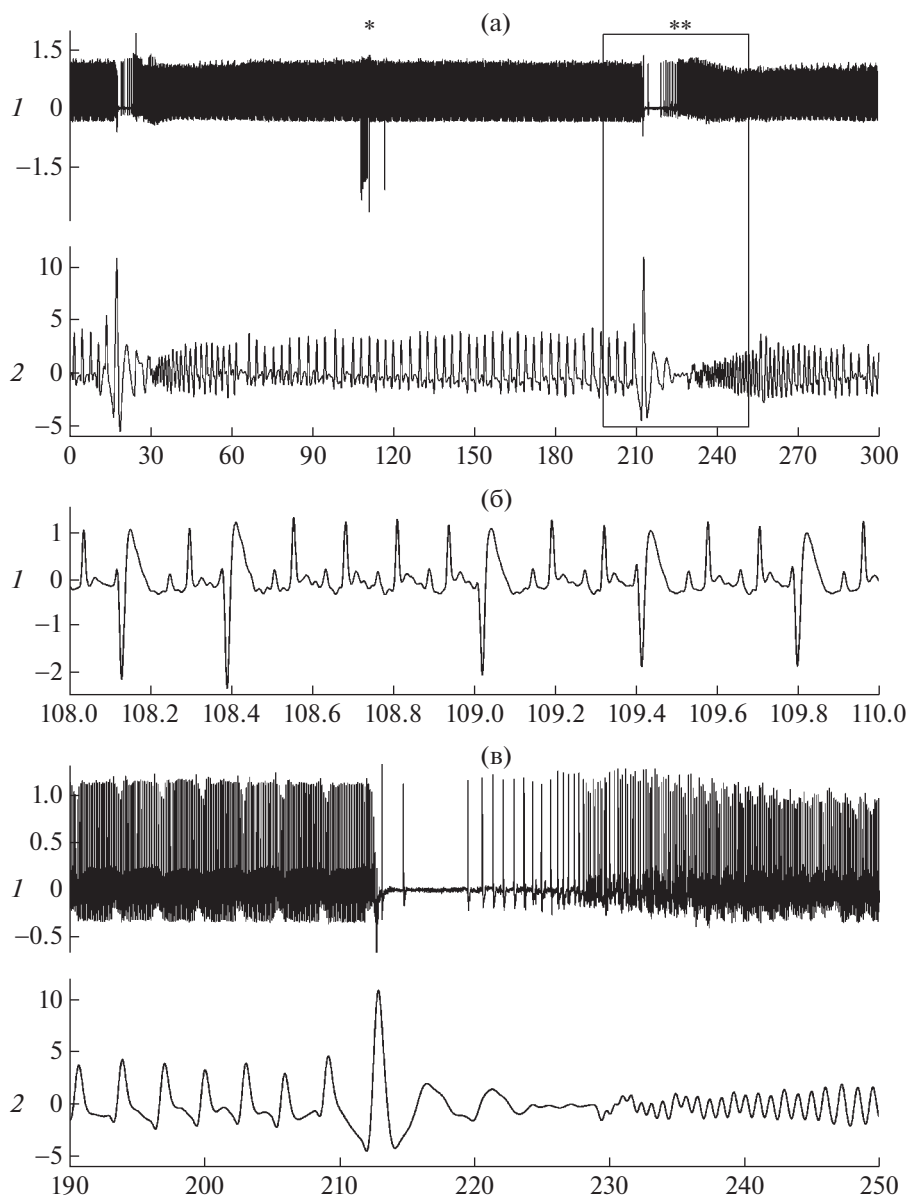
Токсикологические и электрофизиологические исследования проводили на крысах-самцах *Rattus norvegicus* аутбредной линии Вистар массой 200–240 г в соответствии с правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского национального комитета по биологической этике. Токсикологическая модель подробно описана в

первой публикации по результатам серии исследований [6].

В работе использовали следующие реактивы: параоксон, РОХ (О,О-диэтил О-*n*-нитрофенилфосфат, Sigma); СВDP (2-(*o*-крезил)-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-2-оксид, синтезирован в НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России); диметилсульфоксид (ДМСО) и пропиленгликоль (“Вектон”, Россия), гамма-аминомасляная кислота, ГОМК (ХФК “АКРИХИН”, Россия).

Эксперимент включал измерения показателей контроля и двух групп сравнения: РОХ2х (крысам введен параоксон в дозе 0.6 ЛД<sub>50</sub> через час после введения параоксона в дозе 0.45 ЛД<sub>50</sub>) и СВРОХ (крысам введен параоксон в дозе 0.6 ЛД<sub>50</sub> через час после введения СВDP в дозе 3.3 мг/кг).

Обследование проводили через 1-е, 3-е сут и через 1, 2, 4, 6, 12 нед после острого отравления. В каждой экспериментальной группе для каждой временной точки исследования было по 6–11 животных. Для исключения возникновения двигательных артефактов при проведении исследования животных наркотизировали натриевой солью ГОМК в дозе 100 мг/кг внутривенно. Крыс фиксировали в специальном станке с фиксацией головы и туловища животного, оставляя конечности в свободном состоянии. Регистрацию физиологических показателей начинали через 10 мин после помещения крыс в камеру и их адаптации к окружающей среде. Исследовали ЭКГ (II стандартное отведение) и параметры внешнего дыхания (датчик VP-102, RTF, Германия). Все полученные сигналы вводили в компьютер с использованием АЦП E14-440, фирма L-card (программа “Power-Graph 3.3.9”). Период дискретизации АЦП составлял 1 мс, эпоха анализа – 15 мин. Анализ регистри-



**Рис. 1.** Регистрация ЭКГ (1) и внешнего дыхания (2) у крысы из группы РОХ2х через 12 нед после инъекции параоксона (а). Фрагмент записи  $a$ ,  $I^*$  (б), демонстрирующий возникновение множественных желудочковых экстрасистол и фрагмент записи  $a^{**}$ , демонстрирующий возникновение периодов асистолии и апноэ (в). По оси абсцисс – время (с), по оси ординат: 1 – амплитуда ЭКГ (мВ); 2 – амплитуда пьезограммы экскурсий грудной клетки (В).

руемых сигналов проводили в программах “PowerGraph 3.3.9” и “Origin 9.0”. Спектральный анализ ЭКГ осуществляли по алгоритму быстрого преобразования Фурье с использованием окна Уолша (Welch). Сердечную деятельность оценивали по двум параметрам – средней частоте сердечных сокращений (ЧСС) и показателям вариабельности сердечного ритма (ВСР). Анализ ВСР осуществляли, исходя из разделения спектра периодограмм на следующие диапазоны: VLF – 0.03–0.3 Гц; LF – 0.3–0.8 Гц; HF – 0.8–2.5 Гц. Статистическую обработку данных осуществляли стандартными метода-

ми в программе Origin 9.0. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка.

Проведенный анализ показателей внешнего дыхания и ЭКГ не выявил значимых отклонений частоты дыхания (ЧДД) и сердцебиений от физиологической нормы. Тем не менее при отравлении параоксоном наиболее чувствительной к воздействию оказалась дыхательная система. В серии РОХ2х практически на всех сроках проведения анализа после отравления количество нарушений дыхания в 1.5–4 раза больше, чем в серии СВРОХ. Максимальная выраженность нарушений дыхания

**Таблица 1.** Изменения частоты дыхания, частоты сердечных сокращений и показателей вариабельности сердечного ритма у крыс

Показатели	Срок исследования после инъекции							
	контроль (общий)	1 сут	3 сут	1 нед	2 нед	4 нед	6 нед	12 нед
<b>группа РОХ2х</b>								
VLF, %	11.6 ± 1.0	12.6 ± 4.1	10.5 ± 2.2	9.8 ± 1.3	14.0 ± 2.3	8.6 ± 1.7	13.8 ± 1.3	15.7 ± 1.7
LF, %	32.9 ± 1.8	35.3 ± 3.5	31.6 ± 3.5	22.3 ± 3.2*	35.9 ± 2.5	34.3 ± 2.1	27.5 ± 3.2	44.8 ± 2.7
HF, %	55.5 ± 1.8	52.1 ± 5.7	57.9 ± 5.2	67.9 ± 3.4**	50.1 ± 2.8	57.1 ± 2.4	58.7 ± 3.0	39.5 ± 3.1**
LF/HF, у.е.	0.642 ± 0.048	0.756 ± 0.184	0.598 ± 0.121	0.351 ± 0.068*	0.754 ± 0.080	0.612 ± 0.060	0.507 ± 0.079	1.202 ± 0.182***
HF/To, у.е.	0.555 ± 0.018	0.520 ± 0.057	0.579 ± 0.052	0.679 ± 0.034**	0.501 ± 0.028	0.571 ± 0.024	0.587 ± 0.030	0.395 ± 0.031***
ЧСС, в мин	457.8 ± 7.6	436.0 ± 10.0	480.8 ± 1.5	494.3 ± 13.8	478.7 ± 21.1	458.3 ± 12.6	455.5 ± 21.9	471.2 ± 14.3
ЧДД, в мин	44.5 ± 2.0	43.0 ± 3.6	37.0 ± 1.8	47.3 ± 3.7	40.2 ± 1.9	38.0 ± 1.8	46.5 ± 2.9	32.7 ± 2.5*
<b>группа СВРОХ</b>								
VLF, %	11.6 ± 1.0	11.7 ± 2.5	8.6 ± 2.1	16.4 ± 3.2	11.3 ± 2.9	12.3 ± 2.3	17.6 ± 2.8*	11.5 ± 2.4
LF, %	32.9 ± 1.8	32.5 ± 2.7	28.3 ± 6.5	22.1 ± 3.2*	32.1 ± 4.4	30.9 ± 3.2	29.3 ± 4.4	38.8 ± 5.1
HF, %	55.5 ± 1.8	55.8 ± 4.5	63.1 ± 5.9	61.5 ± 6.1	56.6 ± 5.0	56.8 ± 4.6	53.1 ± 4.9	49.7 ± 4.1
LF/HF, у.е.	0.642 ± 0.048	0.628 ± 0.117	0.485 ± 0.138	0.417 ± 0.099	0.645 ± 0.116	0.602 ± 0.105	0.632 ± 0.143	0.839 ± 0.156
HF/To, у.е.	0.555 ± 0.018	0.558 ± 0.045	0.631 ± 0.059	0.615 ± 0.061	0.566 ± 0.050	0.568 ± 0.046	0.531 ± 0.049	0.498 ± 0.041
ЧСС, в мин	457.8 ± 7.6	493.8 ± 15.3	473.5 ± 12.2	464.1 ± 23.1	470.1 ± 21.1	488.8 ± 13.7	458.5 ± 26.7	479.8 ± 21.5
ЧДД, в мин	44.5 ± 2.0	38.8 ± 2.1	41.8 ± 5.1	49.6 ± 2.3	42.7 ± 2.2	42.1 ± 3.1	38.1 ± 4.4	34.3 ± 2.9

Примечание. Значения показателей VLF, LF, HF даны в % от общей мощности спектра (To) данного периода обследования. Показатели LF/HF и HF/To даны в условных единицах.

Звездочками отмечена достоверность различий между контрольной и экспериментальными группами: \* –  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$ .

у крыс обеих групп отмечена на 4-й неделе обследования (у 71% крыс из группы РОХ2х и у 50% – из группы СВРОХ). У части крыс отмечены случаи нарушения ритма дыхания, замедление фазы вдоха в периоды снижения частоты дыхания. Клинический анализ ЭКГ выявил в разных экспериментальных группах крыс наличие однотипных отклонений, заключающихся в существенном увеличении амплитуды зубцов Р и Т, а также в наличии глубокого зубца S. Количество нарушений показателей ЭКГ в группе РОХ2х больше на ранних сроках – на 1-е и 3-и сут, а в более поздние сроки их количество в 1.5–5 раз выше в серии СВРОХ. Полученные данные свидетельствуют о том, что отклонения от нормальных показателей ЭКГ в группе СВРОХ наступают через 2–12 нед после отравления. Максимальное количество животных (88%), имеющих признаки нарушений ЭКГ, зафиксировано на 6-й неделе. В то же время увеличенные амплитуды зубцов Р, Т и S выявлены и у 30% контрольных животных, при этом ЧСС исследованных крыс не выходила за пределы физиологической нормы. Поскольку мы не имели возможности проводить индивидуальный мониторинг динамики изменения ЭКГ, нельзя исключить, что

выявленные отклонения обусловлены индивидуальными особенностями крыс. Начиная с четвертой недели после инъекции препаратов, у 10–15% крыс из групп РОХ2х и СВРОХ на ЭКГ наблюдается множественная экстрасистолия неясной этиологии или сочетанное нарушение сердечного и дыхательного ритмов (рис. 1).

Анализ вариабельности сердечного ритма не выявил принципиальных различий между крысами групп РОХ2х и СВРОХ. В обеих группах прослеживается сходная динамика изменений ваго-симпатического баланса. Начиная с 3-х сут после отравления, увеличивается доля HF-диапазона в общей мощности спектра (табл. 1). При этом снижается уровень симпатических влияний в механизмах регуляции сердечного ритма. Максимально выражена эта тенденция через неделю после введения препаратов. Через 2 нед происходит резкое усиление симпатических влияний за счет снижения парасимпатических. Через 3 мес после отравления устанавливается выраженное смещение ваго-симпатического баланса в сторону преобладания симпатических влияний. У животных группы РОХ2х в механизмах ВСР наблюдается тенденция к увеличению роли гуморально-метаболических

факторов. Отличительной особенностью крыс группы СВРОХ является временное усиление роли гуморально-метаболических факторов на 1-й и 6-й неделе, отсутствующее в серии РОХ2х с двукратным введением параоксона.

Полученные данные дополняют результаты биохимических и гистохимических исследований, свидетельствующих об адекватности токсикологической модели СВРОХ с предварительным подавлением активности карбоксилэстеразы плазмы крови крыс специфическим ингибитором СВDP для изучения отставленных последствий острой интоксикации крыс фосфорорганическими соединениями.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-15-00199).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов изучения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гончаров Н.В., Прокофьева Д.С., Войтенко Н.Г., Бабаков В.Н., Глашкина Л.М. Молекулярные механизмы холинергической регуляции и дисрегуляции. Токсикол. вестник. 2: 5–10. 2010. [Goncharov N.V., Prokofieva D.S., Boitenko N.G., Babakov V.N., Glashkina L.M. Molecular mechanism of cholinergic regulation and dysregulation. Toksikologicheskii vestnik. 2: 5–10. 2010. (In Russ).]

2. Goncharov N.V., Nadeev A.D., Jenkins R.O., Avdonin P.V. Markers and Biomarkers of Endothelium: When Something Is Rotten in the State. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 27 p. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9759735>
3. Sobolev V.E., Jenkins R.O., Goncharov N.V. Sulfated glycosaminoglycans in bladder tissue and urine of rats after acute exposure to paraoxon and cyclophosphamide. Exp. Toxicol. Pathol. 69 (6): 339–347. 2017.
4. Kose A., Gunay N., Yildirim C., Tarakcioglu M., Sari I., Demiryurek A.T. Cardiac damage in acute organophosphate poisoning in rats: effects of atropine and pralidoxime. Am. J. Emerg. Med. 27 (2): 169–175. 2009.
5. Watanabe Y., Itoh T., Shiraiishi H., Maeno Y., Arima Y., Torikoshi A., Namera A., Makita R., Yoshizumi M., Nagao M. Acute effects of a sarin-like organophosphorus agent, bis(isopropyl methyl)phosphonate, on cardiovascular parameters in anaesthetized, artificially ventilated rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 272 (1): 61–66. 2013.
6. Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Шмурак В.И., Беллинская Д.А., Авдонин П.В. Крыса (*Rattus norvegicus*) как объект исследования в модели острого отравления фосфорорганическими соединениями. 1. Биохимические аспекты. ЖЭБФ. 55 (2): 28–38. 2019. [Goncharov N.V., Terpilovskii M.A., Shmurak V.I., Belinskaya D.A., Avdonin P.V. The Rat (*Rattus norvegicus*) as a Model Object for Acute Organophosphate Poisoning. 1. Biochemical aspects. J. Evol. Biochem. Physiol. 2. 2019. In print. (In Russ).]

## The Rat (*Rattus Norvegicus*) as a Model Object for Acute Organophosphate Poisoning. 3. Cardiorespiratory Parameters

S. V. Kuznetsov<sup>a</sup> and N. V. Goncharov<sup>a,b,#</sup>

<sup>a</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>b</sup> Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, Federal Medical and Biological Agency of Russia, St. Petersburg, Russia

<sup>#</sup>e-mail: [ngoncharov@gmail.com](mailto:ngoncharov@gmail.com)