

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНГАЛЯЦИОННОГО ПРИМЕНЕНИЯ АТРОПИНА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ДЫХАТЕЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ОТРАВЛЕНИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМ СОЕДИНЕНИЕМ

Иванов И.М., Субботина С.Н., Алхутова И.М., Колесников А.М., Рагузина Д.В.

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации

Резюме. В работе проведено экспериментальное изучение эффективности ингаляционного применения атропина в качестве средства коррекции дыхательных нарушений, вызванных острым отравлением крыс фосфорорганическим соединением. Показано, что внутримышечное введение токсиканта в дозе ЛД₁₆ вызывает значимые изменения функции внешнего дыхания крыс, проявляющиеся в снижении минутного объема дыхания, увлечении продолжительности вдоха и выдоха, увеличении экспираторных пауз, развитии бронхоконстрикции. Продолжительность токсических эффектов составляет 240-360 мин. Однократное интратрахеальное введение атропина в дозах 0,26 и 0,86 мг/кг (3 и 10 мг в пересчете на человека) способствует снижению выраженности бронхоспазма в 1,6-2,6 раза по сравнению с группой контроля. Терапевтические эффекты сохраняются на протяжении 2-3-х часов в зависимости от вводимой дозы антидота. Показана целесообразность повторного введения атропина с интервалом 2 ч. Двукратное ингаляционное применение антидота в дозе 0,26 мг/кг в соответствии с предложенной схемой позволяет полностью купировать проявления бронхоконстрикции и предотвратить рецидивы дыхательных нарушений. Установлено, что повторное применение атропина в дозе 0,86 мг/кг характеризуется усилением токсического действия фосфорорганическим соединением и сопровождается увеличением доли погибших животных. Полученные результаты указывают на недопустимость ингаляционного применения атропина в дозах, превышающих 3 мг.

Ключевые слова: фосфорорганические соединения; функция внешнего дыхания; атропин; эффективность; ингаляционное применение

**EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF INHALATION USE OF
ATROPINE FOR THE CORRECTION OF RESPIRATORY DISORDERS IN CASE OF
POISONING WITH ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS**

Ivanov I.M., Subbotina S.N., Alhutova I.M., Kolesnikov A.M.

*Federal State Budgetary Institution "State Research Testing Institute of Military Medicine"
of the Ministry of Defense of the Russian Federation, St. Petersburg 195043, St Petersburg, st.
Lesoparkovaya, 4*

Abstract. The article carried out an experimental study of the effectiveness of inhalation use of atropine as a means of correcting respiratory disorders caused by acute poisoning of rats with an organophosphorus compound. It has been shown that intramuscular administration of a toxicant at a dose LD₁₆ causes significant changes in the external respiratory function of rats, manifested in a decrease in the minute volume of respiration, increase in inhalation and exhalation, an increase in expiratory pauses and the development of bronchoconstriction. The duration of toxic effects is 240-360 minutes. Single intratracheal administration of atropine in doses of 0,26 and 0,86 mg/kg (3 and 10 mg per person) helps to reduce the severity of bronchospasm by 1,6-2,6 times compared with the control group. Therapeutic effects persist for two to three hours, depending on the dose of antidote administered. In this regard the expediency of repeated administration of atropine with an interval of 2 hours is shown. Double inhalation use of the antidote at a dose of 0,26 mg/kg in accordance with the proposed scheme allows completely stopping the manifestations of bronchoconstriction and preventing recurrence of respiratory disorders. It was found that the repeated use of atropine at a dose of 0,86 mg/kg is characterized by an increase in the toxic effect of organophosphorus compounds and is accompanied by an increase in the proportion of dead rats. The obtained results indicate the inadmissibility in doses exceeding 3 mg.

Key words: organophosphorus compounds; external respiratory function; atropine; effectiveness; inhalation use

Введение. Среди многочисленных проявлений токсического действия фосфорорганических соединений (ФОС) нарушения респираторной функции играют одну из ключевых ролей в патогенезе отравления [1, 2, 3].

К основным патогенетическим механизмам дыхательной недостаточности можно отнести затруднение проходимости дыхательных путей (бронхорея и спазм бронхов), изменение активности дыхательной мускулатуры (фасцикуляция, гипертонус и паралич), нарушение микроциркуляции (агрегация эритроцитов и стаз) и функции сердечной мышцы (аритмия, гипер- и гиподинамическая реакция), угнетение дыхательного центра. Показано,

что спазм бронхов при отравлении ФОС вызван сокращением гладкомышечных элементов бронхов [4] за счет избыточного влияния ацетилхолина на М₃-, и в некоторой степени Н- и М₂-холинорецепторы. Определенный вклад в формирование дыхательной недостаточности вносит альвеолярный отек, который вызывают циркулирующие в крови ФОС за счет нарушения эндотелиально-эпителиального барьера легких и увеличения проницаемости легочных капилляров [5]. У грызунов после ингаляционного воздействия модельным ФОС был отмечен острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), который характеризовался дозозависимым увеличением содержания жидкости в альвеолах, концентрации белка и нейтрофилов в бронхо-альвеолярном лаваже, участками локальных кровотечений и очагами воспаления [6]. В клинических наблюдениях описаны случаи ОРДС при отравлениях фосфорорганическими инсектицидами [7], которые сопровождались как прямым цитотоксическим действием на легочную ткань, так и поражением эндотелия. В патологоанатомическом исследовании [8] приведены результаты 85 случаев отравления ФОС, где упоминается, что у 36 погибших в первые сутки наблюдали интерстициальный отек легких, а у 12-ти человек – паренхиматозное кровоизлияние в легких.

Применение антидотов (пеликсим) и средств неотложной терапии (атропин, карбоксим, диазепам) не обеспечивает полного устранения нарушений дыхательной функции. Несмотря на то, что неселективный М-антагонист атропин эффективно устраняет бронхорею и бронхоспазм [9], тяжелые отравления ФОС, особенно при ингаляционном пути поступления токсиканта, нередко сопровождаются рецидивирующим течением бронхоспазма. Показано, что атропин препятствует избыточной продукции жидкости секреторными клетками легочного эпителия, но не увеличивает скорость удаления жидкости из альвеол через интерстициальное пространство и лимфатическую систему [10].

На сегодняшний день предложен подход к коррекции дыхательных нарушений за счет ингаляционного применения бронхолитиков, в том числе атропина. Главным преимуществом ингаляционного способа доставки лекарственных средств считается удобство применения и непосредственное лечебное воздействие на уровне мелких бронхов, бронхиол и альвеол. Эффективность бронхолитиков при ингаляционном применении подтверждена в опытах на морских свинках, когда ингаляция сальбутамола на фоне интоксикации паратином способствовала уменьшению выраженности альвеолярного отека [11]. В работе [12] продемонстрировано усиление эффективности формотерола и сальбутамола в комбинации с гликопирролатом или атропином. Применение последнего через небулайзер в большей степени обеспечивало коррекцию дыхательных нарушений по сравнению с его внутримышечным введением [13].

В настоящее время в РФ арсенал средств для предупреждения и купирования дыхательной недостаточности при отравлении ФОС на доврачебных этапах оказания медицинской помощи недостаточен. В этой связи совершенствование медицинских средств защиты путем разработки новых лекарственных форм антидотов (например, в виде дозированных аэрозольных (ДАИ) или порошковых ингаляторов (ДПИ)) представляется весьма актуальным. В качестве одного из направлений оптимизации существующих схем терапии дыхательных нарушений на фоне отравления ФОС следует рассматривать разработку ингаляционной формы атропина. Подтверждением этому служит тот факт, что за рубежом ингаляционная форма атропина предложена в дополнение к существующим парентеральным формам для самостоятельного повторного применения пациентами, находящимися в удовлетворительном состоянии после отравления легкой и средней степени тяжести [14; 15]. Кроме того, в США и Индии завершены клинические испытания атропина в составе ДАИ и ДПИ, предназначенного для оснащения армейских подразделений в качестве средства лечения дыхательной недостаточности при отравлении боевыми отравляющими веществами.

Необходимость проработки вопросов по обоснованию схем и способов ингаляционного применения атропина на фоне отравлений ФОС требует проведения медико-биологических исследований его эффективности. Результаты подобных доклинических исследований позволят определить перспективы новой лекарственной формы и сформулировать рекомендации по применению препарата в схемах этапного лечения отравлений ФОС.

Учитывая вышесказанное, *цель настоящего исследования* состояла в изучении эффективности ингаляционного применения атропина для коррекции дыхательных нарушений при отравлении крыс модельным ФОС в дозе 1 ЛД₁₆.

Материалы и методы. Исследования выполнены на половозрелых самцах белых беспородных крыс (200-250 г), полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» Ленинградской области. Эксперименты проводили в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики (Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г N 199н) и Директивой 2020/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2016 г. по охране животных, используемых в научных целях. Крыс содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе со свободным доступом к воде. Все опытные и контрольные животные были взяты из одного привоза и прошли карантин в течение 14 суток.

Моделирование нарушений функции внешнего дыхания крыс осуществляли путем внутримышечного введения модельного ФОС в дозе 1 ЛД₁₆.

Исследовали эффекты атропина сульфата моногидрата (субстанция Sigma Aldrich, США) при интратрахеальном (и/т) введении крысам в дозах 0,26 мг/кг и 0,86 мг/кг. Указанные дозы соответствуют 3 и 10 мг в пересчете на человека (метод межвидового переноса по аллометрической шкале [16]). При выборе доз основывались на том, что доза 3 мг является рекомендованной для ингаляционного применения у человека [13]. При отравлениях легкой и средней степени тяжести пострадавшим требуется многократное введение антидота, при этом суммарная доза, обеспечивающая адекватное облегчение симптомов, составляет 10-20 мг в первые 2-3 ч после отравления [17].

Оценку эффективности атропина проводили при следующих схемах введения: однократно через 1 час после отравления, и двукратно через 1 и 3 часа после отравления.

Введение рабочих растворов осуществляли с использованием зонда MicroSprayer® IA-2B и ларингоскопа для мелких животных модель LS-2 производства Penh Century (США). Объем введения растворов в форме жидкого аэрозоля составлял 0,2-0,25 мл/жив (из расчета 0,1 мл на 100 г веса животного). Животные контрольной группы получали воду для инъекций в аналогичном объеме.

Регистрацию показателей ФВД осуществляли с использованием плетизмографа ecgTUNNEL (Emka Technologies, Франция). Продолжительность записи составляла 3 мин. Фиксировали следующие параметры ФВД: дыхательный объем (ДО), частота дыхания (ЧД), минутный объем дыхания (МОД), пиковая скорость вдоха/выдоха (ПС_{вд.}/ПС_{выд.}), время вдоха/выдоха (Т_{вд.}/Т_{выд.}), продолжительность паузы на выдохе (ЕЕР), интегральный показатель бронхоконстрикции (Penh). Критерием развития бронхоспазма считали значение показателя Penh более 1,2 [18]. Сроки регистрации параметров ФВД составили 30 мин до введения токсиканта (фон), 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360 минут и 1 сутки после отравления.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0 и Excel 2010. Применяли непараметрические методы статистики: для сравнения количественных показателей - критерий Краскела-Уоллиса, для качественных показателей - критерий χ^2 , для сравнения зависимых выборок - критерий Т-Вилкоксона. Критическое значение уровня статистической значимости принимали равным 0,05.

Результаты исследования. В предварительной серии экспериментов была проведена оценка переносимости атропина при двукратном и/т введении крысам в дозах 0,26 мг/кг и 0,86 мг/кг. Интервал между введениями составил 3 часа. Было установлено, что

холиноблокатор не оказывает негативного влияния на показатели ФВД крыс. Динамика МОД и интегрального показателя бронхоконстрикции Penh представлены на рисунках 1 и 2.

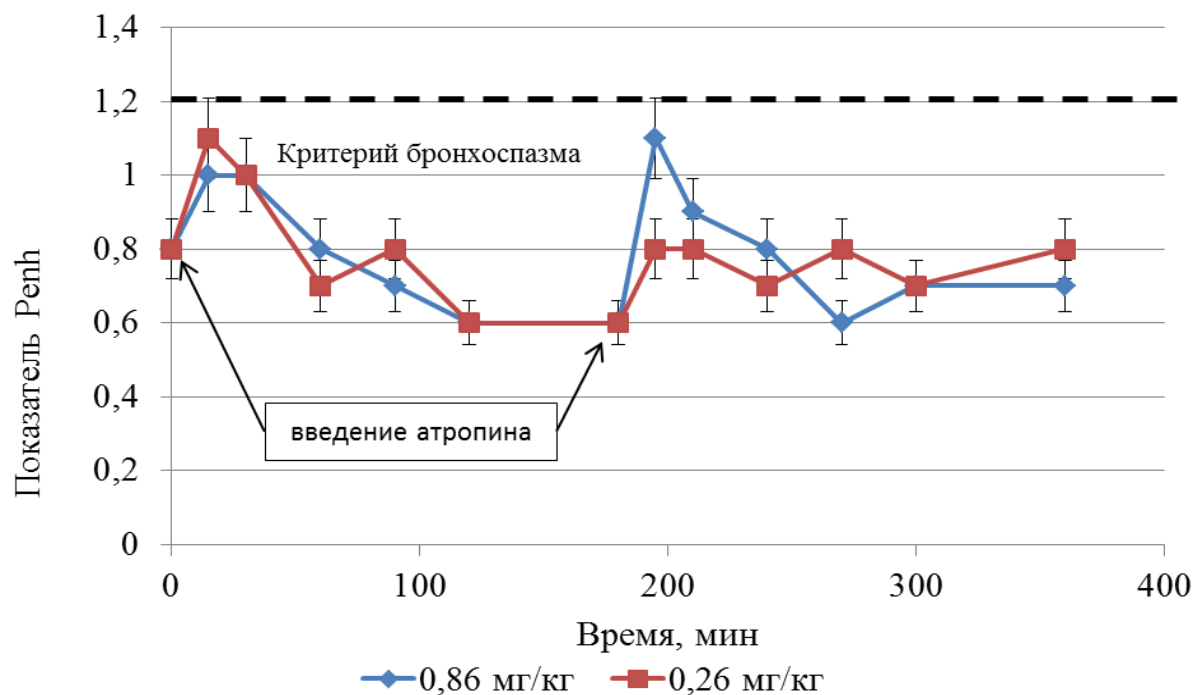


Рисунок 1 - Величина показателя Penh у крыс в различные сроки после и/т введения атропина в дозах 0,26 мг/кг и 0,86 мг/кг (Med [Q₂₅; Q₇₅], n=6)

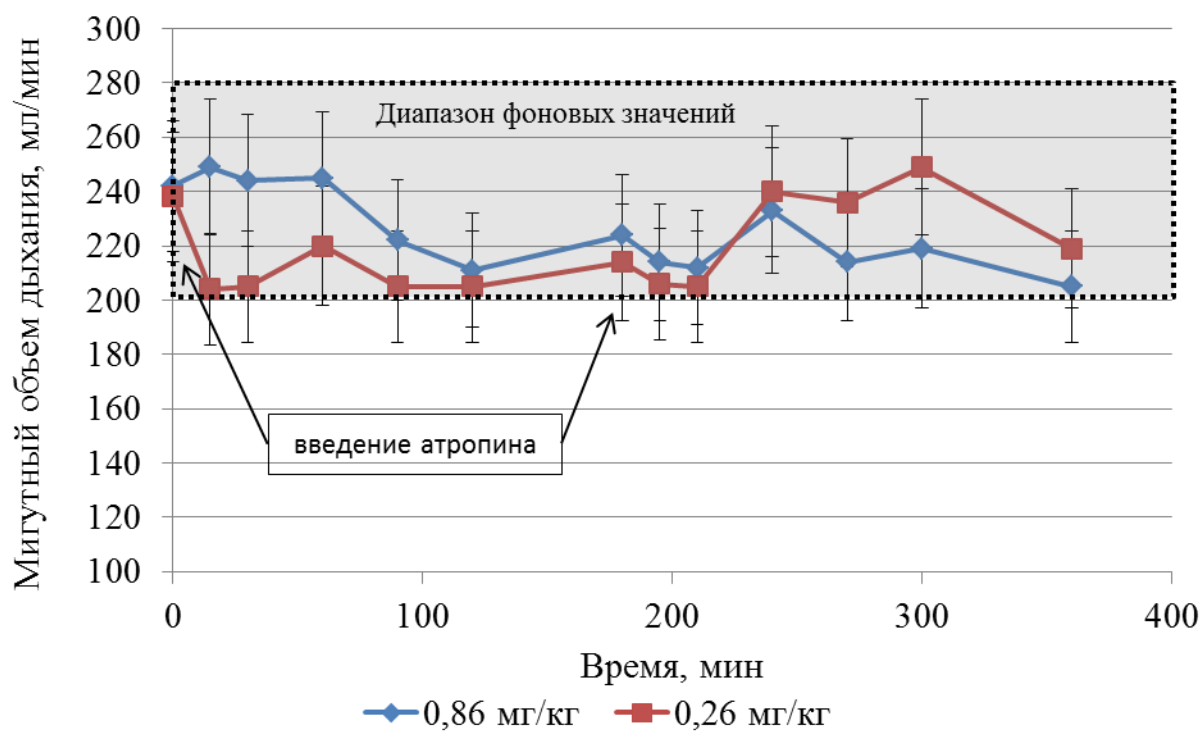


Рисунок 2 - Величина показателя МОД у крыс в различные сроки после и/т введения атропина в дозах 0,26 мг/кг и 0,86 мг/кг (Med [Q₂₅; Q₇₅], n=6)

Как первое, так и второе и/т введение атропина в обеих исследованных дозах сопровождалось некоторым подъемом показателя Penh, однако оно не достигало критерия, позволяющего констатировать развитие бронхоспазма. Колебание величины МОД не превышало диапазон фоновых значений. Полученные результаты свидетельствовали о безопасности ингаляционного поступления атропина в дозах, соответствующих 3 и 10 мг в пересчете на человека.

Введение ФОС в дозе 1ЛД₁₆ вызывало значимые изменения ФВД крыс. Через 10 мин после аппликации регистрировали достоверное снижение частоты дыхания и МОД, увеличение продолжительности вдоха и выдоха, увеличение экспираторных пауз. Свидетельством развития у контрольных животных бронхоконстрикции служило увеличение показателя Penh на 100-130% в сравнении с фоном. Указанные изменения сохранялись на протяжении 240-360 мин. Спустя 1 сут регистрировали нормализацию ФВД.

Введение атропина способствовало снижению выраженности бронхоспазма у крыс (рисунки 3 и 4).

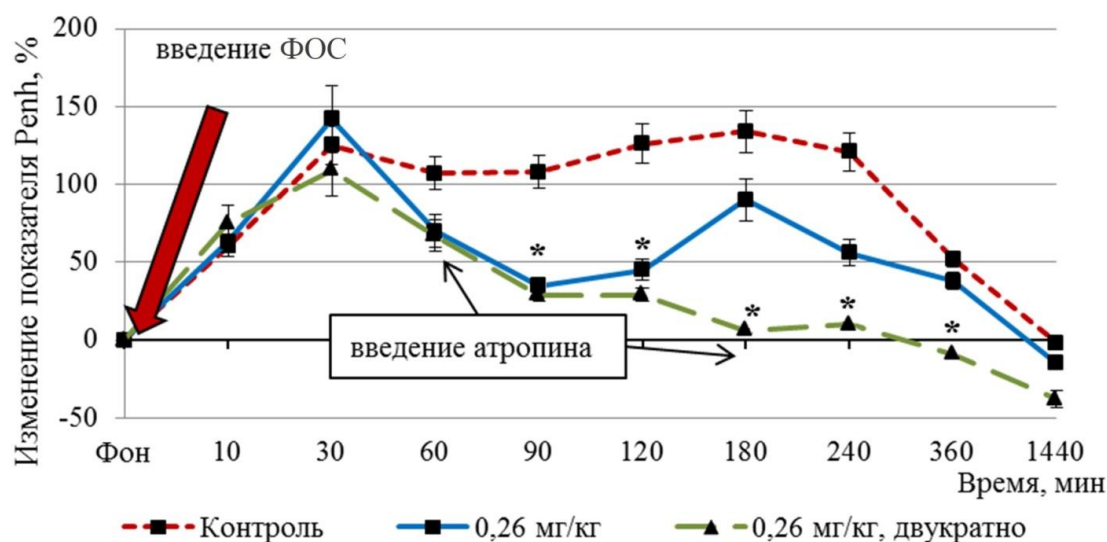


Рисунок 3 - Изменение показателя Penh (%) у крыс в различные сроки после отравления модельным ФОС в дозе ЛД₁₆ (в/м) и введения атропина однократно (через 1 час) или двукратно (через 1 и 3 часа) дозе 0,26 мг/кг и/т.

Примечание *- отличия от контрольной группы значимы, $p \leq 0,05$.

Так, однократное применение атропина в дозе 0,26 мг/кг позволило снизить проявления бронхоконстрикции (по показателю Penh) более чем в 2 раза по сравнению с

группой контроля. Положительную динамику наблюдали на протяжении 2-х часов после введения антидота, затем (180 мин от момента введения токсиканта) регистрировали повторное увеличение значений P_{enh} . Полученные результаты могли свидетельствовать о рецидиве дыхательных нарушений вследствие ослабления терапевтического действия атропина.

Сравнительная оценка эффективности однократного и двукратного применения атропина подтверждала целесообразность повторного введения холинолитика с целью купирования рецидива дыхательных нарушений после введения ФОС. Было показано снижение P_{enh} сразу после повторного (180 мин) введения холинолитика в сравнении с контрольными животными и животными, получавшими атропин однократно. Наряду с восстановлением коэффициента P_{enh} , в этот же срок у опытных животных отмечали восстановление МОД и ЧД. Терапевтический эффект после двукратного введения атропина сохранялся на протяжении 3 ч.

Однократное и/т введение атропина в дозе 0,86 мг/кг также способствовало нормализации дыхания животных (рисунок 4), однако в этой группе отмечали единичную гибель животных, чего не наблюдали после применения холинолитика в дозе 0,26 мг/кг.

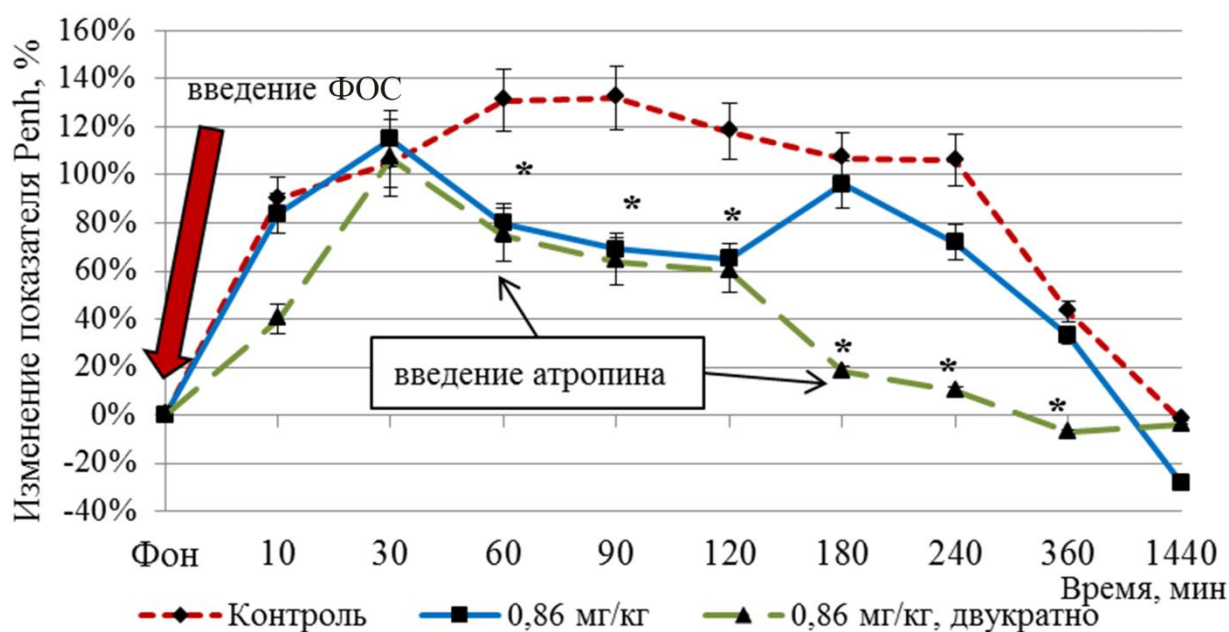


Рисунок 4 - Изменение показателя P_{enh} (%) у крыс в различные сроки после отравления модельным ФОС в дозе LD_{16} (в/м) и введения атропина однократно (через 1 ч) или двукратно (через 1 и 3 ч) дозе 0,86 мг/кг и/т.

Примечание - * - отличия от контрольной группы, $p \leq 0,05$.

Двукратное и/т введение атропина в дозе 0,86 мг/кг, несмотря на полное купирование проявлений бронхоконстрикции после второго введения, приводило к гибели половины животных в группе в первые сутки после отравления.

Кроме того, было отмечено, что повышение дозы с 0,26 до 0,86 мг/кг не вызывало усиление терапевтической эффективности антидота по предупреждению бронхоспазма у крыс. В период 60-240 мин (от момента введения токсиканта) значения показателя Penh в группе животных, получавших атропин в дозе 0,26 мг/кг, были ниже контрольных значений в 1,6-2,6 раза, в группе животных, получавших атропин в дозе 0,86 мг/кг - в 1,2-2,0 раза.

Заключение. Согласно литературным данным, в патогенезе острых отравлений ФОС (особенно при ингаляционном воздействии) важная роль в формировании дыхательных нарушений отводится местным механизмам. В этой связи, ингаляционный способ доставки лекарственных средств для оказания лечебного эффекта непосредственно в органе-мишени представляется наиболее целесообразным. В настоящее время перспективным направлением совершенствования медицинских средств защиты, предназначенных для купирования проявлений дыхательной недостаточности при острых отравлениях судорожными ядами, является разработка ингаляционных форм антидотных средств. Обоснованность ингаляционного применения холиноблокаторов, в частности, атропина, подтверждается успешным применением препарата с помощью небулайзера для коррекции дыхательной недостаточности при отравлениях органофосфатами [13] и завершением его клинических исследований в составе ДАИ [14] и ДПИ [15] для оснащения зарубежных армейских подразделений.

Полученные в наших исследованиях данные подтвердили лечебную эффективность атропина при ингаляционном применении. Снижение выраженности бронхоспазма у крыс (по показателю Penh) наблюдали при введении М-холиноблокатора в обеих исследованных дозах. При этом дозозависимого усиления эффективности антидота по предупреждению дыхательных нарушений не отмечали.

Сравнительный анализ терапевтического действия атропина при однократном и двукратном применении подтвердил целесообразность повторного введения холинолитика. Купирование рецидива дыхательных нарушений регистрировали при введении атропина в обеих дозах, при этом эффект сохранялся на протяжении 2-х часов после однократного применения, и на протяжении 3-х часов после повторного введения антидота. Эти результаты могут быть использованы при разработке схем ингаляционного применения атропина и позволяют обосновать необходимость кратного введения М-холинолитика с интервалом 2-3 часа для предупреждения рецидивов нарушений дыхания.

Немаловажное значение имеют выявленные негативные эффекты атропина при применении в дозе 0,86 мг/кг (10 мг/кг в пересчете на человека) на течение интоксикации ФОС. При однократном и двукратном и/т применении антидота в указанной дозе наблюдали увеличение доли погибших животных. Полученные результаты указывают на недопустимость ингаляционного применения атропина в разовой дозе, превышающей 3 мг (в пересчете на человека).

Положительные результаты (отсутствие значимых изменений показателей ФВД), полученные при оценке переносимости атропина в дозах 3 и 10 мг при двукратном интратрахеальном введении с интервалом 3 часа, согласуются с опытом безопасного клинического применения комбинированного препарата «Эфатин» в ДАИ с разовой дозой атропина 1 мг [19].

Таким образом, наличие высокой лечебной эффективности атропина в дозах, не превышающих 3 мг, по купированию дыхательных нарушений, вызванных острым отравлением ФОС в сублетальных дозах, и безопасность ингаляционного применения антидота, подчеркивают целесообразность разработки на его основе ингаляционной лекарственной формы в виде ДАИ или ДПИ для системного введения в постинтоксикационном периоде. Данные по продолжительности терапевтического действия атропина при ингаляционном введении в дозе 3 мг указывают на необходимость кратного проведения ингаляций каждые 2-3 ч.

Список литературы

1. Eddleston M., Mohamed F., Davies J. Respiratory failure in acute organophosphorus pesticide self-poisoning. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*. 2006; 99: 513–522.
2. Иванов И.М., Субботина С.Н., Алхутова И.М., и др. Механизмы нарушений дыхания при отравлениях фосфорорганическими соединениями и направления коррекции при помощи бронхорасширяющих средств. *Медлайн.ру*. 2022; 23: 185-200. [URL: http://medline.ru/public/art/tom23/art12.html](http://medline.ru/public/art/tom23/art12.html) (Дата обращения 24.03.2023).
3. Кряжевских А.А., Кряжевских А.А., Субботина С.Н., Склорова Н.А. Влияние фосфорорганических соединений на функцию внешнего дыхания крыс при интратрахеальном и внутрижелудочном введении. *Формулы фармации*. 2021; 3 (2): 60-65.
4. Rezk P.E., Graham J.R., Moran T.S. Acute toxic effects of nerve agent VX on respiratory dynamics and functions following microinsillation inhalation exposure in guinea pigs. *Inhal Toxicol*. 2007; 19: 291–302.

5. Laine P., Robineau P., Guittin P. Mechanisms of pulmonary edema induced by an organophosphorus compound in anesthetized dogs. *Fundam Appl Toxicol.* 1991; 17: 177–185.
6. Gundavarapu, S., Zhuang J., Barrett E.G. A critical role of acute bronchoconstriction in the mortality associated with high-dose sarin inhalation: effects of epinephrine and oxygen therapies. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014; 274: 200–208.
7. Hulse E.J., Davies J.O., Simpson A.J. Respiratory complications of organophosphorus nerve agent and insecticide poisoning. Implications for respiratory and critical care. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014; 190(12): 1342–1354.
8. Kamat, S.R., Heera S., Potdar P.V. Bombay experience in intensive respiratory care over 6 years *J. Postgrad. Med.* 1989; 35: 123–134.
9. Wess J., Eglen R.M., Gautam D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6: 721–733.
10. Takemura Y., Helms M.N., Eaton A.F. Cholinergic regulation of epithelial sodium channels in rat alveolar type 2 epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013; 304: 428–437.
11. Segura P., Chávez J., Montaña L.M. Identification of mechanisms involved in the acute airway toxicity induced by parathion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999; 360: 699–710.
12. Herbert J., Thiermann H., Worek F., Wille T. COPD and asthma therapeutics for supportive treatment in organophosphate poisoning. *Clin Toxicol (Phila).* 2019; 57(7): 644–651.
13. Orma P.S., Middleton R.K. Aerosolized atropine as an antidote to nerve gas. *Ann Pharmacother.* 1992; 26: 937–938.
14. Kehe C.R., Lasseter K.C., Miller N.C. Comparative absorption of atropine from a metered-dose inhaler and an intramuscular injection. *Ther Drug Monit.* 1992; 14: 132–134.
15. Corcoran T.E., Venkataramanan R., Hoffman R.M. Systemic delivery of atropine sulfate by the microdose dry-powder inhaler. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2013; 26(1): 46–55.
16. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р.У. Хабриева // Москва: Изд-во «Медицина», 2005.
17. Общая токсикология / под ред. Курляндского Б.А., Филова В.А. М.: «Медицина», 2002.
18. Frazer D.G., Reynolds J.S., Jackson M.C. Determining when enhanced pause (Penh) is sensitive to changes in specific airway resistance. *Toxicol Environ Health.* 2011; 74 (5): 287–295.

19. Солиев А.У. Лечение хронического кашля и бронхиальной астмы. *Биология и интегративная медицина*. 2017; 5: 47-56.