

ХАРАКТЕРИСТИКА СИНДРОМА ДИАРЕИ ПРИ ИПРИТНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У КРЫС

Сидоров С.П.¹, Сергеев А.А.¹, Булка К.А.², Чепур С.В.¹, Кузьмин А.А.¹

¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации. 195043, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4.

²ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации. 194044, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6.

Резюме.

Введение. Синдром диареи в клинической практике, в том числе при различных отравлениях, встречается достаточно часто. Анализ данных литературы позволяет рассматривать синдром диареи в качестве одного из ведущих в структуре клинических проявлений при отравлении сернистым ипритом. Несмотря на это, механизмы патогенеза ипритной диареи практически не изучены, более того — в научной литературе отсутствуют подробные сведения об особенностях динамики и выраженности рассматриваемого синдрома при ипритной интоксикации в эксперименте.

Цель работы — охарактеризовать синдром диареи при ипритной интоксикации у крыс, а также изучить возможность использования показателей выраженности диареи в качестве критерия для оценки эффективности разрабатываемых средств профилактики и терапии поражений сернистым ипритом.

Материалы и методы. Опыты выполнены на 300 белых беспородных крысах-самцах. При исследовании острой токсичности иприта в диапазоне доз от минимально летальной до абсолютно летальной оценивали выраженность диареи (с 1-х по 4-е сут) и гибель животных (до 14 сут включительно). При исследовании возможности использования показателей выраженности диареи в качестве критерия для оценки эффективности разрабатываемых средств профилактики и терапии поражений ипритом проводили ROC-анализ, рассчитывали параметры чувствительности и специфичности, площадь под ROC-кривыми (AUC).

Результаты. Полученные результаты демонстрируют, что показатели выраженности диареи отражают динамику и тяжесть ипритной интоксикации у крыс. Наибольшие клинические проявления диареи наблюдали на пике интоксикации (3-и сут) во всем диапазоне доз токсиканта. В исследованной выборке разграничительная способность (AUC) критерия выраженности диареи на 3-и сут в отношении летального исхода соответствует его хорошей

прогностической способности. Параметры чувствительности и специфичности для оцениваемого параметра составили 0,92 и 0,55, соответственно.

Заключение. Таким образом, критерий выраженности диареи может быть обоснованно включен в программу оценки эффективности разрабатываемых средств профилактики и терапии поражений ипритом.

Ключевые слова: сернистый иприт; диарея; резорбтивное действие; желудочно-кишечный тракт; ROC-анализ

CHARACTERISTIC OF DIARRHEA SYNDROME IN RATS DURING SULFUR MUSTARD POISONING

Sidorov S.P.¹, Sergeev A.A.¹, Bulka K.A.², Chepur S.V.¹, Kuzmin A.A.¹

¹ *State Scientific Test Research Institute of Military Medicine, Ministry of Defense of the Russian Federation. 195043, Russia, Saint Petersburg, Lesoparkovaya st., 4.*

² *Military Medical Academy of S. M. Kirova, Ministry of Defense of the Russian Federation. 194044, Russia, Saint Petersburg, Lebedeva st., 6*

Abstract

Introduction. Diarrhea syndrome in clinical practice, including with various poisoning, is quite common. Analysis of the literature data allows us to consider diarrhea syndrome as one of the leading clinical manifestations in the structure of sulfur mustard poisoning. Despite this, the mechanisms of the pathogenesis of sulfur mustard diarrhea have not been practically studied, moreover, there is no detailed information in the scientific literature about the features of the dynamics and severity of the syndrome under consideration with sulfur mustard poisoning in the experiment.

The aim of the work is to evaluate the dynamics and severity of diarrhea in case of sulfur mustard poisoning in rats, as well as to study the possibility of using indicators of this syndrome as a criterion for evaluating the effectiveness of the developed means of prevention and treatment of sulfur mustard poisoning.

Materials and methods. The experiments were performed on 300 white male rats. In the study of acute toxicity of sulfur mustard in the dose range from minimally lethal to absolutely lethal, the severity of diarrhea and mortality were evaluated. When investigating the possibility of using indicators of diarrhea syndrome as a criterion for evaluating the effectiveness of the developed means of prevention and treatment of sulfur mustard poisoning, a ROC analysis was performed, sensitivity and specificity parameters, the area under the ROC curves (AUC) were calculated.

Results. The results obtained demonstrate that indicators of the severity of diarrhea reflect the dynamics and severity of sulfur mustard poisoning in rats. The greatest severity of diarrhea was

observed at the peak of sulfur mustard poisoning (3 days) in the entire range of doses of the toxicant. In the studied sample, AUC of the criterion for the severity of diarrhea on the 3rd day in relation to the lethal outcome corresponds to its good prognostic ability. The sensitivity and specificity parameters for the estimated criterion were 0.92 and 0.55, respectively.

Conclusion. Thus, the criterion of the severity of diarrhea can be reasonably included in the program for evaluating the effectiveness of the developed means of prevention and treatment of sulfur mustard poisoning.

Keywords: sulfur mustard; diarrhea; resorptive effect; gastrointestinal tract; ROC analysis

Введение

Синдром диареи в клинической практике, в том числе при различных отравлениях, встречается достаточно часто [1, 2]. В зависимости от механизмов развития различают несколько патогенетических вариантов диареи [1–3]:

- секреторная, обусловленная прямой стимуляцией секреции воды и электролитов различными агентами и веществами (энтеропатогенные вирусы, бактериальные энтеротоксины, простагландины, интестинальные пептиды и биоамины, желчные и жирные кислоты и др.);

- экссудативная, при которой происходит экссудация белка, воды и электролитов в просвет кишки через поврежденную слизистую оболочку;

- осмотическая (осмолярная), характеризующаяся увеличением осмолярности кишечного содержимого вследствие нарушения полостного и мембранного пищеварения;

- моторная (дискинетическая), обусловленная повышением или снижением пропульсивной функции кишечника.

Часто в патогенез диареи одновременно вовлекаются несколько механизмов. Например, при воспалительных заболеваниях кишечника диарея протекает по смешанному типу, включающему экссудативный, секреторный и осмотический компоненты.

Анализ клинических данных, а также результатов экспериментов на животных, позволяет рассматривать синдром диареи в качестве одного из ведущих в структуре клинических проявлений со стороны желудочно-кишечного тракта при ипритной интоксикации [4, 5]. Несмотря на это, механизмы патогенеза ипритной диареи практически не изучены, более того — в научной литературе отсутствуют подробные сведения об особенностях ее динамики и выраженности.

Цель работы — охарактеризовать синдром диареи при ипритной интоксикации у крыс, а также изучить возможность использования показателей выраженности диареи в

качестве критерия для оценки эффективности разрабатываемых средств профилактики и терапии поражений сернистым ипритом (далее – иприт).

Материалы и методы

Опыты выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 180–220 г, полученных из питомника РАН «Рапполово» (Ленинградская область). При выполнении экспериментов соблюдали правила гуманного обращения с лабораторными животными в соответствии с Европейской конвенцией по защите экспериментальных животных 86/609 ЕЕС [6].

При выполнении исследований иприт вводили крысам внутримышечно. Растворы токсиканта готовили на диметилсульфоксиде, содержание которого в рабочих растворах составляло 4 %.

При исследовании острой токсичности иприта в диапазоне доз от минимально летальной до абсолютно летальной (3,16; 3,98; 5,01 и 6,31 мг/кг) оценивали выраженность диареи и летальность. При выборе доз токсиканта был использован методический приём, предложенный В. Б. Прозоровским, суть которого заключается в использовании доз, расположенных по логарифмической шкале с интервалом 0,1 [7]. Срок наблюдения за животными после введения иприта составлял 14 сут.

Показатели летальности представлены в виде доли погибших животных и 95 % доверительного интервала (95 % ДИ), рассчитанного по методу Уилсона-Брауна [8, 9]. Среднюю летальную дозу (ЛД₅₀) рассчитывали методом бинарной логистической регрессии.

Оценку выраженности диареи проводили в период с 1-х по 4-е сут по шкале консистенции каловых масс в баллах от 0 до 3 (0 — стул не изменен, 1 — кашицеобразный, 2 — жидкий, 3 — водянистый). Данная шкала представляет собой модифицированную Бристольскую шкалу формы кала (шкала Мейерса), которую широко используют для медицинской оценочной классификации формы и консистенции кала у человека. Из соображений минимизации субъективной оценки классификацию выраженности диареи в соответствии с предлагаемой шкалой проводил один специалист.

Статистический анализ показателей выраженности диареи проводили в сравнении с показателями животных на 1-е сут наблюдения в соответствующей дозе с использованием точного критерия Фишера.

При определении корреляционной связи вводимой дозы токсиканта с показателями выраженности диареи рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена (r). При значениях $r < 0,3$ корреляционную связь считали слабой, от 0,3 до 0,69 — умеренной, $> 0,7$ — сильной.

При исследовании возможности использования показателей выраженности диареи в качестве критерия для оценки эффективности разрабатываемых средств профилактики и

терапии поражений ипритом проводили ROC-анализ (англ. Receiver Operating Characteristic — рабочая характеристика приёмника), рассчитывали параметры чувствительности и специфичности, площадь под ROC-кривой — AUC (англ. Area Under Curve — площадь под кривой). Значения AUC до 0,6 считали соответствующими неудовлетворительному качеству модели, от 0,6 до 0,7 — среднему, от 0,7 до 0,8 — хорошему, от 0,8 до 0,9 — очень хорошему, от 0,9 до 1,0 — отличному [10].

Статистический анализ массива данных проводили с помощью GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, США) и в программной среде R.

Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Результаты оценки острой токсичности иприта, представленные в таблице 1 демонстрируют, что введение токсиканта в диапазоне доз от 3,16 до 6,31 мг/кг приводит к дозозависимому увеличению гибели животных. Значение ЛД₅₀ составляет 3,99 мг/кг (95 % ДИ 3,85–4,14 мг/кг) и удовлетворительно согласуется с литературными данными.

Таблица 1.

Результаты оценки летальности крыс при исследовании острой токсичности иприта

Доза иприта, мг/кг	Количество животных			Доля погибших животных	
	Пало	Выжило	Всего	%	95 % ДИ
3,16	6	71	77	7,8	3,6–16,0
3,98	44	33	77	57,1	46,0–67,6
5,01	65	9	74	87,8	78,5–93,5
6,31	72	0	72	100,0	94,9–100,0

Динамика выраженности диареи у крыс с 1-х по 4-е сут после введения токсиканта представлена на рисунке 1.

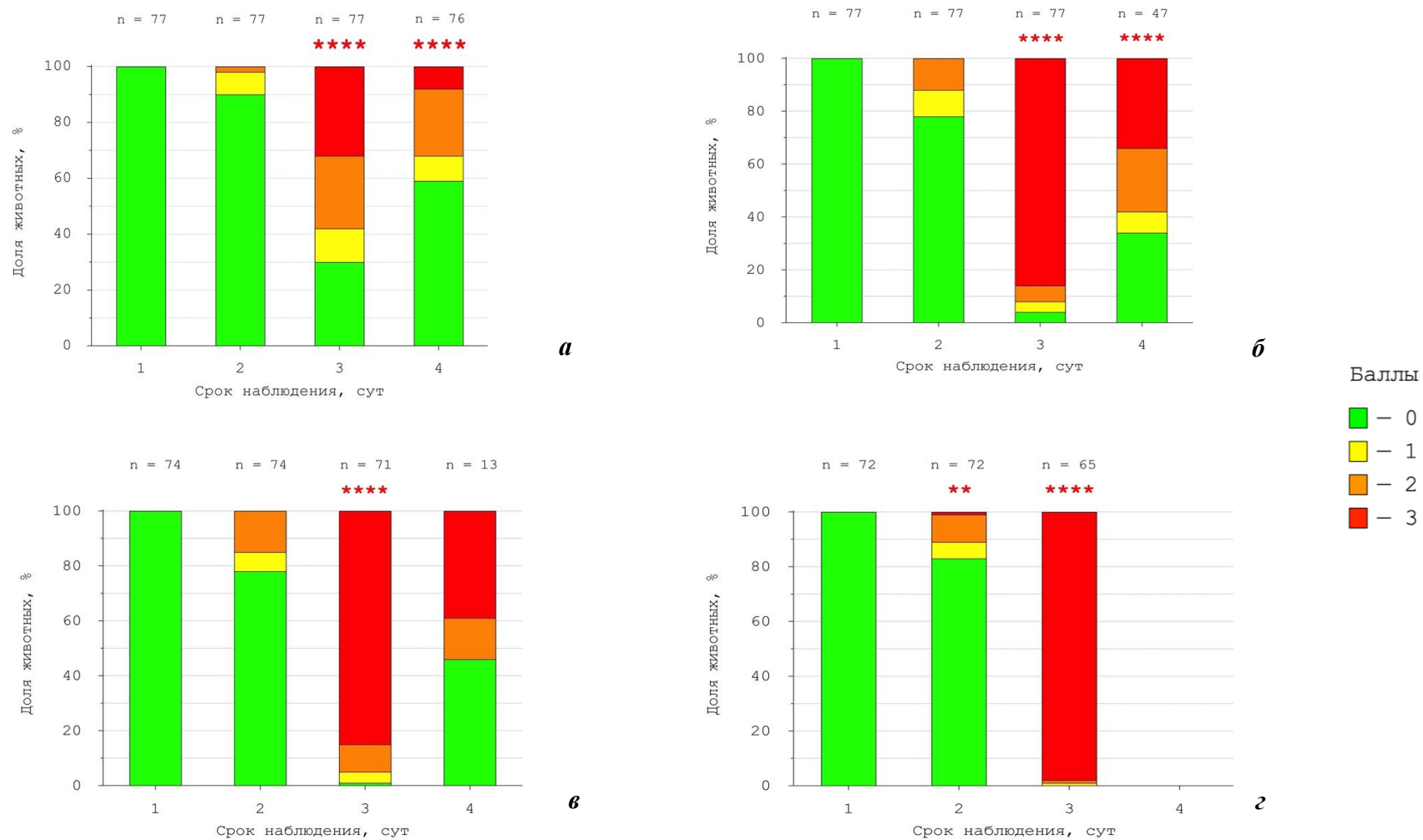


Рисунок 1. Динамика и выраженность диареи у крыс при ипритной интоксикации в дозах: *а* — 3,16 мг/кг, *б* — 3,98 мг/кг, *в* — 5,01 мг/кг, *г* — 6,31 мг/кг. Примечание — ****/**** — различия значимы при сравнении с показателями 1-х сут по точному критерию Фишера ($p < 0,01$ / $p < 0,0001$, соответственно).

В ходе экспериментов установлено, что на 1-е сут после введения токсиканта стул не изменен у всех животных во всех вводимых дозах.

На 2-е сут в исследуемом диапазоне доз иприта процент животных с диареей различной степени выраженности составил от 11 до 22 % (в дозе 3,16 мг/кг — 11 %, в дозе 3,98 мг/кг — 22 %, в дозе 5,01 мг/кг — 22 %, в дозе 6,31 мг/кг — 17 %). Частота и выраженность диареи в данный срок наблюдения при сравнении с показателями 1-х сут значимо отличалась только у животных, которым вводили токсикант в дозе 6,31 мг/кг ($p < 0,01$).

На 3-и сут интоксикации выраженность синдрома диареи была максимальной за весь период наблюдения — процент животных с симптомами диареи составил от 68 до 100 % (в дозе 3,16 мг/кг — 68 %, в дозе 3,98 мг/кг — 96 %, в дозе 5,01 мг/кг — 99 %, в дозе 6,31 мг/кг — 100 %). При этом в процентном соотношении доминировали животные с диареей выраженностью 3 балла (в дозе 3,16 мг/кг — 32 %, в дозе 3,98 мг/кг — 86 %, в дозе 5,01 мг/кг — 85 %, в дозе 6,31 мг/кг — 97 %). Значимые различия выраженности диареи в данный срок наблюдения от показателей на 1-е сут прослеживали у всех животных, которым вводили токсикант ($p < 0,0001$).

На 4-е сут у выживших животных отмечали уменьшение симптоматики, связанной с нарушениями стула. Процент животных с диареей различной степени выраженности составил от 41 до 66 % (в дозе 3,16 мг/кг — 41 %, в дозе 3,98 мг/кг — 66 %, в дозе 5,01 мг/кг — 53 %). Значимые различия выраженности диареи в данный срок наблюдения при сравнении с показателями 1-х сут регистрировали у животных, которым вводили токсикант в дозах 3,16 и 3,98 мг/кг ($p < 0,0001$). Отсутствие различий в выраженности диареи в группе животных, которым вводили иприт в дозе 5,01 мг/кг, в сравнении показателями на 1-е сут можно объяснить небольшим количеством крыс, выживших к этому сроку интоксикации. Отдельно отметим, что все животные, которым вводили иприт в дозе 6,31 мг/кг, погибали до 4-х сут.

Оценка меры степени и направления связи между значениями доз вводимого токсиканта и показателями выраженности диареи продемонстрировала значимые коэффициенты корреляции при наблюдении на 3-и и 4-е сут (табл. 2). Наибольшее значение коэффициента (0,51) регистрировали на 3-и сут, что говорит о положительной связи умеренной силы между оцениваемыми показателями.

Таблица 2.

**Параметры корреляционной связи вводимой дозы токсиканта с показателями
выраженности диареи при ипритной интоксикации у крыс**

Срок наблюдения (количество животных)	Коэффициент корреляции Спирмена, r [95 % ДИ]	Уровень значимости, p
1 сут ($n = 300$)	—	—
2 сут ($n = 300$)	0,07 [-0,05; 0,18]	0,25
3 сут ($n = 290$)	0,51 [0,41; 0,59]	< 0,0001
4 сут ($n = 138$)	0,28 [0,11; 0,43]	0,0008

Оценка корреляционной связи между значениями выраженности диареи и летальностью крыс показала, что значимые коэффициенты корреляции также регистрировали при наблюдении на 3-и и 4-е сут (табл. 3). Наибольшее значение коэффициента (0,54), свидетельствующее о положительной связи умеренной силы между оцениваемыми показателями, регистрировали на 3-и сут.

Таблица 3.

**Параметры корреляционной связи показателей выраженности диареи с
летальностью при ипритной интоксикации у крыс**

Срок наблюдения (количество животных)	Коэффициент корреляции Спирмена, r [95 % ДИ]	Уровень значимости, p
1 сут ($n = 300$)	—	—
2 сут ($n = 300$)	0,06 [0,06; 0,18]	0,28
3 сут ($n = 290$)	0,54 [0,54; 0,62]	< 0,0001
4 сут ($n = 138$)	0,34 [0,34; 0,49]	< 0,0001

Результаты ROC-анализа показали, что разграничительная способность (AUC) показателя выраженности диареи на 3-и сут ипритной интоксикации (срок с наибольшими значениями коэффициентов корреляции показателей выраженности диареи с вводимой дозой токсиканта и с показателями летальности) в отношении летального исхода составила 0,74 (95 % ДИ 0,68–0,81), что соответствует хорошему качеству модели и, соответственно, её хорошей прогностической способности (рис. 2). Кроме того, проведенные расчеты показали, что параметры чувствительности и специфичности для оцениваемого показателя в отношении летального исхода составили 0,92 (95 % ДИ 0,87–0,96) и 0,55 (95 % ДИ 0,45–0,64), соответственно.

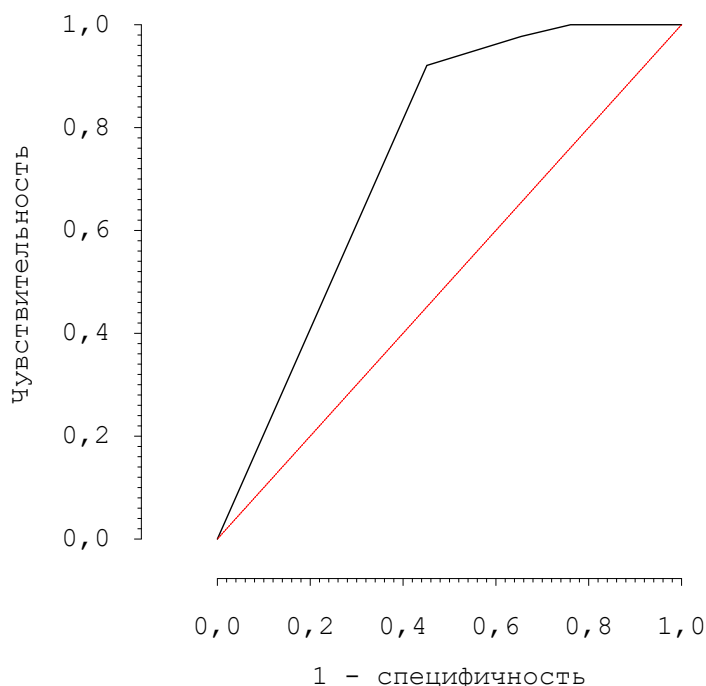


Рисунок 2. ROC-кривая показателя выраженности диареи у крыс на 3-и сут ипритной интоксикации

Заключение

Полученные результаты демонстрируют, что показатели выраженности диареи отражают динамику и тяжесть ипритной интоксикации у крыс. Наибольшие клинические проявления диареи наблюдали на пике интоксикации (3-и сут) во всем диапазоне летальных доз токсиканта. В исследованной выборке разграничительная способность (AUC) критерия выраженности диареи на 3-и сут в отношении летального исхода соответствует его хорошей прогностической способности. Параметры чувствительности и специфичности для оцениваемого параметра в отношении летального исхода составили 0,92 и 0,55, соответственно. Таким образом, критерий выраженности диареи может быть обоснованно включен в программу оценки эффективности разрабатываемых средств профилактики и терапии поражений ипритом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоусова Е.А., Никитина Н.В. Диарея: правильный алгоритм действий врача. *Медицинский совет*. 2017; 15: 130–139.
2. Белоусова Е.А., Златкина А.Р. Синдром диареи в практике гастроэнтеролога: патофизиология и дифференцированный подход к лечению. *Фарматека*. 2003; 10: 65–71.
3. Парфенов А.И. Четыре варианта патогенеза и терапии диареи. *Терапевтический архив*. 2015; 12: 5–12.
4. Ireland M.W. *The medical department of the United States Army in the world war. Volume XIV: Medical aspects of gas warfare*. Washington DC: Government Printing Office; 1926.
5. Noorbakhsh K., Balali-Mood M. Evaluation of gastrointestinal complications of sulfur mustard poisoning in Iranian combatants. *Med. J. Islam. Repub. Iran*. 1994; 7(4): 217–219.
6. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes*. Strasburg: Council of Europe; 1986.
7. Прозоровский В.Б. *Практическое пособие по ускоренному определению средних эффективных доз и концентраций биологически активных веществ*. Байкальск; 1994.
8. Гржибовский А.М. Доверительные интервалы для частот и долей. *Экология человека*. 2008; 5: 57–60.
9. Brown L., Cai T., DasGupta A. Interval Estimation for a Binomial Proportion. *Statist. Sci.* 2001; 16(2): 101–117.
10. Zweig M.H., Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* 1993; 39(4): 561–577.

References

1. Belousova E.A., Nikitina N.V. Diarrhea: the correct algorithm of the doctor's actions. *Meditinskiy sovet*. 2017; 15: 130–139 (in Russian).
2. Belousova E.A., Zlatkina A.R. Синдром диареи в практике гастроэнтеролога: патофизиология и дифференцированный подход к лечению. *Farmateka*. 2003; 10: 65–71 (in Russian).
3. Parfenov A.I. Four variants of the pathogenesis and therapy of diarrhea. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2015; 12: 5–12 (in Russian).
4. Ireland M.W. *The medical department of the United States Army in the world war. Volume XIV: Medical aspects of gas warfare*. Washington DC: Government Printing Office; 1926.
5. Noorbakhsh K., Balali-Mood M. Evaluation of gastrointestinal complications of sulfur mustard poisoning in Iranian combatants. *Med. J. Islam. Repub. Iran*. 1994; 7(4): 217–219.

6. *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes*. Strasburg: Council of Europe; 1986.
7. Prozorovskiy V.B. *A practical guide to the accelerated determination of average effective doses and concentrations of biologically active substances*. Baykal'sk; 1994 (in Russian).
8. Grzhibovskiy A.M. Confidence intervals for frequencies and fractions. *Ekologiya cheloveka*. 2008; 5: 57–60 (in Russian).
9. Brown L., Cai T., DasGupta A. Interval Estimation for a Binomial Proportion. *Statist. Sci.* 2001; 16(2): 101–117.
10. Zweig M.H., Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* 1993; 39(4): 561–577.