

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ АММИАКА ПРИ ИНГАЛЯЦИОННОМ ПОСТУПЛЕНИИ

Шаповалов И.Д., Гайдук С.В., Кузьмич В.Г., Ярошенко Д.М.

ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 194044, Санкт-Петербург

Резюме. При возникновении аварийных ситуаций на химически опасных объектах, на которых используют аммиак, происходит его поступление в окружающую среду с формированием очага химического поражения. Ингаляционное поступление аммиака приводит к формированию химического отёка лёгких. На сегодняшний день подходы к коррекции данного патологического состояния весьма ограничены. *Цель* исследования заключалась в разработке экспериментальной модели токсического отека легких при ингаляционной интоксикации крыс аммиаком. *Материалы и методы.* Моделировали статическую ингаляционную интоксикацию крыс аммиаком, полученного химическим путём. Рассчитывали среднюю летальную концентрацию (LC₅₀) аммиака (экспозиция – 30 мин). В различные сроки после воздействия определяли показатели витальных функций крыс, анализировали газовый состав артериальной крови, определяли величину легочного коэффициента. *Результаты исследования.* Установлено, что LC₅₀ аммиака для крыс составляет 35,8±6,4 г/м³ (экспозиция – 30 мин). В течение первых 24 ч после воздействия определили снижение частоты дыхания, частоты сердечных сокращений, SpO₂ у лабораторных животных по сравнению с контролем. Выявили выраженную гипоксемию, гиперкапнию и декомпенсированный респираторный ацидоз на фоне увеличения легочного коэффициента. *Заключение.* В качестве причины летального исхода крыс следует рассматривать выраженные нарушения структуры и функции дыхательной системы крыс вследствие манифестации токсического отёка лёгких, вызванного интоксикацией аммиаком. Данная экспериментальная модель может быть использована для оценки эффективности средств коррекции острой ингаляционной интоксикации аммиаком.

Ключевые слова: аммиак; ингаляционная интоксикация; токсический отек легких; легочной коэффициент; артериальная гипоксемия.

EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF ACUTE AMMONIA TOXICITY IN INHALATION INTAKE

Shapovalov I.D., Gaiduk S.V., Kuzmich V.G., Yaroshenko D.M.

S.M. Kirov Military medical academy of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 194044, St. Petersburg

Summary. In the event of emergencies at chemically hazardous facilities where ammonia is used, it enters the environment with the formation of a focus of chemical damage. Inhalation intake of ammonia leads to the formation of chemical pulmonary edema. To date, approaches to the correction of this pathological condition are very limited. The aim of the study was to develop an experimental model of toxic pulmonary edema during inhalation intoxication of rats with ammonia. *Materials and methods.* Static inhalation intoxication of rats with chemically obtained ammonia was modeled. The mean lethal concentration (LC50) of ammonia was calculated (exposure 30 min). At various times after exposure, indicators of the vital functions of rats were determined, the gas composition of arterial blood was analyzed, and the value of the pulmonary coefficient was determined. *Research results.* It was found that the LC50 of ammonia for rats is 35.8 ± 6.4 g/m³ (30 min exposure). During the first 24 hours after exposure, a decrease in respiratory rate, heart rate, SpO₂ was determined in laboratory animals compared to control. Severe hypoxemia, hypercapnia and decompensated respiratory acidosis were revealed against the background of an increase in the pulmonary coefficient. *Conclusion.* As the cause of the lethal outcome of rats, pronounced disorders in the structure and function of the respiratory system of rats due to the manifestation of toxic pulmonary edema caused by ammonia intoxication should be considered. This experimental model can be used to evaluate the effectiveness of the means of correcting acute inhalation ammonia intoxication.

Keywords: ammonia; inhalation intoxication; toxic pulmonary edema; lung coefficient; arterial hypoxemia.

Введение. По данным открытых источников, на территории России с 2002 по 2007 г. произошло 9 инцидентов, приведших к поступлению в окружающую среду более 6 тонн аммиака, в результате которых пострадали более 30 человек, 6 из которых погибли. Наиболее крупная авария по числу пострадавших произошла в ЮАР в 1973 г. на заводе по производству удобрений, когда при разгерметизации резервуара произошла утечка 38 тонн аммиака (погибло 18 человек, 65 человек были госпитализированы) [1, 2]. Поступление аммиака в атмосферу приводит к формированию очага химического поражения (нестойкого,

высоколетучего) раздражающе-прижигающего типа, поэтому места хранения, транспортировки и переработки аммиака могут становиться целью для совершения диверсий и террористических актов [3].

Для аммиака характерно несколько механизмов повреждающего действия. Поступая ингаляционно, аммиак растворяется в слизи на поверхности слизистых оболочек дыхательных путей с образованием гидроксида аммония, который, являясь сильной щелочью, приводит к локальному изменению pH и формированию колликвационного некроза тканей. В литературе описывают, что взаимодействие аммиака с водой на поверхности слизистой оболочки дыхательных путей, являясь экзотермической реакцией, приводит к термическому поражению ткани, однако вклад термического фактора в поражение легких в нашем эксперименте не оценивался [2, 4]. В результате нарушения мукоцилиарного клиренса на фоне повреждения слизистой оболочки, гидроксид аммония стекает в глубокие отделы дыхательных путей, вплоть до аэрогематического барьера, что еще больше усугубляет повреждение легких. Разрушение компонентов аэрогематического барьера приводит к выходу жидкости в альвеолярное пространство и манифестации токсического отека легких [5, 6].

На сегодняшний день для коррекции поражения легких, вызванного ингаляционной интоксикацией аммиаком, как и другими пульмонотоксикантами рекомендованы к применению глюкокортикостероиды, диуретики, а также проведение респираторной поддержки и эфферентная терапия. Другие перспективные средства патогенетической терапии, такие как антигипоксанты, не рассматриваются [7, 8, 9]. Для поиска средств этиотропной и патогенетической терапии отравления аммиаком необходимы адекватные экспериментальные модели на лабораторных животных.

Цель исследования. Разработать экспериментальную модель токсического отека легких у крыс, вызванного ингаляционной интоксикацией аммиаком.

Материалы и методы исследования. Экспериментальное исследование выполнено на белых беспородных крысах-самцах (n=60) с массой 160-210 грамм. В работе руководствовались требованиями нормативно-правовых актов о порядке экспериментальной работы с использованием животных, в том числе по гуманному отношению к ним [10]. Выведение животных из эксперимента осуществляли путём внутрибрюшинного введения раствора тилетамин+золазепам (Золетил 100, Virbak, Франция). Животных подразделили на группы: контроль и опытная (интоксикация аммиаком).

Аммиак получали химическим путём. Моделировали статическую ингаляционную интоксикацию крыс аммиаком в ингаляционной камере объёмом 0,1 м³. Экспозиция

составила 30 мин. Концентрацию аммиака в ингаляционной камере измеряли при помощи газоанализатора ГАНК (НПО «ГАНК», Россия).

Определяли среднюю летальную концентрацию (LC_{50}) аммиака по критерию 28-суточной выживаемости крыс. Непосредственно перед, через 1, 3, 24 и 48 ч после воздействия определяли частоту сердечных сокращений (ЧСС), частоту дыхательных движений (ЧДД) и SpO_2 при помощи прибора MouseOX (США). Через 1, 3, 24 и 48 ч осуществляли забор артериальной крови крыс (в месте бифуркации брюшной аорты), исследовали газовый состав артериальной крови (Abbot iSTAT (iSTATcorp., США)), при выведении животных из эксперимента рассчитывали легочной коэффициент (формула 1).

(1)

$$\text{Легочной коэффициент} = \frac{\text{масса лёгких, грамм}}{\text{масса крысы, грамм}} \times 1000, \text{отн. ед.}$$

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили при помощи программы Statistica 10.0. Описание данных, распределение которых было отличным от нормального, осуществляли при помощи медианы (Me), первого [Qн] и третьего [Qв] квартилей. Анализ независимых групп выполняли при помощи U-критерия Манна–Уитни. О статистической значимости различий между группами судили при уровне $p < 0,05$ [11].

Результаты исследования и обсуждение. Для определения LC_{50} аммиака была проведена серия экспериментов по ингаляционной интоксикации крыс аммиаком (215 г/м³, 107,6 г/м³, 53,8 г/м³ и 26,9 г/м³), экспозиция составила 30 мин. Методом пробит-анализа по Фини определили, что средняя летальная концентрация аммиака составила $35,8 \pm 6,4$ г/м³ (экспозиция – 30 мин). В дальнейших исследованиях животных подвергали статической ингаляционной интоксикации аммиаком (LC_{50}).

Через 1-2 мин после начала поступления аммиака в ингаляционную камеру определили выраженное раздражающее действие у животных (увеличение двигательной активности, отделение слизи, а затем обильного слизистого отделяемого из полости носа). В течение 48 ч наблюдения за животными определили частое поверхностное дыхание, хрипы, выслушиваемые дистанционно, обильное кровянистое отделяемое из носа. Данные проявления были связаны, в первую очередь, с развитием рефлекторной реакции дыхательных путей, сопровождающейся гиперпродукцией слизи, бронхоспазмом, а также с формированием колликовационного некроза слизистой оболочки дыхательных путей и компонентов аэрогематического барьера [2, 3]. В опытной группе на 28 сут летальность крыс составила 60 ± 16 %. Первые летальные исходы наблюдали через 3 часа после окончания

воздействия. В качестве причины летальных исходов у животных следует рассматривать острое гипоксическое повреждение вследствие нарастающего токсического отека легких.

Определили, что интоксикация крыс аммиаком приводила к снижению ($p < 0,05$) ЧСС, ЧДД и SpO_2 через 1, 3 и 24 ч после воздействия по сравнению с контролем. Через 48 ч после воздействия у выживших животных отмечали восстановление исследуемых показателей, при этом значимых различий с контролем не было (таблица 1). Снижение ЧСС и ЧДД, особенно выраженное через 1 и 3 ч после воздействия может быть обусловлено защитными рефлексамии вследствие раздражения нервных окончаний обонятельного, тройничного и языкоглоточного (рефлекс Кречмера) и блуждающего (рефлекс Геринга-Брейера) нервов. Снижение SpO_2 может быть обусловлено как нарушением газообмена вследствие прямого повреждения компонентов аэрогематического барьера, так и в результате рефлекторного снижения ЧДД [4].

Таблица 1. Показатели витальных функций крыс в различные сроки после окончания воздействия аммиака (LC_{50}), Ме [Qн; Qв]

Группа	Показатели витальных функций		
	ЧСС, $\times \text{мин}^{-1}$	ЧДД, $\times \text{мин}^{-1}$	SpO_2 , %
Контроль	421 [384;462]	91 [86; 95]	94,3 [93,1; 95,1]
Интоксикация 1 (1 ч)	281 [351; 324]*	59 [54; 66]*	92,7 [90,4; 93,7]
Интоксикация 2 (3 ч)	273 [213; 336]*	53 [52; 64]*	83,6 [83,3; 84,1]*
Интоксикация 3 (24 ч)	310 [294; 322]*	70 [64; 76]*	90,8 [80,5; 91,4]*
Интоксикация 4 (48 ч)	399 [315; 445]	91 [78; 104]	94,6 [91,7; 95,3]
Примечания: * - различия значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$; в каждой группе $n = 6$			

Животных выводили из эксперимента через 1, 3, 24 и 48 ч после воздействия, выполнили анализ газового состава артериальной крови, определили величину легочного коэффициента.

При анализе газового состава артериальной крови определили увеличение ($p < 0,05$) $PaCO_2$ и снижение PaO_2 ($p < 0,05$) через 1, 3 и 24 ч после воздействия. Нарастание содержания диоксида углерода в крови приводило к формированию декомпенсированного

респираторного ацидоза на фоне метаболического алкалоза. Нормализацию показателей газового состава артериальной крови отмечали через 48 ч после окончания воздействия (таблица 2).

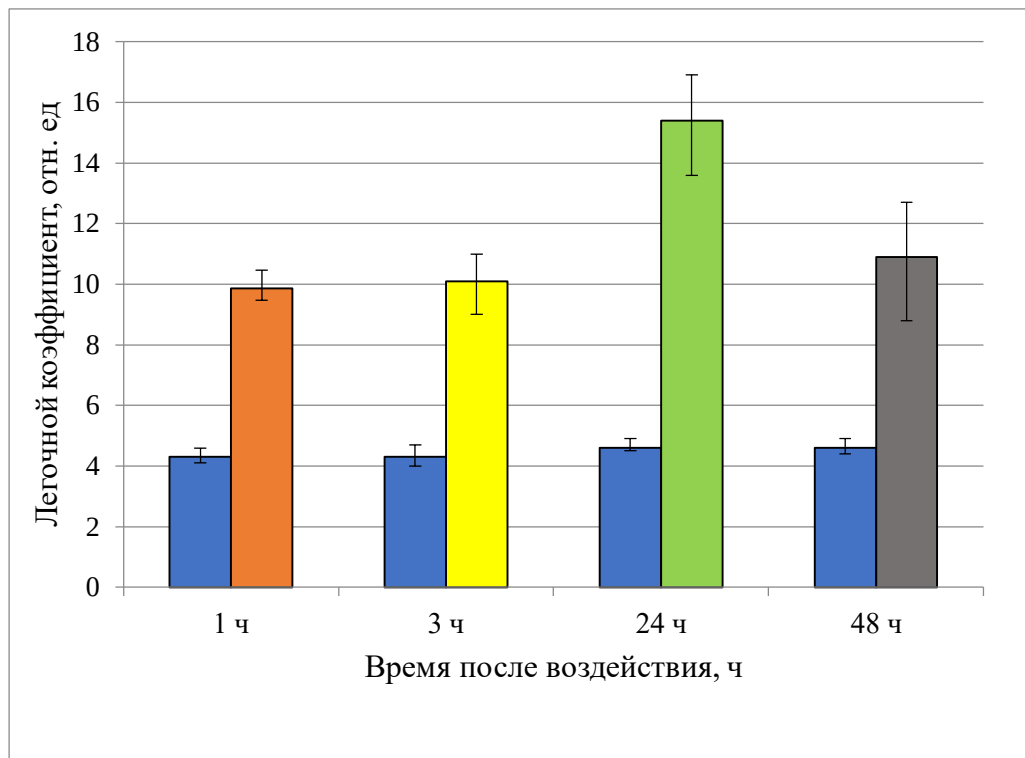
Выявленные изменения (гипоксемия и гиперкапния) вызваны нарушением транспорта кислорода и диоксида углерода через аэрогематический барьер, что может быть связано с выходом жидкости из системного кровотока в интерстиций и увеличению толщины барьера [3, 6].

Таблица 2. Изменения газового состава артериальной крови крыс в различные сроки после окончания воздействия аммиака (LC_{50}), Me[Qн;Qв]

Группа	Биохимические показатели				
	pH	PaCO ₂ , мм рт.ст.	PaO ₂ , мм рт.ст.	BE _{ect} , мМ/л	HCO ₃ ⁻ , мМ/л
Контроль	7,39 [7,38;7,41]	48,9 [46,4;51,5]	90 [89; 90]	5 [4;6]	29,8 [29,1;30,6]
Инттоксикация 1 (1 ч)	7,33 [7,31;7,35]*	63,1 [60,1; 64,7]*	60 [58; 62]*	7 [6;8]	33,5 [33,1;33,9]*
Инттоксикация 2 (3 ч)	7,33 [7,32;7,34]*	63,7 [61,2; 65,8]*	57,5 [56; 59]*	7 [5,5;8,5]	31,6 [30,9;32,1]*
Инттоксикация 3 (24 ч)	7,28 [7,25;7,3]*	61,4 [67,1; 64,3]*	49,5 [48; 51]*	14 [13;15]*	41,4 [40,1;42,2]*
Инттоксикация 4 (48 ч)	7,3 [7,33;7,42]	53,5 [50,6; 56,1]	75 [72; 78]	6 [5;7]	31,4 [29,9;2,6]
Примечания: * - различия значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$; в каждой группе $n = 6$					

Таким образом, было выявлено, что инттоксикация крыс аммиаком (LC_{50}) приводила к нарушению целостности аэрогематического барьера вследствие химического (колликвационного) воздействия [2], что способствовало формированию выраженной гипоксии и гиперкапнии в течение 1 сут после воздействия. На 2 сут после воздействия отмечали частичную нормализацию состояния животных (ЧСС, ЧДД, SpO₂) и компенсацию нарушений транспорта газов через аэрогематический барьер (PaO₂, PaCO₂).

Рисунок 1. Динамика ЛК крыс в различные сроки после окончания воздействия аммиака, Ме [Qн; Qв]

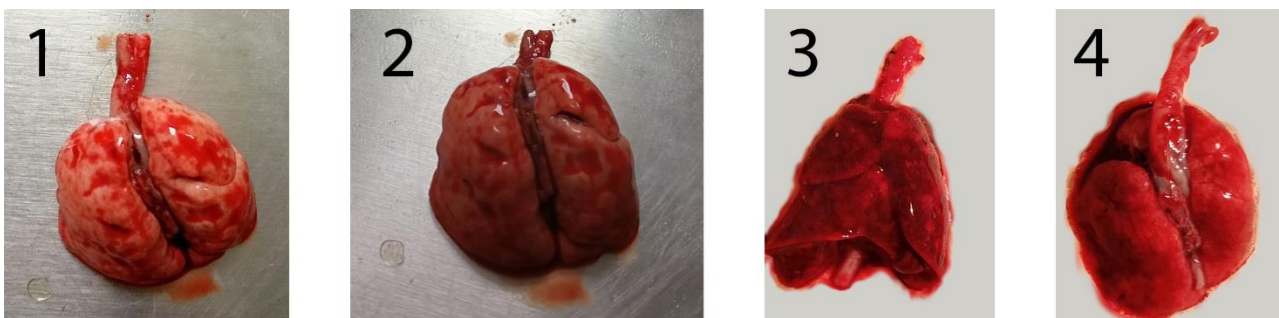


Примечания: синим прямоугольником изображены группы контроль 1, 2, 3 и 4;

* – различия значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$; в каждой группе $n = 6$

Так, при определении легочного коэффициента выявили его увеличение уже через 1 ч после воздействия. При этом легочной коэффициент был выше ($p < 0,05$) у животных группы контроль через 3 и 24 ч после воздействия. Через 48 ч после воздействия отметили снижением легочного коэффициента. (рисунок 1).

Рисунок 2. Макропрепараты легких крыс в различные сроки после окончания воздействия аммиака.



Примечания: 1- 1 ч, 2- 3 ч, 3- 24 ч, 4- 48 ч.

Макроскопическая картина легких на различных сроках после интоксикации так же соответствовала изменениям легочного коэффициента и других показателей. Через 1 ч после воздействия в легких отмечается полнокровие сосудов, геморрагический выпот в плевральных полостях, данные изменения нарастают к периоду в 3 ч. Через 24 ч наблюдались наиболее выраженные изменения в легочной паренхиме- появляются очаги кровоизлияний, некроза, уплотнения легочной ткани, которые несколько регрессируют на 48 ч после воздействия.

Заключение.

В ходе проведенного экспериментального исследования была разработана экспериментальная модель острой ингаляционной интоксикации крыс аммиаком. Выявили, что воздействие аммиака (LC₅₀) приводит к нарушению структуры и функции дыхательной системы крыс вплоть до формирования токсического отека лёгких. Выявлено, что наиболее выраженные изменения формируются в первые 24 ч после воздействия. Таким образом, при остром ингаляционном воздействии аммиака первые сут следует рассматривать как наиболее критический постинтоксикационный период. В качестве причины летального исхода крыс следует рассматривать выраженные нарушения структуры и функции дыхательной системы крыс вследствие манифестации токсического отека лёгких. Данная экспериментальная модель может быть использована для оценки эффективности средств коррекции острой ингаляционной интоксикации аммиаком.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Саламе М.Б., Еремина М.В. Медико-статистический анализ отравлений аммиаком. *Успехи современного естествознания*. 2011;8:132.
2. Акимов А.Г., Халимов Ю.Ш., Шилов В.В. Острые производственные отравления хлором и аммиаком: клиника, диагностика, лечение. Современные представления. *Экология человека*. 2012;6:25-36.
3. Башарин В.А., Чепур С.В., Толкач П.Г. и др. *Токсикология пульмоотоксикантов*. Санкт-Петербург: ООО «Издательство "Левша. Санкт-Петербург"», 2021.
4. Губеева Е.Г., Спиридонов С.В., Зубкова А.Н. Некоторые диагностические критерии отравления парами аммиака. *Медицинская экспертиза и право*. 2011;3:22-24.
5. Торкунов, П.А., Шабанов П.Д. Токсический отек легких: патогенез, моделирование, методология изучения. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2008;6(2): 3-54.

6. Корнякова В.В. Ашвиц И.В. *Токсичные химические вещества цитотоксического и пульмонотоксического действия*. Омск : Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации; 2015.
7. Чепур С.В., Чубарь О.В., Халимов Ю.Ш. и др. *Методические рекомендации по терапии дыхательной недостаточности у пораженных отравляющими и высокотоксичными веществами на этапах медицинской эвакуации*. Санкт-Петербург: Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Министерства обороны РФ; 2016.
8. Башарин В.А., Чепур С.В., Щёголев А.В. Роль и место респираторной поддержки в схемах терапии острого легочного отека, вызванного ингаляционным воздействием токсичных веществ. *Военно-медицинский журнал*. 2019; 340 (11): 26-32.
9. Простакишин Г.П., Гольдфарб Ю.С., Остапенко Ю.Н. и др. *Экстренная медицинская помощь при ингаляционных поражениях токсичными веществами: Учебное пособие для врачей*. Москва: ФГБУ ВЦМК «Защита», 2017.
10. *Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными*. Санкт-Петербург: Rus-LASA, 2012.
11. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. Санкт-Петербург: Практика; 1998.

References

1. Salame M.B., Eremina M.V. Medico-statistical analysis of ammonia poisoning. *Successes of modern natural science*. 2011;8:132.
2. Akimov A.G., Khalimov Yu.Sh., Shilov V.V. Acute industrial poisoning with chlorine and ammonia: clinic, diagnosis, treatment. *Modern ideas. Human ecology*. 2012;6:25-36.
3. Basharin V.A., Chepur S.V., Tolkach P.G. and other *Toxicology of pulmonotoxicants*. St. Petersburg: LLC Publishing House "Levsha. St. Petersburg", 2021.
4. Gubeeva E.G., Spiridonov S.V., Zubkova A.N. Some diagnostic criteria for ammonia vapor poisoning. *Medical expertise and law*. 2011;3:22-24.
5. Torkunov, P.A., Shabanov P.D. Toxic pulmonary edema: pathogenesis, modeling, research methodology. *Reviews of clinical pharmacology and drug therapy*. 2008;6(2): 3-54.

6. Kornyakova V.V. Ashvits I.V. Toxic chemicals with cytotoxic and pulmonotoxic effects. Omsk: State budgetary educational institution of higher professional education "Omsk State Medical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation; 2015.
7. Chepur S.V., Chubar O.V., Khalimov Yu.Sh. Guidelines for the treatment of respiratory failure in those affected by poisonous and highly toxic substances at the stages of medical evacuation. St. Petersburg: State Research and Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation; 2016.
8. Basharin V.A., Chepur S.V., Shchegolev A.V. The role and place of respiratory support in the treatment regimens for acute pulmonary edema caused by inhalation exposure to toxic substances. Military Medical Journal. 2019; 340(11): 26-32.
9. Prostakishin G.P., Goldfarb Yu.S., Ostapenko Yu.N. et al. Emergency medical care for inhalation injuries by toxic substances: A textbook for doctors. Moscow: FGBU VTsMK "Protection", 2017.
10. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of the European Union on the protection of animals used for scientific purposes NP association of professionals working with laboratory animals. St. Petersburg: Rus-LASA, 2012.
11. Glantz S. Medico-biological statistics. St. Petersburg: Practice; 1998.