

Министерство здравоохранения Российской Федерации
(Минздрав России)

**Федеральное медико-биологическое агентство
(ФМБА России)**

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации
Группа 21. Нормы и правила научных исследований в здравоохранении

**Моделирование интоксикаций депримирующими агентами
и оценка выраженности депримирующего эффекта**

Методические рекомендации

МР ФМБА России 21.10 - 13

Москва 2013

Предисловие

1. Разработаны Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГУН ИТ ФМБА России).

Директор – д.м.н. Е.Ю. Бонитенко.

Заместитель директора по научной работе – д.м.н. М.Б. Иванов.

2. Исполнители:

заведующий лабораторией, д.м.н., профессор А.Н. Петров,

ведущий научный сотрудник, к.м.н. Н.В. Лапина;

научный сотрудник, д.м.н. В.А. Башарин,

научный сотрудник к.м.н. Н.В. Макарова.

3. В настоящем документе реализованы требования Законов Российской Федерации:

– от 22 июля 1998 г. № 86-ФЗ «О лекарственных средствах»;

– от 22 июля 1993 г. № 5487-1 «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» (с изменениями, внесенными Указом Президента Российской Федерации от 24 декабря 1993 г. № 2288);

– от 30 марта 1999 г. №52-ФЗ. «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»;

– от 21 декабря 1994 г. № 68-ФЗ «О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера»;

– от 31 мая 2001 г. № 73-ФЗ «О государственной судебно-экспертной деятельности в Российской Федерации»

4. Утверждены и введены в действие Федеральным медико-биологическим агентством «15» февраля 2013 г.

5. Введены впервые.

Содержание

| | |
|---|----|
| Предисловие | 2 |
| Введение | 4 |
| 1 Область применения | 6 |
| 2 Нормативные ссылки | 7 |
| 3 Обозначения и сокращения | 8 |
| 4 Основные положения | 8 |
| 4.1 Краткая характеристика депримирующих агентов | 8 |
| 4.2 Общие подходы к созданию экспериментальных моделей отравлений депримирующими агентами | 10 |
| 4.2.1 Экспериментальные животные | 11 |
| 4.2.2 Алгоритм моделирования интоксикаций и подходы к оценке степени депримации | 12 |
| 4.2.3 Оценка неврологического статуса и вегетативных показателей | 12 |
| 4.3 Экспериментальные модели отравлений некоторыми депримирующими агентами | 12 |
| 4.3.1 Этанол | 12 |
| 4.3.2 Тиопенталом натрия | 13 |
| 4.3.3 Оксипутират натрия | 13 |
| 4.3.4 1,4-Бутандиол | 14 |
| Библиография | 15 |

Введение

Среди огромного количества веществ, обладающих нейротропной активностью, пристальный интерес специалистов различных областей медицины и биологии в аспекте прикладных и фундаментальных исследований вызывают соединения, способные угнетать функции ЦНС и особенно сознание [1].

Формирование комы как одного из типовых патологических состояний при тяжелых отравлениях сопровождается целым каскадом нарушений на различных уровнях организма (системном, органном, клеточном и субклеточном). Токсическая кома рассматривается как проявление церебральной недостаточности – состояние, которое сопровождается глубокой дисфункцией центральной нервной системы и, в конечном итоге, срывом центральной регуляции систем жизнеобеспечения (сердечно-сосудистой, дыхательной, терморегуляции) [2, 3]. Несвоевременное проведение лечебных мероприятий приводит к утяжелению состояния пострадавших с развитием выраженных нарушений витальных функций, развитию ранних осложнений и отдаленных последствий [4]. Очевидно, что по мере накопления знаний о патогенезе токсической комы будут совершенствоваться как методы профилактики и диагностики, так и терапии состояний сопровождающихся угнетением сознания. Этому в значительной мере способствуют экспериментальные исследования на животных.

На сегодняшний день отсутствие адекватных моделей токсической комы и системных методических подходов к оценке депримирующих эффектов в эксперименте в значительной степени ограничивают изучение этого угрожающего жизни состояния и не позволяют адекватно проводить доклинические исследования по сравнительной эффективности средств фармакологической коррекции острой химической патологии, сопровождающейся угнетением функций ЦНС [5].

Необходимость проведения исследований, направленных на создание экспериментальных моделей с возможностью оценки депримирующих эффектов токсикантов была и остается актуальной проблемой, что обусловлено необходимостью разработки качественно новых подходов к моделированию для изучения депримирующих эффектов, вызываемых различными ксенобиотиками и адекватных путей к экстраполяции экспериментальных данных с животных на человека [6].

В рамках решения вышеуказанных проблем сотрудниками Института разработана классификация депримирующих агентов на основании лидирующего патогенетического механизма действия (рисунок 1):

| |
|--|
| <p>А. Вещества с первичным депримирующим действием (нарушающие генерацию, проведение и передачу нервного импульса в ЦНС)</p> <p>I. Вещества с неспецифическим мембранотропным действием (неэлектролиты, галогенизированные углеводороды, эфиры, алифатические углеводороды и др.);</p> <p>II. Вещества, нарушающие передачу нервного импульса путем влияния на нейромедиаторные системы головного мозга (агонисты тормозных и антагонисты возбуждающих нейромедиаторов)</p> <p>2.1. Агонисты ГАМК-ергических систем (ГОМК, бензодиазепины, барбитураты, 1,4-бутандиол и др.);</p> <p>2.2. Агонисты опиоидной системы (опиаты и опиоиды);</p> <p>2.3. Антагонисты глутаматергической системы (канальные блокаторы NMDA-рецепторов – фенциклидин (PCP), калипсол, МК-801 и др.);</p> <p>2.4. Антагонисты холинергической системы (центральные холинолитики)</p> <p>2.5. Антагонисты H1-гистаминовых рецепторов (антигистаминные препараты)</p> <p>2.6. Смешанные агонисты-антагонисты, влияющие на одну или несколько медиаторных систем (нейролептики фенотиазинового ряда, атипичные нейролептики, антидепрессанты, клофелин и др.).</p> <p>Б. Вещества с вторичным депримирующим действием.</p> <p>I. Вещества, вызывающие гипоксию головного мозга.</p> <p>1.1. Вещества вызывающие гипоксическую гипоксию (СО₂, метан, инертные газы);</p> <p>1.2. Агенты, вызывающие гемическую гипоксию (СО, метгемоглобинообразователи и др.).</p> <p>1.3. Вещества, вызывающие циркуляторную гипоксию (яды, вызывающие экзотоксический и кардиогенный шок, резкие нарушения церебральной гемодинамик)</p> <p>II. Вещества, нарушающие энергетический баланс и метаболические процессы в ЦНС.</p> <p>2.1. Агенты, вызывающие гипогликемию (пероральные антидиабетические средства, инсулин)</p> <p>2.2. Вещества, подавляющие активность ферментов, метаболические циклы – гликолиз, цикл Кребса (соединения металлов, моноиодацетат, фторацетат и др.).</p> <p>2.3. Вещества, нарушающие транспортные функции цепи переноса электронов в митохондриях и синтез АТФ (цианиды, сероводород, амитал, ДДТ и др.).</p> <p>III. Агонисты возбуждающих и антагонисты тормозных нейромедиаторных систем головного мозга (ингибиторы АХЭ, ГАМК-литики и другие конвульсанты).</p> <p>IV. Вещества, вызывающие резкие сдвиги КОС крови (салицилаты, метанол, эфиры этиленгликоля).</p> <p>V. Прочие агенты со вторичным депримирующим действием (некоторые растительные, животные яды и т.д.).</p> |
|--|

Рисунок 1 – Классификация веществ депримирующего действия

На основании созданной классификации разделяющей агенты на первично и вторично депримирующие, а также на массиве экспериментальных данных выделены группы соединений, для которых возможно моделирование депримирующих эффектов в экспериментах на животных. При использовании подобного алгоритма выявлено, что при введении животным целого ряда химических соединений не удастся создать адекватную модель токсической комы. Фентанил, морфин, дихлорэтан, карбофос, азалептин, атропин, этиленгликоль, нитрит натрия и нитробензол, 1,1-диметилгидразин не могут рассматриваться как самостоятельные средства для моделирования коматозных состояний у животных. Так, например, при внутрижелудочном введении в среднетельных дозах дихлорэтана и трихлорэтилена, предварительно растворенных в растительном масле, состояние токсической комы у животных не развивалось, а угнетение функций ЦНС соответствовало оглушению или сопору. Введение фентанила в среднетельной дозе приводило к развитию достаточно длительной катаlepsии, но не комы.

В связи с этим была разработана балльная оценка состояния животных, на основе которой при интоксикации депримирующими ядами в широком диапазоне доз от 0,5 до 1,5 ЛД₅₀ выделены критерии для 6 состояний: 1) физиологическая норма, 2) оглушение, 3) сопор, 4) кома умеренная, 5) кома глубокая, 6) кома запредельная.

Анализ экспериментальных данных позволил определить критерии оценки глубины угнетения функции центральной нервной системы с оценкой тяжести состояния. На основе обработки полученных результатов разработана шкала балльной оценки неврологического статуса с расчетом индекса тяжести угнетения нервной системы (ИТНН). Для оценки тяжести состояния животных при отравлениях депримирующими агентами созданы математические модели расчета индекса глубины комы (ИГК) с возможностью прогноза исходов острых отравлений.

В методических рекомендациях, представлен воспроизводимый алгоритм разработки экспериментальных моделей отравлений депримирующими веществами, а также подходы к оценке депримирующих эффектов, основанные на оценке клинической картины интоксикации, неврологических и физиологических показателях; подробно описаны экспериментальные модели для оценки степени депримации для этанола, тиопентала натрия, оксибутирата натрия и 1,4-бутандиола.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель руководителя
Федерального медико-биологического
агентства

_____ Е.Ю. Хавкина

« _____ » _____ 2012 г.

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации
Группа 21. Нормы и правила научных исследований в здравоохранении

**Моделирование интоксикаций депримирующими агентами
и оценке выраженности депримирующего эффекта**

Методические рекомендации

ФМБА России 21.10-13

1. Область применения

Моделирование в эксперименте отравлений сопровождающихся угнетением функций центральной и поиск средств коррекции этих состояний..

В методических рекомендациях обобщен опыт экспериментальных исследований ведущих токсикологов в области моделирования тяжелых отравлений группой химических веществ приводящих к тяжелому угнетению сознания.

Методические рекомендации предназначены для токсикологов, фармакологов, физиологов, а других специалистов, интересующихся вопросами нейрофизиологии, нейротоксикологии и совершенствованием подходов к терапии тяжелых отравлений, сопровождающихся угнетением функций центральной нервной системы.

2. Нормативные ссылки

В настоящем документе использованы ссылки на нормативные документы:

- Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. 3 708н «Об утверждении правил лабораторной практики»;
- ГОСТ 53434—2009 от 02.12.2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»;
- Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP) РД 64-126-91. – М. 1992. – С. 1-65. (Введены в действие приказом Министерства промышленности СССР от 17 мая 1991 г. № 154);
- «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», М., Медицина, 2005, 832 с.

3. Обозначения и сокращения

- АР – аудиомоторная реакция
- БР – тактильно-болевая чувствительность
- ГР – глоточный рефлекс
- ЗР – зрачковый рефлекс
- ИТНН – индекс тяжести угнетения нервной системы
- ИГК – индекс глубины комы
- КР – корнеальный рефлекс
- МОР – мидриаз и отсутствие зрачкового рефлекса
- ПЖ – поведение животных
- ПР – поисковая реакция на открытом пространстве
- РО – реакция на обонятельный (пищевой) раздражитель
- РП – рефлекс переворачивания
- РС – рефлекс сгибания задних конечностей
- РХР – рефлекс хватания за решетку
- СА – судорожная активность
- СЗ – состояние зрачков
- СПП – суммационно-пороговый показатель
- ТГС – тестирование равновесия на горизонтальном стержне
- ТМ – тонус мышц
- ТРНП – тестирование равновесия на наклонной поверхности
- ЦНС – центральная нервная система
- ЧД – частота дыхания
- ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭКГ – электрокардиограмма

4. Основные положения

4.1. Краткая характеристика депримирующих веществ

Термины «депримация», «депримирующее действие» происходят от латинского «deprimo» – подавлять, усмирять, придавливать. Указанный термин наиболее часто используется для характеристики угнетения функций ЦНС, прежде всего сознания, под влиянием химических агентов.

Практически все острые тяжелые (крайне тяжелые) отравления ядами на тех или иных стадиях патогенеза интоксикации сопровождаются выраженным угнетением деятельности ЦНС, подавлением ее интегративных и регулирующих функций.

В основе развития клинических проявлений со стороны ЦНС при отравлениях химическими агентами могут задействоваться разные механизмы как специфического, так и неспецифического характера (типичные патологические процессы), носящие вторичный характер и способствующие возникновению, поддержанию и даже углублению депримации. Депримирующие эффекты соединений, связанные с развитием гипоксии, снижением энергообеспечения нейронов, нарушением электролитного баланса и микроциркуляции, а также дисбаланса в нейромедиаторных системах ЦНС, являются вторичными.

Исходя из этих положений, термином «депримирующие агенты» обозначаются химические соединения, обладающие способностью первично угнетать функции ЦНС путем влияния на механизмы генерации, проведения и передачи нервного импульса [7].

4.2. Общие подходы к созданию экспериментальных моделей отравлений депримирующими агентами

4.2.1. Экспериментальные животные

Моделирование выполняют на белых крысах-самцах массой 180-220 г.

Выбор животных для моделирования определяется следующими обстоятельствами: крысы являются стандартным объектом в биологических исследованиях; этот вид животных используется для изучения физиологии высшей нервной деятельности, а также в фармакологии для изучения психофармакологических препаратов и в токсикологии для моделирования нейротоксических эффектов.

Карантин. Перед проведением эксперимента животные находятся под наблюдением (в карантине). Длительность карантина (акклиматизационного периода) для животных составляет 14 дней. В течение карантина проводят ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдают в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования проводят неврологическое тестирование животных и оценку вегетативных показателей. Крысы, отвечающие критериям (здоровые) включе-

ния в эксперимент, распределяют на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, исключают из исследования в течение карантина.

Нормальные величины вегетативных показателей представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Нормальные величины вегетативных показателей у белых беспородных крыс-самцов

| Показатель | Среднее значение | 95 % доверительный интервал истинного среднего значения | Границы возможных значений показателя | Количество животных |
|---------------------------------|------------------|---|---------------------------------------|---------------------|
| | | $M=x \pm t_{95} * m_x$ | $X=x \pm t_{95} * S_x$ | |
| Температура, °С | 37,4 | 37,3–37,5 | 35,8–38,9 | 217 |
| ЧД, мин ⁻¹ | 115 | 111–119 | 62–168 | 199 |
| АД _{сист.} , мм.рт.ст. | 118,9 | 115,8–121,9 | 77,4–160,4 | 182 |
| ЧСС, в мин ⁻¹ | 523 | 517–530 | 444–603 | 157 |

Содержание животных соответствует руководящим документам.

Кормление осуществляют ad libitum в первой половине дня.

За сутки до начала введения токсикантов животных не кормят. Перед исследованием животных маркируют (раствором пикриновой кислоты или другими способами).

4.2.2 Алгоритм моделирования интоксикаций и подходы к оценке степени депримиции

Схема создания моделей интоксикации депримирующими агентами и подходы к оценке степени угнетения функций центральной системы представлены на рисунке 2.

На первом этапе определяют среднелетальные дозы для исследуемого вещества с использованием различных методов. Пути введения токсикантов могут быть любыми. Однако для моделирования интоксикаций депримирующими агентами целесообразно выбирать внутрибрюшинный путь введения. Это позволяет стандартизировать схему введения и уменьшить разброс клинических проявлений интоксикации.

Введение модельных препаратов в среднелетальной дозе позволяет смоделировать клинику крайне тяжелой степени интоксикации. Если у животных развивается токсическая кома, то в дальнейшем изучают проявления интоксикации в широком диапазоне доз от 0,5 до 1,5 ЛД₅₀ (в зависимости от клиники отравления), что позволяет моделировать различные по тяжести состояния угнетения центральной нервной системы от оглушения до терминальной комы.



Рисунок 2 – Алгоритм создания экспериментальной модели интоксикации депримирующими агентами

При этом проводится неврологическое тестирование и оценка вегетативных показателей подробно описанные в разделе 4.2.3.. Показатели оценивают в динамике через 30 мин, 1, 2, 3, 6, 8, 12 и 24 ч. Возможно оценка состояния животных и в другие интервалы времени после введения токсиканта. В эксперименте при отравлениях токсикантами, как правило, не удается создать кому длительностью более 1 сут, хотя в отдельных сериях экспериментов состояние отдельных животных оценивается как токсическая кома к концу 1 сут.. Наблюдение за выжившими животными продолжается в течение 2-х недель.

У животных оценивают выраженность угнетения функционирования ЦНС (оглушение – сопор – кома), используя показатели неврологического тестирования и витальных функций, выставляют экспертную оценку, которая используется при проведении статистического анализа данных (таблица 2).

Таблица 2 - Балльная оценка депримирующего действия химических веществ в эксперименте

| Состояние животного | Экспертная оценка в баллах |
|----------------------------------|----------------------------|
| Норма | 1 |
| Оглушение | 2 |
| Сопор | 3 |
| Кома умеренная (поверхностная) | 4 |
| Кома глубокая | 5 |
| Кома запредельная (терминальная) | 6 |

Подобное разделение депримирующих эффектов в целом соответствует выделяемым в клинике состояниям у человека. Разделение оглушения на умеренную и глубокую степень в эксперименте на лабораторных животных невозможно, т.к. в клинической практике оно основано на нарушениях речи.

Для состояния, которое оценивается как «оглушение», характерно: снижение двигательной активности, положение животного на животе или на боку, снижение поисковой реакции при переносе из клетки на открытую поверхность, сохранение или замедление рефлекса переворачивания, атаксия, координированная защитная реакция на боль, выраженный рефлекс сгибания конечности. Животное точно локализует место раздражения, реакция на пищевой раздражитель снижена, аудиомоторная реакция сохранена.

При «сопоре» – животное лежит в клетке, при взятии на руки возможны нецеленаправленные движения, в основном отмечаются гипотония мышц (наличие гипертонуса или гипотонии связано с особенностями действия токсиканта), при нанесении болевых раздражений возникают направленные на их устранение координированные защитные движения с поворотом туловища в сторону раздражения, аудиомоторная реакция в основном сохранена, регистрируются корнеальные, глоточные и зрачковые рефлексы. В случае развития у животных миоза выявление зрачкового рефлекса затруднено.

Для «поверхностной комы» характерно боковое положение животного или положение на животе, отсутствие двигательной активности при взятии на руки, снижение тонуса мышц (атония) и болевой реакции на сжатие лапы или хвоста, сохранение корнеального рефлекса и снижение глоточного рефлекса. Отмечается урежение частоты дыхательных движений.

«Глубокая кома» характеризуется отсутствием роговичного рефлекса, болевой чувствительности и рефлекса сгибания конечностей, снижением или отсутствием глоточного рефлекса, выраженным уменьшением частоты дыхательных движений и частоты сердечных сокращений.

Проявлениями «терминальной (запредельной) комы» являются отсутствие всех исследуемых рефлексов, возможно развитие мидриаза, замедление или отсутствие реакции зрачков на свет, резко выраженные нарушения витальных функций (расстройства ритма и часто-

ты дыхания или апноэ, патологическое дыхание, снижение частоты сердечных сокращений и аритмии).

Полученные данные обрабатывают статистическими методами, что позволяет выявить наиболее значимые неврологические и вегетативные показатели, которые могут быть включены в модель, достоверно описывающую состояние отравленных животных.

Так как данные неврологических тестов и экспертная оценка являются дискретными порядковыми показателями, поэтому на первом этапе вычисляют таблицы сопряженности экспертной оценки со всеми данными тестов, получают оценки однородности таблиц с помощью критерия χ^2 Пирсона, вычисляют ранговые корреляции γ (гамма). Коэффициент γ выбирают, так как при небольшой вариабельности экспертных оценок и неврологических показателей в выборке, присутствует много повторяющихся пар значений и при их обработке наиболее корректно использовать статистику γ .

На следующем этапе разрабатывают решающие правила (модели), которые позволили, используя некоторые неврологические показатели и показатели витальных функций, точно описать состояние отравленного экспериментального животного как в указанные сроки наблюдения, так и в любое время острого отравления.

Способы получения решающих правил могут быть различными (дискриминантный анализ, регрессионный анализ, построение деревьев классификации и т.д.). Соответственно и вид решающих правил при этом получается различным. При использовании деревьев классификации можно получить последовательную процедуру для принятия решения: количество необходимых для классификации наблюдения показателей может варьироваться в зависимости от их значений. Если применить дискриминантный анализ для формирования решающего правила, то набор необходимых переменных будет заранее известен и фиксирован, а решение будет приниматься одновременно по значениям дискриминантных функций.

На основании полученных результатов неврологического тестирования в различные сроки интоксикации методом пошагового регрессионного анализа разрабатывается шкала балльной оценки неврологического статуса с расчетом индекса тяжести угнетения нервной системы (ИТНН). Этот показатель представляет собой сумму баллов неврологических показателей, входящих в математическую модель, и позволяет оценить неврологический статус конкретного животного на любой момент исследования в течение 1 сут интоксикации. Кроме того, мониторинг неврологических показателей и расчет ИТНН позволяют оценить состояние животного в динамике. Полученные результаты в баллах позволяют комплексно оценить неврологический статус отравленных животных и отнести его к одному из следующих состояний: физиологической норме, оглушению, сопору или коме (умеренной, глубокой, предельной).

Разработанные математические уравнения в зависимости от вида токсиканта включают в себя различный перечень неврологических показателей. Значимость каждого из признаков определяется коэффициентом. При этом необходимо, чтобы точность диагностики состояний для исследованных веществ составила более 75%, что является достаточно высоким прогностическим показателем.

Токсическая кома сопровождается нарушением витальных функций, а они, как правило, и определяют исход острого отравления. Для оценки тяжести животных учитывают не только неврологические показатели, но и степень нарушений жизненно важных систем: сердечно-сосудистой, дыхательной, терморегуляции и др. Методы оценки витальных функций у экспериментальных животных достаточно хорошо разработаны. Высокоинформативные и простые в выполнении они могут быть широко использованы в системах балльной оценки тяжести состояний у животных в эксперименте. Для разработки критериев оценки тяжести состояния животных при отравлениях депримирующими агентами данные неврологического тестирования и показатели витальных функций подвергают статистическому анализу. Для создания математической модели расчета индекса глубины комы (ИГК) используются различные методы статистического анализа (регрессионный, алгоритм последовательного принятия решений, построения решающих правил с ветвлением и др.).

Для создания и математического обоснования прогноза исходов отравлений (выживет животное или погибнет) используют дискриминантный анализ. В результате анализа рассчитывают линейные дискриминантные функции, которые позволяют прогнозировать вероятность гибели животных при остром отравлении депримирующими агентами в течение первых суток.

Таким образом, используя указанный выше алгоритм выявления депримирующего действия химических соединений, возможно экспериментально моделировать отравления депримирующими агентами и проводить на основании разработанных математических моделей оценку состояния экспериментальных животных. Однако, следует помнить, что при введении животным целого ряда химических соединений не удастся создать адекватную экспериментальную модель токсической комы. Эти вещества, способные вызвать у человека угнетение сознания от оглушения до комы, при введении животным не позволяют смоделировать весь диапазон депримирующих эффектов. Так, в частности, фентанил, морфин, дихлорэтан, карбофос, азалептин, атропин, этиленгликоль, нитрит натрия и нитробензол, 1,1-диметилгидразин не могут рассматриваться как самостоятельные средства для моделирования коматозных состояний. Например, при внутрижелудочном введении в среднетельных дозах дихлорэтана и трихлорэтилена, предварительно растворенных в растительном масле, состояние токсической комы у животных не развивалось, а угнетение функций ЦНС соответствовало оглушению или сопору. Введение фентанила в среднетельной дозе приводило к развитию достаточно длительной каталепсии, но не комы.

4.2.3. Оценка неврологического статуса и вегетативных показателей

Для разработки экспериментальных моделей используют показатели неврологического статуса и витальных функций.

Для описания неврологического статуса изучают следующие показатели, разделенные по степени тяжести и выраженные в баллах:

1. Поведение животных (ПЖ): комплексная оценка поведения животного при нахождении крысы в клетке и взятии на руки. Взятие на руки и помещение животного на поверх-

ность клетки позволяет исключить состояние сна. Выбор этого показателя в качестве интегрального обусловлен тем, что поздние и двигательные реакции регулируются головным мозгом как единым целым. Выявление двигательной активности – один из наиболее часто используемых и важных показателей оценки изменений функций ЦНС [8].

Поведение животных: активная деятельность (груминг, принятие пищи и др.), сон, при взятии на руки активные целенаправленные реакции – 4 балла; лежит, при взятии на руки движения замедленные, но сохраняется их целенаправленность к избеганию, поворачивает голову – 3 балла; лежит на животе или в боковом положении, при взятии на руки движения нецеленаправленные – 2 балла; лежит на животе или боковом положении, при взятии на руки движения отсутствуют – 1 балл.

2. Реакция на обонятельный (пищевой) раздражитель (РО). В качестве компонента пищевого раздражителя используют шоколад.

Реакция на обонятельный (пищевой) раздражитель (шоколад): активная с движением, точная ориентация к стимулу – 3 балла; ослабленная реакцией поворотом головы с движением по направлению к стимулу – 2 балла; отсутствует – 1 балл.

3. Аудиомоторная реакция (реакция вздрагивания в ответ на звуковой раздражитель) (АР). Крысу помещают на открытую площадку, затем подают сильный звуковой раздражитель (громкий хлопок руками). В норме крыса реагирует мгновенным вытягиванием задних конечностей, сгибанием передних конечностей и выгибанием спины; при этом глаза животного закрыты, а уши прижаты назад [9].

Аудиомоторная реакция: выражена (проявляется реакцией избегания, вытягиванием задних конечностей, сгибанием передних конечностей, выгибанием спины) – 3 балла; ослаблена (отмечается сокращение круговой мышцы глаза) – 2 балла; отсутствует – 1 балл.

4. Поисковая реакция на открытом пространстве (ПР). Поведение, ориентированное к физическому окружению, особенно выражено у грызунов на новой для них территории (животные исследуют ее). Включает локомоцию с приноживанием, подъемы на задние лапы с приноживанием, заглядывание в различные отверстия, т.е. элементы изучения окружающей среды. Это поведение носит в новой среде обязательный характер.

Поисковая реакция: активная деятельность (обнюхивание, двигательная активность) – 3 балла; сидит, поисковая реакция не выражена – 2 балла; поисковая реакция отсутствует, лежит на животе или боковое положение – 1 балл.

5. Рефлекс хватания за решетку (РХР). Крысу сажают на решетку от клетки и пытаются с неё снять. При поднятии животного сила держания за решетку возрастает.

Рефлекс хватания за решетку: выражен (при поднятии крысы сила держания возрастает) – 3 балла; снижен – 2 балла; отсутствует – 1 балл.

6. Рефлекс переворачивания (РП). Животное кладут на спину на плоскую поверхность, оно сразу же переворачивается (становится на четыре лапы) [10]. При выраженном угнетении коры головного мозга животное не переворачивается и отсутствуют попытки к переворачиванию.

Рефлекс переворачивания: сохранен – 4 балла; замедлен – 3 балла; отсутствует при сохраненных попытках – 2 балла; отсутствует – 1.

7. Тонус мышц (ТМ). Исследуется тонус мышц при взятии животного в руки. В норме тонус тела заметно упругий, тонус брюшной стенки характеризуется слабой сопротивляемостью, тонус конечностей умеренный [11].

Тонус мышц: нормальный (упругий тонус брюшной стенки, тонус конечностей умеренный) – 3 балла; дистонус (снижен или повышен) – 2 балла; атония – 1 балл.

8. Тестирование равновесия на наклонной поверхности (ТРНП). Если животное поместить вниз головой на платформу, сделанную из металлических ячеек и наклоненную под углом 30°, то в норме оно поворачивается мордой к верхней части платформы [10].

Тестирование равновесия на наклонной поверхности: животное быстро поворачивается мордочкой к верхней части платформы или обследует платформу – 4 балла; замедленно переворачивается, сидит или лежит, отдельные целенаправленные движения – 3 балла; отсутствует переворачивание, могут быть некоординированные движения – 2 балла; отсутствуют движения, боковое положение – 1 балл.

9. Тестирование равновесия на горизонтальном стержне (ТГС). Животное помещают на горизонтальный деревянный брусок диаметром 2 см и длиной 30 см, закрепленный на высоте 50 см над полом. Животное может просидеть на бруске 3 мин и более [10].

Тестирование равновесия на горизонтальном стержне (без вращения): животное сидит более 30 с – 3 балла; животное неуклюже выполняет данный тест и быстро падает (менее 30 с) – 2 балла; не выполняет тест (падает), не удается посадить на стержень – 1 балл.

10. Нарушение координации (атаксия): отсутствует – 3 балла; отмечается атаксия – 2 балла; невозможно проверить (отсутствие движений, боковое положение) – 1 балл.

11. Проба на нашатырный спирт: выраженная реакция на раздражитель избеганием – 3 балла; ослабленная реакция, сохранен чихательный рефлекс – 2 балла; отсутствует – 1 балл.

12. Оценка тактильно-болевого чувствительности (БР). Болевой раздражитель наносят сжатием хвоста пинцетом. В норме животное локализует источники боли, происходит резкое поворачивание животного в сторону болевого стимула или реакция избегания. По мере угнетения деятельности ЦНС снижается болевая чувствительность, приводя к нелокализованному ответу на болевое воздействие сокращением брюшной стенки или полному отсутствию реакции.

Тактильно-болевая чувствительность: реагирует на одиночное воздействие агрессией или избеганием – 4 балла; слабая реакция отползанием или поворотом – 3 балла; нелокализованный ответ, в том числе сокращением брюшной стенки – 2 балла; отсутствует – 1 балл.

13. Рефлекс сгибания задних конечностей (РС). После сжатия пальцев задних конечностей ступня немедленно отдергивается и сгибание ненадолго сохраняется. Интенсивность реакции пропорциональна интенсивности стимула. При значительном угнетении нервной системы раздражение приводит к нелокализованному ответу сокращением брюшной стенки, а при дальнейшем угнетении – к отсутствию реакции на раздражитель.

Рефлекс сгибания задних конечностей: быстрое сгибание ступни, которое ненадолго сохраняется – 4 балла; замедленное сгибание ступни, которое длительно сохраняется – 3 балла; отсутствие сгибания ступни после одиночного стимула, нелокализованный ответ сокращением брюшной стенки – 2 балла; отсутствует сгибание даже после многократного стимула – 1 балл.

14. Состояние зрачка (СЗ). При рассеянном освещении размер зрачка у животных составляет около 2 мм. Фиксировали развитие миоза или мидриаза, связанных с воздействием на симпатические или парасимпатические отделы нервной системы.

Состояние зрачков: норма – 2 балла; миоз или мидриаз – 1 балл.

15. Зрачковый рефлекс (ЗР). После освещения глаза животного можно наблюдать миотическую реакцию. В норме после усиления яркости света происходит быстрое сокращение зрачка, после уменьшения уровня интенсивности освещения зрачок опять расширяется. Зрачковый рефлекс (реакция зрачков на свет): выраженный – 3 балла; ослаблен – 2 балла; отсутствует – 1 балл.

16. Мидриаз и отсутствие зрачкового рефлекса (МОР): сочетание мидриаза и реакции зрачка на свет – 2 балла; зрачок расширен и на свет не реагирует – 1 балл.

17. Корнеальный рефлекс (КР). Животное фиксируют одной рукой и осторожно прикасаются к роговице волоском. Крыса быстро закрывает веки, и они остаются закрытыми на некоторое время. При угнетении нервной системы выраженность данного рефлекса снижается.

Корнеальный рефлекс (КР): выражен – 3 балла; ослаблен – 2 балла; отсутствует – 1 балл.

18. Глоточный рефлекс (ГР). Животное фиксируют одной рукой и осторожно зондом проверяют глоточный рефлекс. У животного наблюдаются глотательные движения.

Глоточный рефлекс (ГР): выражен – 3 балла; ослаблен – 2 балла; отсутствует – 1 балл.

19. Судорожная активность (СА): судороги отсутствуют – 4 балла; локальные судороги или миоклонии – 3 балла; генерализованные судороги – 2 балла; опистотонус – 1 балл.

20. Двигательное возбуждение: отсутствует – 2 балла, имеется (хаотичное передвижение по клетке) – 1 балл.

Помимо неврологических показателей у животных оцениваются витальные функции: частота дыханий, частота сердечных сокращений и ректальная температура. При необходимости могут быть исследованы и другие показатели.

Электрокардиограмма. ЭКГ записывают, используя стандартные отведения. Показатели ЭКГ рассчитывают по II стандартному отведению.

Суммационно-пороговый показатель (СПП) позволяет оценить функциональное состояние нервной системы, способность ее к суммации подпороговых раздражений. Исследование выполняют на приборе, например «Электростимулятор ЭС-50-1» (Россия), с использованием следующих параметров: непрерывная серия импульсов при продолжительности каждого импульса 0,2 с и частоте 2 Гц, исходное напряжение равно 0 В. Задние лапы животного помещают на обильно смоченные физиологическим раствором марлевые обкладки. Когда

животное успокаивается, подают ток и одновременно равномерно увеличивают подаваемое напряжение (скорость увеличения напряжения 2 В/с) [12]. Результат фиксируют в момент появления миофибрилляций или ритмичных сокращений пальцев лапы.

У крыс дополнительно оценивают характер и ритм дыхания, выражали его в баллах: ритмичное, 60-150 дыхательных движений в минуту – 4 балла; брадипноэ (менее 60 дыханий в мин) или тахипноэ – 3 балла; брадипноэ с участием вспомогательных мышц, ЧД до 40 в мин – 2 балла; патологическое дыхание, длительные промежутки апноэ, ЧД менее 20 – 1 балл. В качестве критерия для обозначения брадипноэ была выбрана величина 60 дыханий в минуту и ниже – это связано с тем, что у интактных животных ЧД колеблется в широком диапазоне и вероятное минимальное значение этого показателя может составлять около 60 дыхательных движений в мин (таблица 1).

4.3. Экспериментальные модели отравлений некоторыми депримирующими агентами

В качестве химических соединений для моделирования токсической комы использованы соединения: этанол, оксибутират натрия, 1,4-бутандиол и тиопентал натрия. Механизм депримирующего действия этих соединений достаточно хорошо изучен. Этанол относится к веществам с неэлектролитным действием, хотя механизм его токсического действия более сложен [13]. Тиопентал натрия связывается с барбитуратным участком ГАМК-ергического рецептора [12]. Оксибутират натрия, превращаясь в организме в гидроксибутират, связывается с ГАМК-рецепторами. Подобным же механизмом действия обладает и 1,4-бутандиол, который в организме подвергается метаболическим превращениям с образованием гидроксимасляной кислоты [14]. Данные вещества вызывают у экспериментальных животных весь спектр депримирующих эффектов от оглушения до комы.

4.3.1. Этанол

Для моделирования острой интоксикации используют 30 % раствор этанола. ЛД₅₀ этанола при внутрибрюшинном введении составляет 5,2±0,2 г/кг (87 ммоль/кг). Для моделирования различной степени угнетения функций нервной системы (оглушение-сопор-кома) раствор этанола вводили животным внутрибрюшинно в диапазоне доз от 0,5 до 1,2 ЛД₅₀.

Клинические признаки интоксикации этанолом у животных носят дозозависимый характер и проявляются в прогрессирующем угнетении функций ЦНС с нарастающими расстройствами витальных функций (дыхания, кровообращения).

После внутрибрюшинного введения этанола в дозе 2,6 г/кг у животных отмечается снижение двигательной активности, нарушение координации движений. Эти проявления сохраняются в течение 1-3 ч.

Этанол в дозе 5,0 г/кг через 1-6 мин вызывает двигательное возбуждение, нарушение координации движений, а затем наблюдается боковое положение. В дальнейшем регистрируются снижение болевой чувствительности, угнетение рефлексов, постепенно снижаются ЧД и ЧСС, ректальная температура, отмечается патологическое дыхание. У выживших крыс ре-

грессия неврологических нарушений начинается приблизительно через 3 ч после введения токсиканта. К концу 1 сут полного восстановления состояния животных не происходит. Они неопытны, отказываются от воды и пищи, наблюдается гипокинезия.

Этанол в дозе 5,5 г/кг вызывает развитие однотипной картины начала интоксикации. Через 1-2 мин после инъекции токсиканта у животных наблюдается атаксия, а через 2-5 мин боковое положение. В дальнейшем снижается болевая чувствительность, угнетаются рефлексы, постепенно развиваются нарушения витальных функций, а затем животные погибают.

При крайне тяжелом отравлении этанолом у части животных после выхода из комы наблюдается отсроченная гибель на 2-4 сутки.

У животных оценивают неврологические показатели и вегетативные функции (глава 4.2.3).

Для оценки степени депримации животных в фиксированные сроки интоксикации могут быть использованы модели, представленные в таблице 3.

Таблица 3 - Модель оценки степени депримации крыс при остром отравлении этанолом в динамике

| Время, ч | Модель (уравнение регрессии) оценки неврологического статуса, балл |
|--|---|
| 0,5 | $Y=5,88 - 0,24*PC - 0,35*ГР - 0,44*БР + 0,168*PЗ - 0,003*ЧД$ |
| 1 | $Y=6,827 - 0,467*PC - 0,273*ГР - 0,430*ГНП + 0,215*PЗ - 0,255*СЗ - 0,002*ЧСС$ |
| 3 | $Y=5,580 - 0,466*КР - 0,373*БР + 0,343*PЗ - 0,255*ГР - 0,256*ПЖ$ |
| 6 | $Y=8,118 - 0,545*ПЖ - 0,405*СЗ - 0,311*ГР - 0,216*PC - 0,231*БР - 0,04*ЧД - 0,02*ЧСС$ |
| 8 | $Y=7,384 - 0,513*PC - 0,545*ПЖ - 0,430*ГР + 0,002*ЧСС$ |
| Примечание - разработанные модели информативны и достоверны (коэффициент детерминации $R^2 > 0,5$, уровень значимости по F-критерию ($p \leq 0,05$)). | |

При решении уравнений значениям Y соответствует: 1 – физиологическая норма, 2 – оглушение, 3 – сопор, 4 – поверхностная кома, 5 – глубокая кома, 6 – терминальная кома.

Для оценки неврологического статуса в течение 1 суток интоксикации используют расчетом индекса тяжести угнетения нервной системы (ИТНН). Формула для расчета получена на основании статистической обработки методом пошагового регрессионного анализа результатов неврологического тестирования в различные сроки интоксикации после введения этанола.

Расчет ИТНН проводится по следующей формуле (1):

$$ИТНН = 5*ПЖ + 4*ГР + 3*БР + 2*PC + 2*ЗР + КР, \quad (1)$$

где: ИТНН – индекс тяжести угнетения нервной системы, балл; ПЖ – поведение животных, балл; ГР – глоточный рефлекс, балл; БР – тактильно-болевая чувствительность, балл; PC – рефлекс сгибания задних конечностей, балл; ЗР – зрачковый рефлекс, балл; КР – корнеальный рефлекс, балл; цифры 5, 4, 3, 2, 1 – коэффициенты значимости признака.

При интерпретации значений, рассчитанных по формуле 5, используются следующие критерии: ИТНН более 55 баллов – физиологическая норма; от 46 до 55 баллов – оглушение; от 36

до 45 баллов – сопор; от 26 до 35 баллов – кома умеренная; от 18 до 25 баллов – кома глубокая, 17 баллов и меньше – кома запредельная.

Оценка тяжести состояния животных при отравлении этанолом проводится с использованием ИГК по формуле (2):

$$\text{ИГК} = 5 \cdot \text{ПЖ} + 3,5 \cdot \text{ГР} + 2,5 \cdot \text{БР} + 3 \cdot \text{РС} - 1,5 \cdot \text{РЗ} + 2 \cdot \text{СЗ} - 3 \cdot \text{СА} + 0,03 \cdot \text{ЧД} + 0,01 \cdot \text{ЧСС}, \quad (2)$$

где: ИГК – индекс глубины комы, балл; ПЖ – поведение животных, балл; ГР – глоточный рефлекс, балл; БР – тактильно-болевая чувствительность, балл; РС – рефлекс сгибания задних конечностей, балл; РЗ – размер зрачка, мм; СЗ – состояние зрачков, балл; СА – судорожная активность, балл; ЧД – частота дыхания; ЧСС – частота сердечных сокращений (сокращений в мин); цифры 5, 3,5, 3, 2,5, 2, 1,5, 0,03, 0,01 – коэффициенты значимости признака (коэффициенты регрессии). Полученное решение по формуле округляют до целого числа.

При интерпретации рассчитанных значений используются следующие критерии: ИГК более 45 баллов – физиологическая норма; от 37 до 45 баллов – оглушение; от 25 до 36 баллов – сопор; от 15 до 24 баллов – кома умеренная; от 4 до 14 баллов – кома глубокая; менее 3 баллов – запредельная кома.

Уравнения для оценки прогноза исхода интоксикации при введении этанола в различные сроки оценки состояния животных, представлены в таблице 4 .

Таблица 4 - Прогноз исхода острого отравления этанолом у крыс в 1-е сутки

| Время, ч | Группа* | Линейные дискриминантные функции | Точность прогноза, % | |
|--|---------|--|----------------------|---------|
| | | | По группам | средняя |
| 0,5 | 1 | $F1 = 2,03 \cdot \text{ТМ} - 2,17 \cdot \text{КР} + 0,11 \cdot \text{ЧСС} - 16,84$ | 78,4 | 75,6 |
| | 2 | $F2 = 0,58 \cdot \text{ТМ} - 0,70 \cdot \text{КР} + 0,12 \cdot \text{ЧСС} - 22,11$ | 73,2 | |
| 1 | 1 | $F1 = 9,96 \cdot \text{РЗ} + 0,10 \cdot \text{ЧД} + 0,09 \cdot \text{ЧСС} - 30,68$ | 81,1 | 83,2 |
| | 2 | $F2 = 8,66 \cdot \text{РЗ} + 0,11 \cdot \text{ЧД} + 0,11 \cdot \text{ЧСС} - 37,35$ | 84,5 | |
| 3 | 1 | $F1 = 3,19 \cdot \text{ГР} + 0,09 \cdot \text{ЧД} - 7,29$ | 91,2 | 87,4 |
| | 2 | $F2 = 6,69 \cdot \text{ГР} + 0,12 \cdot \text{ЧД} - 17,00$ | 84,9 | |
| 6 | 1 | $F1 = 4,49 \cdot \text{Т} - 4,86 \cdot \text{ГР} - 58,43$ | 84,6 | 92,6 |
| | 2 | $F2 = 4,97 \cdot \text{Т} - 0,62 \cdot \text{ГР} - 80,75$ | 96,4 | |
| 8 | 1 | $F1 = 3,19 \cdot \text{КР} - 0,73 \cdot \text{АР} - 0,04 \cdot \text{ЧСС} - 8,23$ | 87,5 | 93,4 |
| | 2 | $F2 = 7,46 \cdot \text{КР} - 2,45 \cdot \text{АР} - 0,06 \cdot \text{ЧСС} - 23,05$ | 96,2 | |
| <p>Примечания</p> <p>1 * – 1 группа – гибель животного, 2 группа – животное выживет в течение 1 суток;</p> <p>2 Т – ректальная температура, °С;</p> <p>3 Если величина $F1 > F2$, то животное погибнет и наоборот.</p> | | | | |

4.3.2. Тиопентал натрия

Среднесмертельная доза тиопентала натрия при внутривенном введении для белых крыс в течение 1 сут составляет $85 \pm 1,6$ мг/кг. Моделирование угнетения функций ЦНС различной степени (оглушение-сопор-кома) у животных осуществляют внутривенным введением вещества диапазоне доз от 0,7 до 1,5 ЛД₅₀. Препарат вводят в растворе в конечном объеме 0,2 мл/100 г массы животного.

Клиника отравления тиопенталом натрия имеет ряд отличительных признаков, поэтому ниже мы приводим подробную характеристику проявлений интоксикации.

Для состояния, которое оценивалось как «оглушение», характерно снижение двигательной активности, положение животного на животе или на боку, снижение поисковой реакции при переносе из клетки на открытую поверхность, как правило, сохранен или замедлен рефлекс переворачивания, атаксия, координированная защитная реакция на боль, выражен рефлекс сгибания конечности. Животное точно локализует место раздражения, реакция на пищевой раздражитель снижена, а аудиомоторная реакция сохранена.

При «сопоре» животное лежит в клетке, при взятии на руки возможны нецеленаправленные движения, отмечается гипотония мышц, при нанесении болевых раздражений наблюдаются направленные на их устранение координированные защитные движения с поворотом туловища в сторону раздражения, аудиомоторная реакция в основном сохранена, сохраняются корнеальные, глоточные и зрачковые рефлексы. В случае развития у животных миоза регистрирование зрачкового рефлекса затруднено.

«Поверхностная кома» характеризуется боковым положением животного или положением на животе, отсутствием двигательной активности при взятии на руки, снижением тонуса мышц (атония), болевые реакции на сжатие лапы или хвоста снижены, носят нелокализованный характер или отсутствуют, корнеальные рефлексы сохранены, а глоточные снижены. Отмечается брадикардия.

Для «глубокой комы» характерно отсутствие роговичного рефлекса, болевой чувствительности и рефлекса сгибания задних конечностей, снижение или отсутствие глоточного рефлекса, выраженное уменьшение частоты дыхательных движений и частоты сердечных сокращений.

Проявлениями «терминальной комы» являются отсутствие всех исследуемых рефлексов, возможное развитие мидриаза, замедление или отсутствие реакции зрачков на свет, резко выраженные нарушения витальных функций (расстройство ритма и частоты дыхания менее 10 или апноэ, патологическое дыхание, снижение частоты сердечных сокращений и аритмии).

У животных оценивают неврологические показатели и вегетативные функции (глава 4.2.3).

Для оценки степени депримации животных в фиксированные сроки интоксикации могут быть использованы модели, представленные в таблице 5.

Таблица 5 - Модель оценки степени депримации крыс при остром отравлении тиопенталом натрия в динамике

| Время, ч | Модель (уравнение регрессии) оценки неврологического статуса, балл |
|----------|---|
| 0,5 | $Y=7,794 - 0,668*ПР - 0,493*БР - 0,173*РС - 0,294*КР - 0,003*ЧСС$ |
| 1 | $Y=7,646 - 0,309*ТМ - 0,753*ТГС - 0,324*БР - 0,375*РС + 0,225*РЗ - 0,225*ГР - 0,242*ХРД + 0,01*СПП$ |
| 3 | $Y=7,823 - 0,515*ПЖ - 0,337*БР - 0,530*РС - 0,384*КР$ |
| 6 | $Y=7,472 - 0,522*ПЖ - 0,368*ТРНП - 0,408*РС - 0,473*ХРД$ |
| 8 | $Y=7,593 - 0,907*ПЖ + 0,256*ТМ - 0,337*КР + 0,666*ХРД$ |

При решении уравнений значениям Y соответствует: 1 – физиологическая норма, 2 – оглушение, 3 – сопор, 4 – поверхностная кома, 5 – глубокая кома, 6 – терминальная кома.

Для оценки неврологического статуса в течение 1 суток интоксикации используют расчетом индекса тяжести угнетения нервной системы (ИТНН). Формула для расчета получена на основании статистической обработки методом пошагового регрессионного анализа результатов неврологического тестирования в различные сроки интоксикации после введения тиопентала натрия.

Расчет ИТНН проводится по следующей формуле (3):

$$\text{ИТНН} = 5*ПЖ + 4*ТГС + 2*БР + 3*РС + 3*МОР + 2*КР + ГР, \quad (3)$$

где: ИТНН – индекс тяжести угнетения нервной системы, балл; ПЖ – поведение животных, балл; ТГС – тестирование равновесия на горизонтальном стержне (без вращения); БР – тактильно-болевая чувствительность, балл; РС – рефлекс сгибания задних конечностей, балл; МОР – мидриаз и отсутствие зрачкового рефлекса, балл; КР – корнеальный рефлекс, балл; ГР – глоточный рефлекс, балл; цифры 5, 4, 3, 2, 1 – коэффициенты значимости признака.

При интерпретации значений, рассчитанных по формуле 7, используются следующие критерии: ИТНН более 57 баллов – физиологическая норма; от 57 до 47 баллов – оглушение; от 46 до 37 баллов – сопор; от 36 до 30 баллов – кома умеренная; от 29 до 25 баллов – кома глубокая; менее 25 баллов – запредельная кома.

Оценка тяжести состояния животных при отравлении тиопенталом натрия проводится расчетом ИГК по формуле (4):

$$\text{ИГК} = 5*ПЖ + 3*ТГС + 2*БР + 3*РС + 3*МОР + 2*КР + ГР + 2*ХРД + 0,01 \text{ ЧСС}, \quad (4)$$

где: ИГК – индекс глубины комы, балл; ПЖ – поведение животных, балл; ТГС – тестирование равновесия на горизонтальном стержне (без вращения); БР – тактильно-болевая чувствительность, балл; РС – рефлекс сгибания задних конечностей, балл; МОР – мидриаз и отсутствие зрачкового рефлекса, балл; КР – корнеальный рефлекс, балл; ГР – глоточный рефлекс, балл; ХРД – характер и ритм дыхания, ЧСС – частота сердечных сокращений (сокращений в мин); цифры 5, 4, 3, 2, 1, 0,01 – коэффициенты значимости признака.

При интерпретации значений, рассчитанных по формуле 4, статистически обоснованы следующие критерии: более 68 баллов – физиологическая норма; от 68 до 59 баллов – оглушение; от 58 до 48 баллов – сопор; от 47 до 38 баллов – кома умеренная; от 37 до 32 баллов – кома глубокая и менее 32 баллов – запредельная кома.

Для прогноза исхода острых отравлений тиопенталом натрия в эксперименте были использованы элементы алгоритма последовательного принятия решений (таблица 6).

Таблица 6 - Прогнозирование исхода интоксикации тиопенталом натрия у крыс по данным неврологического тестирования и вегетативным показателям

| Показатели | Условие 100% выживаемости | Время исследования |
|--|---------------------------|---------------------------|
| Поведение животных | Более 1 балла | любой момент исследования |
| Реакция на обонятельный (пищевой) раздражитель | Более 1 балла | любой момент исследования |
| Аудиомоторная реакция | Более 1 балла | после 0,5 ч |
| Поисковая реакция | Более 1 балла | любой момент исследования |
| Рефлекс хватания за решетку | Более 1 балла | любой момент исследования |
| Рефлекс переворачивания | Более 1 балла | любой момент исследования |
| Тонус мышц | Более 1 балла | после 0,5 ч |
| Тестирование равновесия на наклонной поверхности | Более 1 балла | любой момент исследования |
| Тестирование равновесия на горизонтальном стержне (без вращения) | Более 1 балла | любой момент исследования |
| Нарушение координации (атаксия) | Более 1 балла | любой момент исследования |
| Проба на нашатырный спирт | Более 2 баллов | любой момент исследования |
| Тактильно-болевая чувствительность | Более 2 баллов | любой момент исследования |
| Рефлекс сгибания задних конечностей | Более 3 баллов | после 0,5 ч |
| Глоточный рефлекс | Более 1 балла | после 1 ч |
| Характер и ритм дыхания | 4 балла | после 1 ч |
| ЧД | Более 50 | после 1 ч |
| Температура | Более 32 °С | после 1 ч |
| ЧСС | Более 350 | от 1 до 3 ч |
| | Более 290 | после 3 ч |

4.3.3. Оксibuтират натрия

Среднесмертельная доза оксibuтирата натрия для белых крыс-самцов в течение 1 сут составляет $2,75 \pm 0,1$ г/кг (22 ммоль/кг). Для моделирования различной степени угнетения функций нервной системы (оглушение-сопор-кома) токсикант вводят внутрибрюшинно в виде 20% раствора.

Через 1-5 мин после введения оксibuтирата натрия у 30% животных в среднелетальной дозе отмечаются двигательное возбуждение и атаксия. Через 3-10 мин регистрируется боковое положение. При этом у части крыс наблюдаются тонико-клонические судороги. В течение первого часа интоксикации у животных сохранены болевая чувствительность, зрачковые, роговичный и глоточный рефлексы, регистрируется снижение частоты дыхательных движений. Через 3 ч у животных отсутствуют реакции на болевые раздражители, отмечается снижение или отсутствие роговичного и глоточного рефлексов, фиксируются замедленные реакции зрачков на свет и снижение тонуса мышц. Отмечается выраженное изменение характера и частоты дыхания, гипотермия.

При введении оксibuтирата натрия в дозах более 2,0 г/кг наблюдалась гибель животных. Среди выживших животных отсроченная гибель не отмечалась.

Затем в динамике у животных постепенно восстанавливается частота дыхательных движений и рефлекторная деятельность. Состояние выживших животных через 6 ч после начала интоксикации соответствует оглушению или сопору. У большинства животных полное восстановление неврологического статуса происходило к 8 ч наблюдения. Клиника интоксикации у крыс носит дозозависимый характер.

У животных оценивают неврологические показатели и вегетативные функции (глава 4.2.3).

Для оценки неврологического статуса в течение 1 суток интоксикации используют расчетом индекса тяжести угнетения нервной системы (ИТНН). Формула для расчета получена на основании статистической обработки методом пошагового регрессионного анализа результатов неврологического тестирования в различные сроки интоксикации после оксibuтирата натрия.

Расчет ИТНН проводится по следующей формуле 5:

$$\text{ИТНН} = 8 \cdot \text{МОР} + 4 \cdot \text{ПЖ} + 4 \cdot \text{ГР} + 3 \cdot \text{АР} + 2 \cdot \text{БР} + 2 \cdot \text{ПНС} + \text{КР} + \text{РС}, \quad (5)$$

где: ИТНН – индекс тяжести угнетения нервной системы, балл; МОР – мидриаз и отсутствие зрачкового рефлекса; ПЖ – поведение животных, балл; ГР – глоточный рефлекс, балл; АР – аудиомоторная реакция, балл; БР – тактильно-болевая чувствительность, балл; ПНС – проба на нашатырный спирт, балл; КР – корнеальный рефлекс, балл; РС – рефлекс сгибания задних конечностей, балл; цифры 8, 4, 3, 2, 1 – коэффициенты значимости признака.

При интерпретации значений, рассчитанных по формуле 9, используются следующие критерии: ИТНН более 67 баллов – физиологическая норма; от 58 до 67 баллов – оглушение; от 50 до 57 баллов – сопор; от 41 до 49 баллов – кома умеренная; от 34 до 40 баллов – кома глубокая и 33 и менее – терминальная кома.

При математическом моделировании с помощью пошаговой регрессии в решающее правило с расчетом ИГК показатели вегетативных функций не были включены, так как их включение в формулу не повышает точность оценки степени тяжести состояния. Для расчета ИГК используются те же показатели, что и для ИТНН.

Таким образом, отличительной особенностью при отравлении оксибутиратом натрия является возможность использования для расчета ИТНН и ИГК единого решающего правила.

Для прогноза исхода отравлений оксибутиратом натрия в любые сроки интоксикации используется следующая формула (6):

$$F=2,5*C3 + PC - 5,5, \quad (6)$$

где: СЗ – состояние зрачков, балл; РС – реакция сгибания задних конечностей, балл. Если $F>0$ – то животное выживет, если $F<0$ – то животное погибнет. Точность прогноза при использовании данного решающего правила составляет 77,0%.

Для повышения точности прогноза исхода отравлений оксибутиратом натрия в решающее правило включают показатели ЧСС и СПП (формула 7):

$$F=2*C3 + 0,5*PC + 0,01*ЧСС - 0,1*СПП - 6,5, \quad (7)$$

где: СЗ – состояние зрачков, балл; РС – реакция сгибания задних конечностей, балл; ЧСС – частота сердечных сокращений, сокращений в мин; СПП – суммационно-пороговый потенциал, В. Если $F>0$ – то животное выживет, если $F<0$ – то животное погибнет. Точность прогноза при использовании данного решающего правила составляет 86,2%.

4.3.4 1,4-Бутандиол

Среднелетальная доза 1,4-бутандиола при внутрибрюшинном введении для белых крыс-самцов в течение 1 сут составляет $1,2\pm 0,04$ г/кг (13 ммоль/кг).

После скрытого периода у крыс, отравленных 1,4-бутандиолом в среднелетальной дозе, отмечается адинамия и атаксия, мышечная гипотония, у небольшой части животных возможны судороги. Нарушения функций центральной нервной системы в динамике нарастали, а через 15 мин наблюдается боковое положение. При проведении неврологического тестирования через 30 мин после введения токсиканта у животных сохранены болевая чувствительность, зрачковый, роговичный и глоточный рефлексы.

Через 3 ч у животных отсутствуют реакции на болевые раздражители, отмечается снижение или отсутствие роговичного и глоточного рефлексов, замедленные зрачковые реакции, снижение тонуса мышц, у некоторых животных развивается мидриаз при сохранности реакции зрачков на свет. Кроме того, отмечается выраженное изменение характера и частоты дыхания (брадипноэ). Животные, частота дыхательных движений у которых менее 10, погибают в 85% случаев.

Состояние животных с боковым положением, снижением тонуса мышц, гипорефлексией или арефлексией, значительными изменениями частоты дыхания рассматривается как глубокая кома.

У животных оценивают неврологические показатели и вегетативные функции (глава 4.2.3).

Для оценки степени депримации животных в фиксированные сроки интоксикации могут быть использованы модели, представленные в таблице 7.

Таблица 7. Модель оценки степени депримации крыс при остром отравлении 1,4-бутандиолом в динамике

| Время, ч | Модель (уравнение регрессии) оценки неврологического статуса, балл |
|--|---|
| 0,5 | $Y=6,540 - 0,389*TM - 0,483*БР - 0,393*ПР - 0,710*КР + 0,183*ХРД$ |
| 1 | $Y=4,158 - 0,228*БР - 0,515*ЗР - 0,291*КР + 0,099*Т - 0,410*СЗ - 0,306*ПЖ - 0,237*РЗ$ |
| 3 | $Y=6,899 - 0,452*БР - 0,246*ЗР - 0,460*ГР - 0,018*ЧДД$ |
| 6 | $Y=10,12 - 0,32*БР - 0,45*ГР - 0,61*РП - 0,42*МОР - 0,22*КР - 0,23*СА - 0,05*Т$ |
| 8 | $Y=7,764 - 0,420*TM - 0,285*РХР - 0,555*РС - 0,375*КР - 0,324*ХРД$ |
| Примечание – Разработанные модели информативны (коэффициент детерминации $R^2 > 0,5$) и достоверны (уровень значимости по F-критерию $p \leq 0,05$). | |

При решении уравнений значениям Y соответствует: 1 – физиологическая норма, 2 – оглушение, 3 – сопор, 4 – поверхностная кома, 5 – глубокая кома, 6 – терминальная кома; Т – ректальная температура, °С.

Для исследуемой выборки животных, отравленных 1,4-бутандиолом, при помощи пошаговой регрессии было получено общее решающее правило с возможностью расчета ИТНН в любые сроки интоксикации. В этом случае используется решающее правило, которое включает 9 неврологических показателей:

$$ИТНН = 5,5*ГР + 3*БР + 3*ЗР + 2*РП + 2*КР + 2*TM + 2*ПР + 1,5*СЗ + ПНС, \quad (8)$$

где: ИТНН – индекс тяжести угнетения нервной системы, балл; ГР – глоточный рефлекс, балл; БР – тактильно-болевая чувствительность, балл; ЗР – зрачковый рефлекс, балл; РП – рефлекс переворачивания, балл; КР – корнеальный рефлекс, балл; TM – тонус мышц, балл; ПР – поисковая реакция; СЗ – состояние зрачков, балл; ПНС – проба на нашатырный спирт, балл; цифры 5, 5, 3, 2, 1, 5, 1 – коэффициенты значимости признака (коэффициенты регрессии). При выполнении расчета ИТНН округляется до целого числа.

При интерпретации значений, рассчитанных по формуле 12, используются следующие критерии: ИТНН более 65 баллов – физиологическая норма; от 56 до 65 баллов – оглушение; от 46 до 55 баллов – сопор; от 36 до 45 баллов – кома умеренная; от 26 до 35 баллов – кома глубокая и 25 и менее – терминальная кома.

Для диагностики степени тяжести состояния экспериментальных животных при острой интоксикации 1,4-бутандиолом были использованы элементы алгоритма последовательного принятия решений или построения решающих правил с ветвлением. При их при-

менении необходимо учитывать данные о сроках оценки состояния животных после введения токсиканта в обобщенном виде: 1 – через 0,5 или 1 ч; 2 – через 3, 6 или 8 ч.

Если исследователю доступна информация о сроках оценки состояния животного, то в этом случае алгоритм принятия решения для расчета ИГК представлен на рисунке 3.



Рисунок 3 – Алгоритм принятия решения о степени тяжести состояния экспериментальных животных при остром отравлении 1,4-бутандиолом

На разных ветвях алгоритма используются разные показатели как по количеству, так и по составу. В целом полученный алгоритм обеспечивает высокое качество классификации, что позволяет принимать 85,8% правильных решений по оценке тяжести состояния отравленных 1,4-бутандиолом животных.

При малых сроках оценки (0,5 и 1 ч), если значение определяющего показателя "Тактильно-болевая чувствительность" равно 1, то используется решающее правило (9):

$$\text{ИГК} = 6 \cdot \text{ЗР} + 4 \cdot \text{КР} - 3 \cdot \text{ПНС}, \quad (9)$$

где: ИГК – индекс глубины комы, балл; ЗР – зрачковый рефлекс, балл; КР – корнеальный рефлекс, балл; ПНС – проба на нашатырный спирт, балл; цифры 6, 4, 3 – коэффициенты значимости признака (коэффициенты регрессии).

При интерпретации значений, рассчитанных по этой формуле, используются следующие критерии: ИГК 22 балла и более – сопор; 21 и менее – умеренная кома.

Если значение показателя "тактильно-болевая чувствительность" равно 2 баллам, то используется решающее правило (10):

$$\text{ИГК} = 30 + 3,7 \cdot \text{ЗР} + 4,7 \cdot \text{ТМ} - 0,07 \cdot \text{ЧСС}, \quad (10)$$

где: ИГК – индекс глубины комы, балл; ЗР – зрачковый рефлекс, балл; ТМ – тонус мышц, балл; ЧСС – частота сердечных сокращений, сокращений в мин; цифры 3,7; 4,7; 0,07 – коэффициенты значимости признака (коэффициенты регрессии). Полученное решение округляют до целого числа.

При интерпретации значений, рассчитанных по этой формуле, используются следующие критерии: ИГК 26 баллов и более баллов – оглушение; 18-25 баллов – сопор, 17 баллов и менее – умеренная кома.

Если значение показателя «тактильно-болевая чувствительность» равно 3 или 4 баллам, используется решающее правило (11):

$$\text{ИГК} = 5 \cdot \text{ПР} + 6,5 \cdot \text{БР} + 1,5 \cdot \text{ПНС} + 1,5 \cdot \text{ТМ} - 4 \cdot \text{РС}, \quad (11)$$

где: ИГК – индекс глубины комы, балл; ПР – поисковая реакция, балл; БР – тактильно-болевая чувствительность, балл; ПНС – проба на нашатырный спирт, балл; ТМ – тонус мышц, балл; РС – рефлекс сгибания задних конечностей, балл; цифры 6,5; 5; 4; 1,5 – коэффициенты значимости признака (коэффициенты регрессии). Полученное решение округляют до целого числа.

При интерпретации значений, рассчитанных по указанной формуле, используются следующие критерии: ИГК 26 баллов и более баллов – состояние функционирования нервной системы в пределах физиологической нормы; 18-25 баллов – оглушение, 17 баллов и менее – сопор.

Если сроки исследования составляют 3, 6 или 8 ч, то для оценки тяжести состояния используют решающее правило (12):

$$\text{ИГК} = 5 \cdot \text{ГР} + 3,5 \cdot \text{РП} + 3 \cdot \text{БР} + 3 \cdot \text{ПНС} + 2,5 \cdot \text{ЗР} + 1,5 \cdot \text{АР} + 0,01 \cdot \text{ЧСС}, \quad (12)$$

где: ИГК – индекс глубины комы, балл; ГР – глоточный рефлекс, балл; РП – рефлекс переворачивания, балл; БР – тактильно-болевая чувствительность, балл; ПНС – проба на нашатырный спирт, балл; ЗР – зрачковый рефлекс, балл; АР – аудиомоторный рефлекс, балл; ЧСС – частота сердечных сокращений, сокращений в мин; цифры 5; 3,5; 3; 2,5; 1,5; 0,01 – коэффициенты значимости признака (коэффициенты регрессии). При выполнении расчета ИГК округляется до целого числа.

При интерпретации значений, рассчитанных по этому правилу, используются следующие критерии: ИГК более 62 баллов – физиологическая норма; от 53 до 62 баллов – оглушение; от 44 до 52 баллов – сопор; от 33 до 43 баллов – кома умеренная; от 24 до 32 баллов – кома глубокая; 23 и менее – запредельная кома.

Для прогноза исхода отравлений 1,4-бутандиолом в любые сроки интоксикации используются следующие модели (решающие правила), представленные в таблице 8.

Таблица 8 - Прогноз исхода острого отравления 1,4-бутандиолом у крыс в 1-е сутки

| Время, ч | Модели для оценки исхода интоксикации |
|--|---------------------------------------|
| 0,5 | $F = 2*ЗР + 2*КР - 0,013*ЧСС - 3$ |
| 1 | $F = 2,5*ЗР + 2*КР - 11$ |
| 3 | $F = 1,5*КР + 0,014*ЧСС - 6$ |
| 6 | $F = 2*ГР + 2,5*КР - 8$ |
| 8 | $F = 4*ГР - 1*РС - 6$ |
| Примечание – если $F > 0$ – то животное выживет, если $F < 0$ – то животное погибнет | |

Для прогноза исхода отравлений в любые сроки интоксикации 1,4-бутандиолом используется решающее правило (13):

$$F = ЗР + ПНС - СЗ + КР - 4 \quad (13)$$

где: ЗР – зрачковая реакция, балл; ПНС – проба на нашатырный спирт, балл; СЗ – состояние зрачков, балл, КР – корнеальный рефлекс, балл. Если $F > 0$ – то животное выживет, если $F < 0$ – то животное погибнет. Точность прогноза при использовании данного решающего правила составляет 76,9%.

Библиография

- 1 Нейрореаниматология: нейромониторинг, принципы интенсивной терапии, нейрореабилитация / Под общ. ред. Л.В Усенко и Л.А. Мальцевой. – Днепропетровск: АРТ-Пресс, 2008. – Т. 1. – 296 с.
- 2 Белкин А. А., Зислин Б.Д., Авраменко А.А. и др. Синдром острой церебральной недостаточности как концепция нейрореаниматологии // Анестезиология и реаниматология. – 2008. – № 2. – С. 4-8.
- 3 Смирнов В.М., Мучник Л.С., Шандурина и др. Клиническая нейрофизиология. – Л.: Наука, 1972. – 720 с.
- 4 Лужников Е.А., Остапенко Ю.Н., Суходолова Г.Н. Неотложные состояния при острых отравлениях (диагностика, клиника, лечение). – М.: Медпрактика, 2001. – 219 с.
- 5 Стрекалова О.С., Учайкин В.Ф., Ипатов О.М. и др. Коматозные состояния: Этиопатогенез, экспериментальные исследования, лечение гепатической комы // Биомед. химия. – 2009. – Т. 55, вып. 4. – С. 380-396.
- 6 Красовский Г.Н., Рахманин Ю.А., Егоров Н.А. Экстраполяция токсикологических данных с животных на человека. – М.: Медицина, 2009. – 206 с.
- 7 Бонитенко Е.Ю., Башарин В.А. Бонитенко Ю.Ю. и др. Депримирующие агенты. Новые подходы к классификации (Дискуссия) // Токсикол. вестн.. – 2012. – № 3. – С. 43-46.
- 8 Lynch J.J., Mittelstadt S.W. Can locomotor screening be utilized as first-tiered approach for preclinical CNS/neurobehavioral safety testing? // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. – 2009. – Vol. 60, № 2. – P. 232.
- 9 Horlington M. A method for measuring acoustic startle response latency and magnitude in rats: Detection of a single stimulus effect using latency measurements // Physiol. Behav. – 1968. – Vol. 3, № 6. – P. 839-844.
- 10 Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения: Пер. с англ.. – М.: Высш. шк., 1991. – 388 с.
- 11 Гладких В.Д., Елькин А.И., Иванов В.Б. и др. Токсикология блокаторов ГАМК-зависимых хлор-ионных каналов нейрональных мембран: Эксперим.-теорет. аспекты. – М.: Полекс, 2007. – 247 с.
- 12 Сперанский С.В. О преимуществах использования нарастающего тока при исследовании способности белых мышей к суммации подпороговых импульсов // Фармакология и токсикология. – 1965. – Т. 28, № 1. – С. 123-124.
- 13 Бонитенко Е.Ю. Токсичность и особенности метаболизма этанола, «суррогатов» алкоголя и спиртов, способных вызывать массовые отравления: Обоснование направлений фармакологической профилактики и терапии интоксикаций (клинико-экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – СПб., 2007. – 46 с.
- 14 Dyer J.E., Haller C.A. γ -Hydroxybutyrate, β -butyrolactone, and 1,4-butanediol // Medical toxicology. – Philadelphia, 2004 – P. 1097-1102.

