

Экспериментальное изучение методов оценки поведенческих реакций животных на воздействие малых доз фосфорорганических отравляющих веществ

Доктор медицинских наук, профессор **В. Р. Рембовский**, кандидат медицинских наук **В. И. Попович**, кандидат медицинских наук **В. П. Кривокорытов**, доктор биологических наук **П. А. Скибарко**

Разрабатываемые технологии уничтожения химического оружия предполагают полную безопасность производственных циклов деструкции отравляющих веществ для персонала объектов уничтожения (хранения) химического оружия. Вместе с тем данное положение не исключает в ряде ситуаций возможности появления в атмосфере производственных помещений малых количеств как самих отравляющих веществ, так и продуктов их деструкции. В этой связи экспериментальная оценка физиологической активности малых доз отравляющих веществ приобретает актуальное значение.

Для оценки физиологического воздействия внешних факторов малой интенсивности используются интегральные и специфические методы исследования функционального состояния организма [1—3]. Интегральные методы направлены прежде всего на оценку главной «функции» организма — его работоспособности в различных негативных условиях, в частности, при воздействии химических веществ в малых дозах (на уровне пороговых и ниже) [4, 5]. Немаловажным положительным качеством этих методов является их возможность улавливать неспецифические изменения в умственной и физической работоспособности целостного организма под влиянием различных факторов. Известно, что некоторые элементы трудовой деятельности человека и поведения животных имеют одну биологическую базу. В качестве таковой можно назвать ориентировку в ситуации, восприятие и запечатление (память) информации, различные виды условно-рефлекторной деятельности, элементарные рассудочные акты [6—8].

В настоящей работе представлены исследования поведенческих реакций животных (собак) на воздействие фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ) с применением комплекса интегральных методов оценки состояния организ-

ма: теста на краткосрочную память, теста на условно-рефлекторную побегу в большом лабиринте и метод определения индекса PWC₂₀₀ [1—3, 6, 9]. Первые два теста условно отражают «умственную» работоспособность животных, третий тест характеризует физическую работоспособность.

Для справки укажем, что сущность последнего теста состоит в определении мощности работы, выполняемой собакой при беге на третбане, при частоте сердечных сокращений 200 ударов в 1 мин, по изменению параметров сердечного ритма под воздействием двух нагрузок разной мощности с промежуточным отдыхом. Методика моделирует и оценивает физическую работоспособность (аналогичный тест PWC₁₇₀ применяется в медицинской практике и при исследованиях в физиологии труда).

В качестве критериальных величин, характеризующих состояние работоспособности, использовались количество правильных реакций (выборов) в тесте на краткосрочную память, время (скорость) побежки в лабиринте и расчетная величина PWC₂₀₀. Эксперименты проводились на собаках в условиях острого (однократного), повторного и подострого воздействия зарина, зомана и вещества VX в малых дозах. Тяжесть поражения животных оценивали на основании клинической картины интоксикации и степени угнетения активности ацетилхолинэстеразы цельной крови.

Общая схема и объем экспериментальных исследований по оценке состояния работоспособности собак при воздействии малых доз ФОВ представлены в табл. 1.

Для получения более полного представления о работоспособности при влиянии токсического фактора и оценки пригодности интегральных методов для соответствующих исследований были проведены испытания (на собаках) в условиях острого воздействия зарина — типичного для ингаляци-

онного поражения в реальных условиях представителя ФОВ — в широком интервале доз, от подпороговых до эффективных. В случае внутривенного введения зарина в наименьшей из исследуемых доз ($2 \cdot 10^{-3}$ мг/кг) изменения как состояния организма, так и уровня физической и «умственной» работоспособности собак не наблюдались. Показатели влияния зарина в более высоких дозах на работоспособность животных

приведены в табл. 2.

Клинические проявления интоксикации при воздействии зарина в дозах $4 \cdot 10^{-3}$ и $8 \cdot 10^{-3}$ мг/кг соответствовали преимущественно развитию пороговых эффектов, характеризующихся незначительной саливацией, легкой вялостью и небольшим снижением двигательной активности примерно у 70% животных.

Таблица 1

Схема экспериментального исследования работоспособности собак при воздействии малых доз фосфорорганических отравляющих веществ

ФОВ	Путь воздействия вещества	Действующая доза, мг/кг	Вид воздействия	Количество биообъектов	Методы исследования и регистрируемые показатели
Зарин	Внутривенно	$2 \cdot 10^{-3}$ — $12 \cdot 10^{-3}$	Острое	24	Измерение активности ацетилхолинэстеразы цельной крови; тест на краткосрочную
Зоман	Внутримышечно	$32 \cdot 10^{-6}$ — $27 \cdot 10^{-5}$	Повторное в течение 5 сут.	21	память, количество правильных выборов; метод лабиринта, время побежки; тест
Зоман	То же	$32 \cdot 10^{-6}$	Подострое в течение 68 сут.	8	PWC ₂₀₀
VX	Накожно	$36 \cdot 10^{-6}$ — $43 \cdot 10^{-5}$	Острое, повторное в течение 4 сут.	10	

Таблица 2

Показатели «умственной» и физической работоспособности собак при однократном воздействии зарина

Доза зарина, мг/кг	Динамика значений измеряемого параметра ($x \pm Sx$) по срокам наблюдения							
	Время побежки в лабиринте, с							
	норма	30 мин	1 ч	2 ч	3 ч	5 ч	1 сут.	2 сут.
$4 \cdot 10^{-3}$	83 ± 5	80 ± 6	94 ± 5	$111 \pm 8^*$	$114 \pm 11^*$	96 ± 6	83 ± 4	86 ± 4
$8 \cdot 10^{-3}$	67 ± 1	78 ± 4	$82 \pm 3^*$	$85 \pm 4^*$	$89 \pm 5^*$	$101 \pm 12^*$	71 ± 3	68 ± 3
$12 \cdot 10^{-3}$	77 ± 4	90 ± 4	87 ± 6	$97 \pm 10^*$	$110 \pm 15^*$	$103 \pm 10^*$	85 ± 4	79 ± 2
	Количество правильных выборов в тесте на краткосрочную память							
	норма	30 мин	1 ч	2 ч	3 ч	5 ч	1 сут.	2 сут.
$4 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \pm 0,6$	$4,0 \pm 0,5$	$4,2 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,6$	$3,8 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,4$	$4,4 \pm 0,6$	$5,5 \pm 0,5$
$8 \cdot 10^{-3}$	$4,8 \pm 0,5$	$3,7 \pm 0,5^*$	$4,5 \pm 0,5$	$4,0 \pm 0,8$	$3,3 \pm 0,2^*$	$4,0 \pm 0,8$	$3,3 \pm 0,8^*$	$4,2 \pm 0,5$
$12 \cdot 10^{-3}$	$4,4 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,5^*$	$4,4 \pm 0,5$	$3,8 \pm 0,6$	$3,6 \pm 0,7^*$	$4,2 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,6$	$3,6 \pm 0,8$
	Индекс PWC ₂₀₀ , кг·м/(мин·кг)							
	норма	30 мин—1 ч	2—3 ч	5 ч	1 сут.	2 сут.		
$4 \cdot 10^{-3}$	27 ± 5	25 ± 4	26 ± 5	22 ± 4	26 ± 4	24 ± 1		
$8 \cdot 10^{-3}$	26 ± 5	25 ± 6	30 ± 8	29 ± 3	25 ± 3	28 ± 3		
$12 \cdot 10^{-3}$	29 ± 4	24 ± 3	24 ± 2	23 ± 5	24 ± 4	27 ± 4		

* Достоверное отличие от показателей нормы при $P \leq 0,05$.

Максимальная степень угнетения активности ацетилхолинэстеразы цельной крови для животных, подвергавшихся воздействию зарина в дозе $4 \cdot 10^{-3}$ мг/кг, была на уровне 16%, а при дозе зарина $8,0 \cdot 10^{-3}$ мг/кг среднее угнетение активности фермента на пике интоксикации составило $33 \pm 5\%$. Восстановление нарушенных функций происходило в течение от 3 до 6 часов с момента воздействия отравляющего вещества. Доза зарина $12,0 \cdot 10^{-3}$ мг/кг у половины животных вызывала более выраженную картину интоксикации, которую можно охарактеризовать как поражение легкой степени, что подтверждается средней степенью угнетения активности ацетилхолинэстеразы на пике интоксикации, равной $57,0 \pm 3\%$.

Результаты оценки «умственной» работоспособности животных после воздействия зарина по методу побежки в лабиринте свидетельствуют о достоверном снижении ее уровня независимо от вводимой дозы вещества. Данные нарушения развиваются уже через 1 ч после воздействия ФОВ и сохраняются на протяжении пятичасового обследования животных, нормализация работоспособности происходит в течение 1 — 2 сут.

Аналогичные изменения состояния «умственной» работоспособности после внутривенного введения зарина наблюдаются и в тесте на краткосрочную память. При этом отмечаются более выраженные нарушения в ранние сроки интоксикации и в ряде случаев просматривается дозозависимый характер изменений уровня работоспособности, что особенно заметно при анализе динамики ее восстановления.

Экспериментальные данные, полученные по методу PWC₂₀₀, свидетельствуют о том, что физическая работоспособность не претерпевает существенных нарушений во всем интервале испытанных доз зарина, прослеживается лишь небольшая тенденция к снижению ее уровня в период наблюдения до 1 сут. с полной нормализацией состояния на вторые сутки обследования животных. Данный факт можно объяснить незначительным стимулирующим влиянием ФОВ в

подпороговых и пороговых дозах на физическую работоспособность.

Особенности клинических проявлений повторного воздействия ФОВ на работоспособность собак исследовались при ежедневном внутримышечном введении малых доз зомана в течение пяти суток. Суммарные дозы в каждой серии эксперимента составили $2,24 \cdot 10^{-4}$, $5,12 \cdot 10^{-4}$ и $1,35 \cdot 10^{-3}$ мг/кг. В табл. 3 представлены обобщенные результаты исследований, обработанные с учетом наступления эффекта от воздействия вещества, соответствующего минимальному показателю потери работоспособности, а именно 20% для тестов на краткосрочную память и побежку по лабиринту и 30% при измерении показателя PWC₂₀₀. Как видно из приведенных данных, уровень «умственной» работоспособности собак по тесту на краткосрочную память при ежедневном введении зомана в подпороговой дозе, равной $0,1PD_{50}$, значительно снижался по мере нарастания получаемой дозы.

При оценке по методу побежки в лабиринте фиксировался более высокий уровень состояния работоспособности, что, вероятно, связано с механизмом образования прочных нервных связей, лежащих в основе формирования данного вида условно-рефлекторной деятельности. Признаки нарушения работоспособности обнаруживаются только при достаточно высокой суммарной дозе зомана, достигаемой при повторных его введениях.

Существенных нарушений физической работоспособности, оцениваемой по тесту PWC₂₀₀, не наблюдалось, что соответствует характеру токсического действия ФОВ на уровне испытанных доз.

В связи с различной чувствительностью интегральных методик оценки состояния организма, а также из-за неопределенности заключения об их диагностической значимости в случае нарастания подпороговых доз зомана, были проведены исследования в режиме подострого токсического воздействия. Зоман вводили собакам внутримышечно ежедневно в

Таблица 3

Показатели работоспособности собак при повторном воздействии малых доз зомана

Суммарная доза зомана, мг/кг	Тест на краткосрочную память		Тест на побежку в лабиринте		Тест PWC ₂₀₀	
	общее число с эффектом, животных		общее число с эффектом, животных		общее число с эффектом, животных	
		%		%		%
$2,24 \cdot 10^{-4}$	8	37	8	0	5	0
$5,12 \cdot 10^{-4}$	5	40	5	0	5	0
$1,35 \cdot 10^{-3}$	5	60	5	40	5	20

Показатели работоспособности собак при подостром воздействии зомана

Измеряемый параметр	Динамика значений параметра ($x \pm Sx$) по срокам наблюдения (сут.)								
	норма	7	12	21	27	35	41	49	68
Время побежки в лабиринте, с	72,0 ± 2,5	72,0 ± 2,8	67,0 ± 2,6	69,0 ± 2,9	64,0 ± 4,3	63,0 ± 4,2	68,0 ± 3,3	64,0 ± 2,1	65,0 ± 2,9
Количество правых выборов в тесте на краткосрочную память	5,0 ± 0,4	4,0 ± 0,4*	4,0 ± 0,4*	5,0 ± 0,3	4,0 ± 0,8	5,0 ± 0,3	4,0 ± 0,3	4,0 ± 0,5	5,0 ± 0,3
Индекс PWC ₂₀₀ , кг·м/(мин·кг)	29,0 ± 3,6	—	33,0 ± 3,5	—	28,0 ± 3,0	—	29,0 ± 4,9	—	29,0 ± 2,8

* Достоверное отличие от показателей нормы при $P \leq 0,05$.

дозе, равной 0,1PD₅₀, в течение 68 сут. Через 7 сут. и последующие определенные интервалы времени измеряли показатели работоспособности животных (табл. 4), а также измеряли активность ацетилхолинэстеразы цельной крови.

Как видно из данных табл. 4, при подостром воздействии малых доз зомана у отдельных животных фиксируются незначительные изменения индекса PWC₂₀₀, которые не выходят за пределы колебания нормы и существенно не отражаются на среднegrupповых величинах за весь период наблюдения. Зарегистрирован лишь один случай снижения PWC₂₀₀ на 34% (на сороковые сутки наблюдения), который может быть расценен как случайное событие, не меняющее общей картины сохранения физической работоспособности в течение всего периода обследования.

Оценка состояния «умственной» работоспособности по методу условно-рефлекторной побежки в лабиринте показала, что у всех животных, за исключением одного, во все сроки наблюдения отмечается стабилизация или увеличение скорости его преодоления. Данный эффект объясняется отчасти процессами закрепления нервных связей в коре головного мозга животных на фоне непрерывного условно-рефлекторного обучения. Немаловажное значение оказывает и стимулирующее влияние малых доз зомана на осуществление синаптической передачи в центральную нервную систему.

Оценка уровня «умственной» работоспособности по тесту на краткосрочную память в условиях подострого воздействия зомана показывает, что среднее значение измеряемого показателя снижается на 20% по отношению к норме в период наблюдения, за исключением 21, 35 и 68 сут. Снижение этого показателя на 20% является критериальной величиной частичной потери работоспособности. Следовательно, эф-

фект исследуемых доз зомана на «умственную» работоспособность, оцениваемый по тесту на краткосрочную память, можно рассматривать как границу значимого воздействия. Наиболее существенно данный эффект проявляется на 12 и 41 сут. от начала токсического воздействия, когда у 75% биообъектов отмечалось достоверное увеличение ошибок при выполнении этого теста.

Механизм наблюдаемых явлений гипотетически может быть представлен как закономерный процесс, который заключается в формировании первичной ответной реакции на поступление в организм ксенобиотиков, проявляющейся в достоверном снижении в течение первых двух недель «умственной» работоспособности. Затем развивается адаптация к действию периодически поступающего яда, позволяющая компенсировать на уровне целостного организма его токсические эффекты. Однако через 40 сут. происходит «срыв» адаптации, который выражается в частичной потере «умственной» работоспособности.

Экспериментальное исследование кожно-резорбтивного воздействия вещества VX в малых дозах на «умственную» работоспособность проведено на собаках в условиях однократного и повторного воздействия отравляющего вещества. В обобщенном виде экспериментальные данные представлены в табл.5.

В виду малой чувствительности теста PWC₂₀₀ при исследовании воздействия малых доз зарина и зомана оценку физической работоспособности в данной серии экспериментов не проводили.

Клинический комплекс симптомов интоксикации и общее состояние организма животных соответствовали картине классического поражения ФОВ на уровне пороговых и подпорого-

Показатели работоспособности собак в условиях однократного и повторного воздействия вещества VX

Измеряемый параметр ($\bar{x} \pm S_x$)	Норма	Доза вещества	
		0,2 PD ₅₀ однократно	1 PD ₅₀ повторно
Количество правильных выборов в тесте на краткосрочную память	4,4±0,2	3,6±0,6 (через 5 ч)	2,4±1,2 (через 2 сут.)
		3,2±0,6 (через 1 сут.)	4,2±0,6 (через 4 сут.)
Время побежки в лабиринте, с	78,0±4,7	86,0±7,6 (через 5 ч)	88,0±3,0 (через 2 сут.)
		87,0±3,6 (через 1 сут.)	89,0±5,4 (через 4 сут.)

вых доз с менее выраженными, чем при внутривенном введении, проявлениями, свойственными кожному нанесению вещества VX.

Результаты исследований, приведенные в табл. 5, свидетельствуют о существенном снижении уровня «умственной» работоспособности собак после однократного воздействия VX в дозе 0,2PD₅₀. Повторное нанесение вещества VX в дозе 1PD₅₀ приводило к полной потере работоспособности у 40% животных со значительным снижением ее уровня по оценке среднегруппового показателя. Однако последующее воздействие VX на четвертые сутки в той же дозе практически не оказывало влияния на уровень «умственной» работоспособности, что можно объяснить развитием начального периода адаптации организма к повторному токсическому воздействию. Полученные результаты показывают определенную тенденцию к увеличению времени преодоления лабиринта в течение всего периода обследования животных как после однократного, так и после повторного воздействия вещества VX, причем это время характеризуется примерно одинаковой величиной отклонения от исходного показателя.

Наблюдающиеся изменения уровня работоспособности свидетельствуют о большей устойчивости показателей побежки в лабиринте в сравнении с тестированием на краткосрочную память. Однако интерпретация результатов по среднеарифметическим величинам не в полной мере дает представление о биологической сущности и цене нарушения работоспособности в связи с неоднозначным вкладом в наблюдаемый процесс патологических изменений каждого из пораженных биообъектов.

* * *

Исследование воздействия фосфорорганических отравляющих веществ на уровень работоспособности животных с помощью интегральных методов оценки показало достаточно высокую чувствительность и информативность тестов на краткосрочную память и на условно-рефлекторную побежку в лабиринте во всем интервале испытанных доз — от подпороговых до доз, вызывающих развитие легких степеней пора-

жения. Однако оценки диагностической значимости апробированных методов исследования только по среднеарифметическим значениям регистрируемых показателей нельзя признать корректными, так как при данном подходе, по-видимому, «маскируется» истинная биологическая цена воздействия ФОВ на организм биообъектов.

Что касается метода PWC₂₀₀, то вопрос о его применимости для диагностики малых воздействий ФОВ на уровень физической работоспособности в апробированном варианте остается проблематичным. К положительному результату может привести модификация этого теста по пути увеличения предъявляемых физических нагрузок. Пока с достаточной определенностью можно сделать заключение об эффективности применения теста на краткосрочную память для исследования физиологического воздействия фосфорорганических отравляющих веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Саноцкий И.В. и др. В кн.: К вопросу о критериях оценки донозологических состояний. Л.: Наука, 1979.
2. Трахтенберг И.М. и др. Методы изучения хронического действия химических и биологических загрязнений. Рига: Зинатне, 1987.
3. Жолус Б.Н. и др. В кн.: К вопросу о критериях оценки донозологических состояний. Л.: Наука, 1979.
4. Литвинов И.Н. и др. Медицинские проблемы охраны окружающей среды. М.: Медицина, 1981.
5. Прокопенко Ю.Н. и др. Состояние и перспективы развития гигиены окружающей среды. М.: Медицина, 1985.
6. Методические рекомендации по использованию поведенческих реакций животных в токсикологических исследованиях для целей гигиенического нормирования. Киев: Здоровье, 1980.
7. Котлец А.И. и др. Гигиена и санитария, 1991, № 7.
8. Авалиани С.Л. и др. В кн.: Проблемы донозологической гигиенической диагностики. Л.: Наука, 1989.
9. Саноцкий И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ. М.: Медицина, 1970.