doi: 10.17116/sudmed201558232-35

Морфологические и биохимические особенности ингаляционного отравления аммиаком

К.м.н. Е.Г. ГУБЕЕВА[1,2], д.м.н., проф. В.А. СПИРИДОНОВ[1,2], эксп. А.Н. ЗУБКОВА[2]

[1]Кафедра судебной медицины (зав. — д.м.н., доц. В.А. Спиридонов) Казанского государственного медицинского университета, Казань, Россия, 420012; [2]ГАУЗ «Республиканское бюро судебно-медицинской экспертизы» (нач. — М.И. Тимерзянов) Министерства здравоохранения Республики Татарстан, Казань, Россия, 420029

The specific morphological and biochemical features of inhalation poisoning with ammonia

E.G. GUBEEVA, V.A. SPIRIDONOV, A.N. ZUBKOVA

Federal budgetary educational institution of higher professional education «Kazan State Medical University», Kazan, Russia, 420012; Republican Bureau of Forensic Medical Expertise, Tatarstan Ministry of Health, Kazan, Russia, 420029

В ходе экспериментальных исследований на лабораторных животных (крысы, кролики) выявили морфологические и биохимические изменения, возникающие при отравлении парами аммиака. Установлено, что имеются некоторые закономерные особенности этого вида отравлений. Показано, что определение биохимических параметров крови позволяет оценить работу гепатобилиарной и сердечно-сосудистой систем. Измерение pH крови свидетельствует об ошелачивании крови.

Ключевые слова: отравление аммиаком, гистологическое и биохимическое исследование, диагностика.

This experimental study using the laboratory animals (rats and rabbits) has demonstrated the morphological and biochemical changes associated with inhalation poisoning with ammonia. Certain regular features of this form of intoxication were revealed. Specifically, the determination of the major biochemical characteristics of blood makes it possible to evaluate the performance of the hepatobiliary and cardiovascular systems. The results of blood pH measurement give evidence of its alkalinization.

Keywords: ammonia intoxication, histological and biochemical studies, diagnostics.

Человеческое общество, несмотря на развитие науки и техники, часто оказывается незащищенным от различных стихийных бедствий и техногенных катастроф. Самые современные технологии не могут обеспечить нашу безопасность. Быстрые темпы роста производства, близость промышленных объектов к населенным пунктам и городам с большой численностью жителей создают опасность массовых поражений за короткий промежуток времени [1]. Одним из самых распространенных аварийных химически опасных веществ считается аммиак, широко применяемый в промышленности и сельском хозяйстве [2]. Аварии с утечкой аммиака нередко происходят в разных странах. Так, в Хьюстоне (Техас, США) в 1976 г. на городском шоссе произошло столкновение цистерны, перевозящей сжиженный аммиак, в результате которого разлилось 19 т вещества и погибли 5 человек, а общее число пострадавших составило 150 человек. В 1977 г. и 1979 г. в авариях на железной дороге во Флориде (США) пострадали 90 и 46 человек соответственно. В 1976 г. произошел взрыв на заводе удобрений, погиб 21 человек. В 1984 г. в Лос-Пахаритос (Мексика) был прорыв трубопровода, пострадали 46 и погибли 4 человека [3].

В Республике Татарстан хорошо развита химическая, целлюлозно-бумажная и пищевая промышленность. Всего в республике 293 потенциально аварийно опасных предприятия. Согласно классификации ВОЗ, по степени химической опасности объекты делятся на три категории. К 1-й категории относятся предприятия, имеющие запасы аммиака более 2500 т, ко 2-й — 500—2500 т и к 3-й категории — 10—500 т [4].

Транспортировка аварийноопасных веществ, нарушение технологии производства, изношенность оборудования, несоблюдение техники безопасности, террористические акты в любое время могут привести к внезапным массовым потерям. Если при чрезвычайной ситуации погибают люди, то их тела подвергают обязательному судебно-медицинскому исследованию. Часто обстоятельства происшествия неизвестны, а так как аммиак — летучий газ, то на месте обнаружения погибших его запах может не определяться.

Учитывая потенциальную опасность отравления парами аммиака, мы изучили диагностику этого вида отравлений. Эффективные методы выявления аммиака в крови и внутренних органах в судебно-медицинской практике отсутствуют [5]. Согласно данным литературы [5, 6], при

© Коллектив авторов, 2015

[1]e-mail: gubeevae@mail.ru; [2]e-mail: zubkova_alina@mail.ru

отравлении парами аммиака смерть наступает от серозно-геморрагического отека легких.

Цель исследования — экспериментальным путем выявить особенности диагностики смертельного отравления парами аммиака, которые могут быть использованы в практической работе судебных медиков в чрезвычайной ситуации.

Материал и методы

Провели серийные эксперименты на лабораторных животных (крысы, кролики). Для эксперимента были отобраны 20 половозрелых крыс, самцов и самок с массой тела 180—220 г и 10 кроликов, самцов и самок, породы «Серый великан» с массой тела 2,5—3,0 кг. Две контрольные группы животных (по 5 животных каждого вида) подбирали по тем же критериям.

Экспериментальные исследования проводили в условиях, приближенных к чрезвычайной ситуации на производстве, в специализированной камере объемом 2,3 м^3, имеющей герметично закрывающийся погрузочно-разгрузочный люк, систему вытяжной вентиляции для создания отрицательного давления внутри камеры. Давление в камере определяли с помощью манометра. В камере имелись испаритель аммиака (САГ-1) и вентилятор. Для получения паров аммиака действующее вещество в виде 25% водного раствора вносили в испаритель и подогревали до температуры 60 °С. Концентрацию паров аммиака определяли с помощью универсального газоанализатора УГ-2. Пробы воздуха из камеры отбирали каждые 10 мин в течение 2 ч. Кроме того, использовали газожидкостный хроматограф Кристалл 5000.2 для определения содержания аммиака по методу абсолютной калибровки.

У животных извлекали гортань и исследовали с помощью стереомикроскопа Leica MZ 125 при увеличении до 50 раз. Гортань выделяли отдельным комплексом, фиксировали в 10% нейтральном формалине и затем изготовляли поперечные гистологические срезы.

Объекты для гистологического исследования фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Все препараты изучали на микроскопе Leica DM1000 при увеличении до 1000 раз в проходящем свете и с использованием фазового контраста. Обработку фотографий проводили с помощью программы Photoshop 7.

Активность ферментов, нейтрализующих аммиак, в организме крысы и человека схожа, поэтому биохимическое исследование крови проводили на крысах [7]. Для этого брали кровь из правой половины сердца через 30 мин после наступления смерти. Определяли содержание глюкозы, мочевины, общую активность лактатдегидрогеназы, количество средних молекул.

Содержание глюкозы рассчитывали энзиматическим колориметрическим методом с депротеинизацией (набор реагентов Эко-Лаб). В пробирки вносили по 0,45 мл 3% раствор трихлоруксусной кислоты, добавляли 0,05 мл исследуемой крови, перемешивали и центрифугировали (центрифуга ОПн-3) при скорости 3000 об/мин в течение 10 мин. Далее в пробирки вносили по 2,2 мл рабочего раствора, добавляли 0,22 мл надосадочной жидкости. По описанной ранее методике готовили стандартный и контрольный растворы. Снимали оптическую плотность на фотоэлектроколориметре (КФК-3) при длине волны 540 нм в кювете с толщиной рабочего слоя 0,5 см, напротив контроля. Расчет производили по формуле:

$$C_{\text{глюкозы}} = E_{\text{опыт}}/E_{\text{ст}} \cdot 10 \text{ ммоль/л}.$$

Общую активность лактатдегидрогеназы определяли кинетическим методом в сыворотке крови (Диакон-ДС). К 4 объемам буферного раствора pH 7,5, содержащего однозамещенный калия фосфат, пируват, натрия азид, добавляли 1 объем буферного раствора, pH 9,6, содержащего трис, никотинамидадениндинуклеотид (НАДН), натрия азид, инкубировали в течение 5 мин при температуре 37 °С. В пробирку вносили 0,01 мл сыворотки крови и 1 мл полученного рабочего реагента. Пробу перемешивали и инкубировали в кювете с длиной оптического пути 10 мм при температуре 37 °С в течение 1 мин, затем измеряли оптическую плотность пробы Е1 при длине волны 340 нм против воздуха, включали секундомер и через 1 мин аналогичным образом измеряли оптическую плотность пробы Е2. Рассчитывали ΔЕ=Е1−Е2. Активность ЛДГ=ΔЕ/мин · 16 030.

Содержание мочевины определяли уреазным методом (VITAL DIAGNOSTICS SPb). В пробирки вносили по 0,1 мл раствора уреазы. В опытную пробу добавляли 0,01 мл сыворотки крови, в стандартную — 0,01 мл раствора мочевины (5 ммоль/л), в контрольную — 0,01 мл дистиллированной воды. Реакционную смесь тщательно перемешивали и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Затем во все пробы вносили по 1 мл фенол-нитропруссидного реагента и 1 мл гипохлорита. Помещали в термостат (37 °С) на 15 мин. После окончания инкубации пробы охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность опытной и стандартной пробы против контрольной в кюветах с толщиной поглощающего слоя 5 мм при длине волны 540 нм, напротив контроля. Расчет производили по формуле:

$$C_{\text{мочевины}} = E_{\text{оп}}/E_{\text{ст}} \cdot 5 \text{ ммоль/л}.$$

Содержание средних молекул в сыворотке крови определяли по методу Габриэляна. В пробирку вносили 1 мл сыворотки крови, добавляли 0,5 мл 10% раствор трихлоруксусной кислоты, центрифугировали 30 мин со скоростью 2000 об/мин. К 0,5 мл центрифугата добавляли 4,5 мл дистиллированной воды. Снимали оптическую плотность на спектрофотометре (СФ-46 ЛОМО) при длине волны 490 нм, в кювете с толщиной рабочего слоя 1 см, напротив дистиллированной воды.

Измеряли pH крови с помощью универсальной индикаторной бумаги Лах-Нер.

В соответствии с задачами исследования, учетом характера материала для статистической обработки полученных данных использовали как параметрические, так и непараметрические методы статистики. Производили расчет среднего арифметического, средней ошибки средней арифметической. Сравнение достоверности различий средних значений по *t*- критерию Стьюдента и распределений по критерию χ^2. Полученные данные подвергали статистической обработке в среде программного продукта Statistica 5.0.

Результаты и обсуждение

При концентрации в камере паров аммиака 32,6 мг/л первые признаки интоксикации у крыс наблюдали через 2—4 мин в виде беспокойства, чиханья, которые усилива-

лись через 7—10 мин: животные начинали «потирать» глаза, нос. Через 12—13 мин от начала эксперимента появлялись признаки затруднения дыхания: животные активно заглатывали воздух, вытягивали шею вперед, затем присоединялись хрипы, саливация, атаксия, тремор, тонические и тетанические судороги. Все подопытные крысы погибали в течение 3 ч.

У кроликов явления интоксикации возникали при более низких концентрациях аммиака — 16,3 мг/л через 5—7 мин и выражались в учащении дыхания, признаках раздражения глаз, носа. Через 25—35 мин от начала эксперимента проявлялись атаксия, тремор, саливация, учащалось дыхание, а спустя 30 мин происходило снижение частоты дыхания, изо рта и носа выделялась пенистая жидкость, иногда с примесью крови. Все кролики погибали в течение 2 ч.

При изучении гистологических препаратов крыс и кроликов выявили общие признаки в виде паретического капиллярно-венозного полнокровия внутренних органов, периваскулярных кровоизлияний в головном мозге, печени, сердце, почках, селезенке, тимусе. В просветах сосудов определялись скопления лейкоцитов, лимфоцитов. Обнаружены признаки преимущественно вакуольной дистрофии печени, почек с участками некрозов паренхиматозных клеток. В печени описанные изменения имели наибольшую выраженность вокруг центральных вен. В просветах сосудов легких — скопления эозинофильных мелкопузырчатых масс, при этом стенки сосудов эозинофильно окрашены, набухшие, гомогенизированные, с участками нарушения целостности. В периваскулярных пространствах между набухшими волокнами соединительной ткани также имелись скопления мелкопузырчатых эозинофильных масс. Наблюдали признаки эмфиземы легких с очаговым серозно-геморрагическим отеком. Бронхи в состоянии неравномерно выраженного спазма, на поверхности эпителия — скопления эозинофильных масс. Обнаружили участки гомогенизации стенок бронхов. В головном мозге проявления дистрофии нейронов по гипоксическому типу сочетались с отеком глии. Стенки сосудов головного мозга имели неравномерно выраженные признаки гомогенизации, набухания, некоторые были утолщены, гомогенной эозинофильной окраски с фрагментарным истончением. У кроликов кровоизлияния были более выраженные, чем у крыс.

В ходе исследования гортани с помощью стереомикроскопа у обоих видов экспериментальных животных обнаружили признаки резкого спазма голосовой щели и заполнение оставшегося просвета эозинофильными слизистыми массами. В гистологических срезах гортани наблюдали десквамацию слизистого слоя с гомогенизацией подлежащих волокнистых структур, отек, кровоизлияния.

При определении pH сыворотки крови крыс выявили сдвиг вправо до 8,5—9,0.

Содержание глюкозы было повышено по отношению к контролю в 2—5 раз. Глюкоза — основной показатель углеводного обмена, повышение ее количества может быть вызвано стресс-реакцией организма в ответ на выброс гормонов коры надпочечника [8]. Содержание мочевины в крови было в 3 раза больше, что указывает на нарушение выделительной функции почек [9]. Количество средних молекул превышало их число в контроле в 2 раза, что может служить показателем интоксикации [10]. Накопление средних молекул является не только маркером эндотоксикации, но и фактором, усугубляющим течение патологического процесса, играя роль вторичных токсинов [11]. Источником образования средних молекул является разрушающийся белок, что указывает на эндогенную интоксикацию, почечно-печеночную недостаточность. Общая активность лактатдегидрогеназы превышала норму в 4—5 раз, что может свидетельствовать о нарушении структуры печени, почек, легочной ткани [12].

Таким образом, в ходе проведенных исследований удалось установить, что ингаляционное отравление аммиаком приводит к резко выраженному спазму гортани и отеку, способствующих нарушению как вдоха, так и выдоха, и, как следствие, к развитию асфиксических признаков (дистрофия нейронов по гипоксическому типу, полнокровие, кровоизлияния). При исследовании были обнаружены колликвационный некроз гортани, острая эмфизема легких с очаговым серозно-геморрагическим отеком, набухание стенок сосудов легких вплоть до некроза, скопление мелкопузырчатых эозинофильных масс в сосудах и периваскулярно. Выявили также признаки некротических изменений стенок сосудов головного мозга.

Описанные изменения обусловлены проявлением активного действия аммиака, который больше, чем другие газы, растворяется в воде и, попадая в организм, связывается с жидкостью, образуя щелочное соединение гидроокись аммония [12]. Сдвиг pH крови вправо также свидетельствует об ощелачивании крови при отравлении аммиаком.

Выводы

Проведенные исследования позволили выявить морфологические изменения, которые могут свидетельствовать об ингаляционном отравлении аммиаком. Так, обнаруженные в гистологических препаратах отек головного мозга с дистрофией нейронов по гипоксическому типу, набухание стенок сосудов легких и головного мозга с нарушением их целостности вплоть до некроза, скопление мелкопузырчатых масс в просветах сосудов и периваскулярно наряду с признаками колликвационного некроза гортани и сдвигом pH крови вправо до не совместимых с жизнью значений (8,5—9,0) можно считать характерными для ингаляционного отравления аммиаком и использовать для подтверждения данного диагноза. Кроме того, следует отметить наличие резко выраженного спазма голосовой щели. Биохимические показатели демонстрируют проявление глубокой интоксикации, нарушение структуры и функции внутренних органов. Перечисленные изменения могут быть полезны в практической работе судебно-медицинских экспертов, особенно при чрезвычайных ситуациях, связанных с массовой гибелью людей и необходимостью проведения экспертных исследований в оперативном порядке.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Литвинов Н.Н., Казачков В.И.* Новые подходы к оценке риска острых отравлений при техногенных аварийных выбросах (на примере аммиака и хлора). Мед труда и пром экол 1998; 9: 1—12.
2. *Литвинов Н.Н., Казачков В.И., Григоревская З.П., Боданский М.Д., Иванов А.Ю., Цыганов С.С., Шмелев К.В., Ягунд Г.К.* Прогноз ингаляционного поражения человека при аварийном выбросе аммиака и хлора методом динамической концентрации. Мед труда и пром экол 2000; 8: 10—16.
3. *Элленхорн М.Дж.* Медицинская токсикология: диагностика и лечение отравлений у человека. Т. 2. Пер. с англ. М: Медицина 2003.
4. *Динмухаметов А.Г.* Прогнозирование возможных последствий аварий на объектах химической промышленности Республики Татарстан. Обществ здоровье и здравоохр 2009; 1: 95—99.
5. *Хохлов В.В.* Судебная медицина: Руководство. Изд-е 3-е перераб. и доп. Смоленск 2010.
6. *Могош Г.* Острые отравления. Бухарест: Медицинское издательство 1984.
7. *Косенко Е.А., Каминский Ю.Г.* Клеточные механизмы токсичности аммиака. М: Изд-во ЛКИ 2008.
8. *Качина Н.Н.* Посмертная оценка гликемии по уровню глюкозы и гликозилированного гемоглобина крови. Суд-мед эксперт 1991; 4: 7—10.
9. *Назаренко Г.И., Кишкун А.А.* Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М: Медицина 2000.
10. *Иванова С.А., Алифирова В.М., Лебедева В.Ф., Кротенко Н.В.* Клинико-диагностическое значение молекул средней массы у больных психическими и неврологическими расстройствами: пособие для врачей. Томск 2010.
11. *Карякина Е.В., Белова С.В.* Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений. Клин лаб диагност 2004; 3: 4—8.
12. *Полеес М.Э., Душечкина И.И.* Аналитическая химия. М: Медицина 1987.