



**Государственный научно-исследовательский испытательный институт
военной медицины**

Научно-исследовательский испытательный центр
прикладных исследований и полигонных испытаний

**Исследование токсических поражений
периферической нервной системы:
интерпретация и трансляция экспериментальных данных**

Ильинский Н.С., к.м.н. Тюнин М.А.

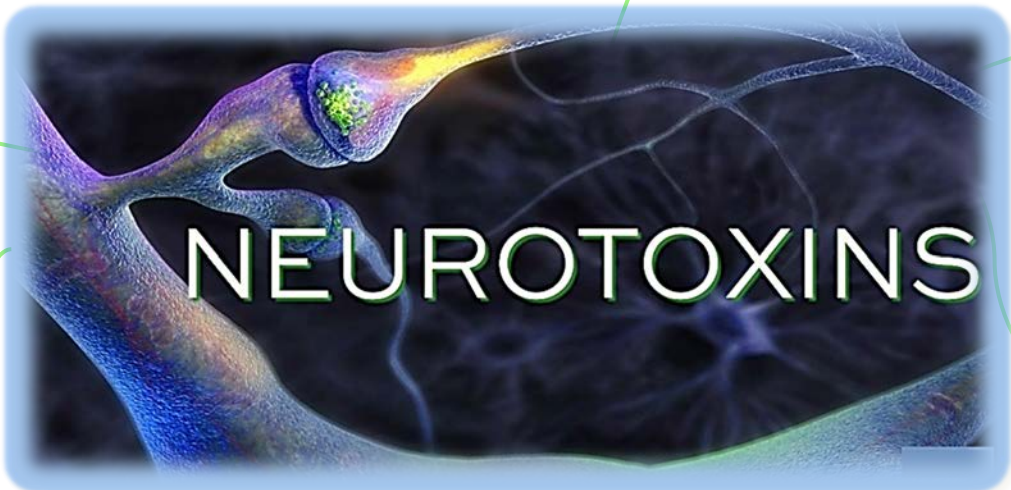
Докладчик: Ильинский Никита Сергеевич

Санкт-Петербург, 2021 г

Актуальность

Широкая распространенность нейротоксичных побочных эффектов лекарственных средств

Высокая восприимчивость периферической нервной системы (ПНС) к разного рода ксенобиотикам



Востребованность скрининговой оценки нейротоксичных нежелательных эффектов новых фармакологически активных веществ или комбинаций в экспериментах на грызунах

Необходимость моделирования заболеваний ПНС в рамках доклинических исследований и разработки новых подходов к терапии

Различное толкование неврологической терминологии в клинической и экспериментальной медицине

Повышение внешней валидности экспериментальных моделей заболеваний ПНС и ЦНС

Основные категории нейротоксикантов

Лекарственные
средства



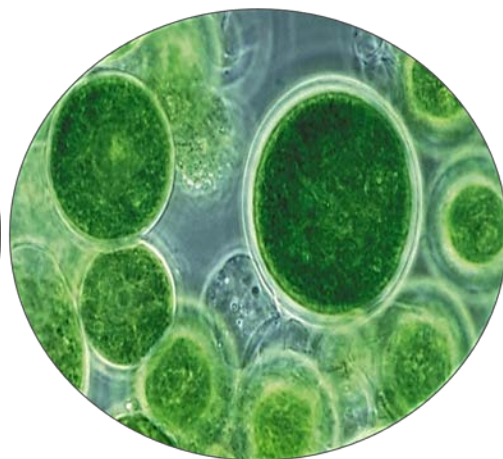
Производственные
(промышленные или профессиональные)
яды



Токсиканты умышленного
применения
(наркотические вещества,
химическое оружие)



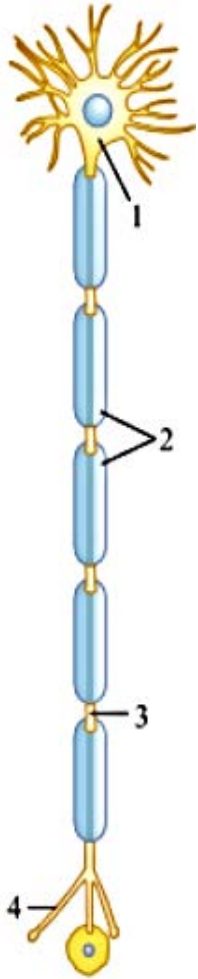
Биотоксины
(растительного,
животного или
бактериального
происхождения)



Химические
загрязнители
окружающей среды
(экоотоксиканты)



Мишени нейротоксикантов в периферической нервной системе



Мишень

1 – Тела нейронов

(дорсальные ганглии, мотонейроны):

2 – Миелиновая оболочка смешанных нервов: токсин *Corynebacterium diphtheriae*, амиодарон, такролимус, гексакарбон

-преимущественно сенсорные :

-преимущественно двигательные:

3 – Аксоны смешанных нервов:

4 – Нервные терминали и нервно-мышечный синапс:

-пресинаптические структуры:

-синаптические структуры:

-постсинаптические структуры:

Пример

цисплатин, ртуть, В₆

доксорубицин, метилртуть

токсин *Corynebacterium diphtheriae*, амиодарон, такролимус, гексакарбон

таллий, талидомид, цисплатин, пиридоксин, этанол, метронидазол, нитрофураны

ФОС, амиодарон, н-гексан, свинец винкристин, нитрофураны, циметидин

фосфолипаза А2, тетаноспазмин, таллий, этанол, органические растворители

ботулотоксины, тетаноспазмин, сакситоксин, тетродотоксин

ФОС, карбаматы, фасцикулины

курареподобные средства, конотоксины, аконитин анатоксин-а

Лекарственные средства ухудшающие течение миастении или вызывающие ее *de novo*

Table 1. Drugs reported to cause de novo MG or MG exacerbation through altering the immune response.

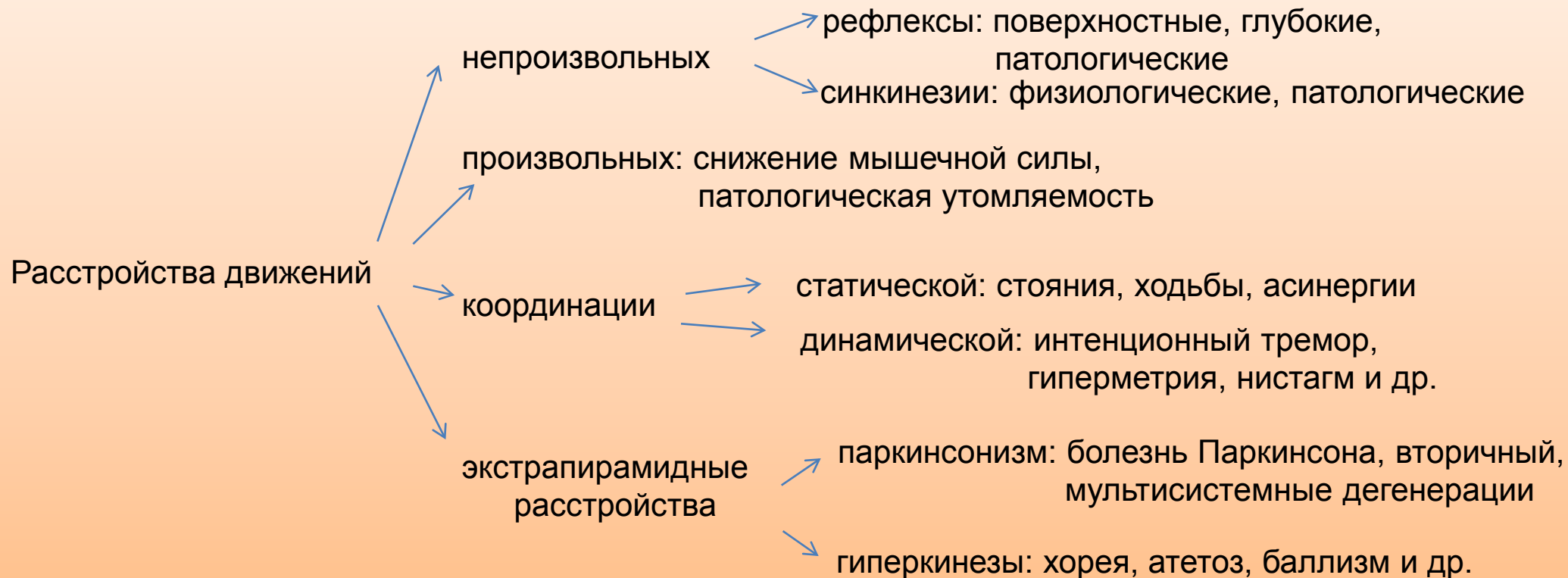
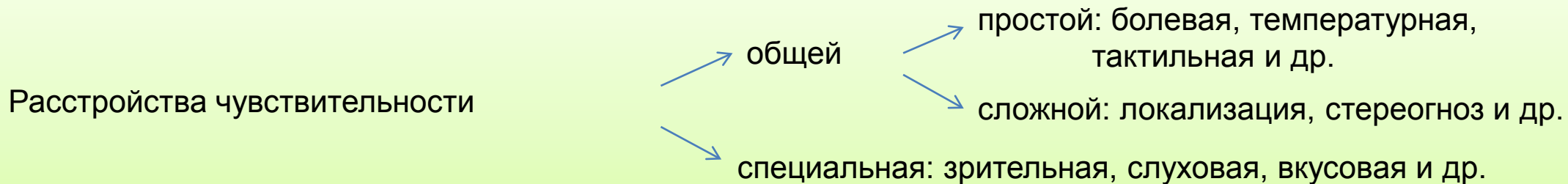
Drug	Mechanism	ADR Probability	Comments
Immune Checkpoint inhibitors	T cell activation Increased ratio of T effector to T regulatory cells, B cell activation, autoantibody production, cytokines such as IL-17	Definite	Avoid after emergence of life-threatening MG If to be used in MG patients, pre-treat with steroids, IVIG, or plasmapheresis
D-Penicillamine	Modification of MHC or other molecules on the surface of antigen-presenting cells	Definite	Discontinue and avoid if MG occurs
Tyrosine kinase inhibitors *	? Unspecified immune dysregulation Inhibition of neuromuscular transmission (with tandutinib)	Doubtful (probable with tandutinib)	Not contraindicated, association rarely reported
Interferons	Immune dysregulation through changes in cytokines, natural killer cells, alteration of lymphocyte profiles	Possible	Not contraindicated, association rarely reported
Statins *	Shift in T cell polarization Superimposed myopathy Mitochondrial toxicity	Probable	Discontinue and avoid in rare cases of emergence or exacerbation of MG
Corticosteroids	Unknown; possible direct effect on neuromuscular transmission at high doses	Definite	Avoid starting high doses, if high doses are to be started, consider pretreatment with IVIG or plasmapheresis

ADR – adverse drug reaction

Table 2. Drugs associated with MG-like symptoms, unmasking and exacerbation of MG, through their adverse effect on neuromuscular transmission.

Drug	Mechanism	ADR Probability	Comments
Macrolides	Impair neuromuscular transmission, possibly at presynaptic level	Definite	Avoid in MG patients if there is another alternative, otherwise closely monitor
Fluoroquinolones	Impair neuromuscular transmission, pre and postsynaptic levels	Probable	Avoid in MG patients if there is another alternative, otherwise closely monitor
Aminoglycosides	Impair neuromuscular transmission, pre and postsynaptic levels	Definite	Avoid in MG patients if there is another alternative, otherwise closely monitor
Penicillins	Unclear, impaired neuromuscular transmission in an animal model	Probable	Can be used in MG patients as MG exacerbation is rare
β -adrenergic blockers	Unclear effect on neuromuscular transmission	Possible	Can be used in stable MG patients, monitor closely, especially early after starting.
L type Calcium channel blockers	Unclear effect on neuromuscular transmission	Possible	Can be used in stable MG patients, monitor closely, especially early after starting.
Class Ia antiarrhythmics	Impair neuromuscular transmission, pre and postsynaptic levels	Definite	Avoid in MG patients if there is another alternative, otherwise closely monitor
Magnesium	Presynaptic (blocks release of ACh) and postsynaptic	Definite	Caution and close monitoring are advised in magnesium replacement (specially parenteral) in MG patients
Neuromuscular blockers and inhalation anesthetics	Postsynaptic neuromuscular block	Definite	Nondepolarizing NMBs and inhalation anesthetics better be avoided; if used, observe close postop monitoring, consider using acetylcholinesterase inhibitor and sugammadex

Основные типы неврологического дефицита



Основные типы неврологического дефицита (продолжение)

Расстройства сознания

- качественные (делирий, онейроид, аменция и др.)
- количественные (оглушение, сопор, кома I–IV ст.)

Расстройства высших мозговых
(когнитивных) функций

- агнозии: астереогноз, зрительная, слуховая, и др.
- апраксии: идеаторная, моторная, афферентная, конструктивная, лобная
- афазии: моторная, сенсорная, семантическая и др.

Расстройства вегетативных
функций

- зрачковые реакции
- ортостатическая гипотензия, вариабельность ритма сердца, рефлекс Даньини – Ашнера и др.
- дермографизм, потоотделение, терморегуляция
- функции тазовых органов

Определения

Паралич – расстройство двигательной функции в виде полного отсутствия произвольных движений вследствие нарушения **иннервации** соответствующих мышц. При **частичном** нарушении двигательной функции говорят о **парезе**.

Параличи (парезы) разделяют на периферические и центральные в зависимости от уровня поражения корково-мышечного пути.

Периферические парезы подразделяют на типы: невральный, полиневритический, корешковый, сегментарный.

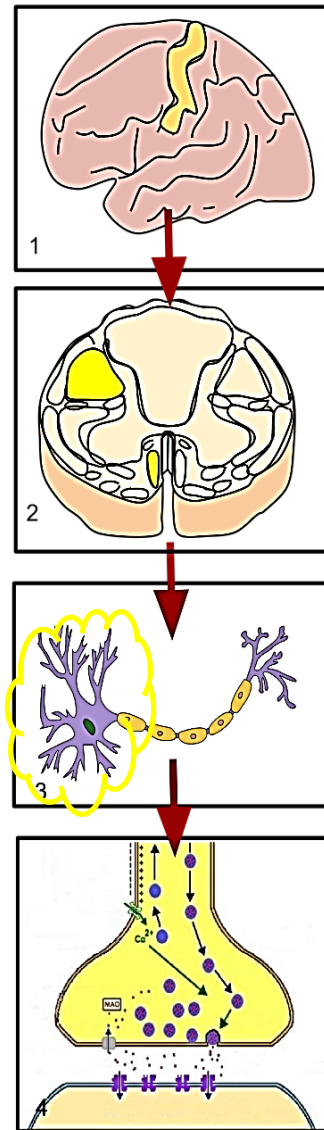
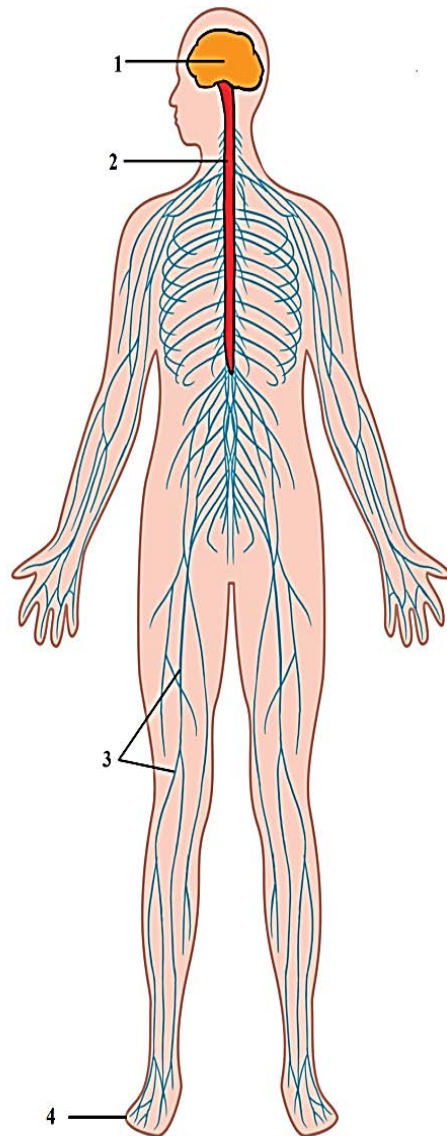
Параличи **не неврогенной** природы – двигательные расстройства, обусловленные первичным поражением мышц, путей глубокой чувствительности или синапсов (миастенические синдромы)



мышечная слабость (патологическая утомляемость)

Для оценки двигательных расстройств необходимо выполнять одновременное сравнительное исследование комплекса соответствующих диагностических приемов

Уровни поражения корково-мышечного (пирамидного) пути



Центральный двигательный нейрон

- ✓ снижение объема активных движений и (или) мышечной силы на контралатеральной стороне,
- × **повышение** мышечного тонуса,
- × **повышение** физиологических рефлексов, замыкающихся на паретичных мышцах,
- × патологические рефлексы,
- × патологические синкинезии

Периферический двигательный нейрон

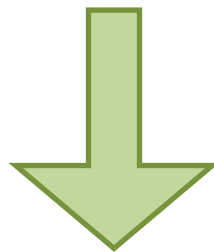
- ✓ снижение объема активных движений и (или) мышечной силы, патологическая утомляемость (постсинапс)
- × **снижение** мышечного тонуса,
- ± снижение (отсутствие) физиологических рефлексов, замыкающихся на этих мышцах,
- ± атрофия или гипотрофия паретичных мышц,
- ± фасцикуляции (или фибрилляции) пораженных мышц

Структура двигательных функций

Произвольные движения полноценно реализуются при сохранности:

- 1) кинестетической (афферентной) основы движения,
- 2) кинетической (эфферентной) основы движения,
- 3) зрительно-пространственной ориентации движения,
- 4) программирования движения.

Апраксия – нарушение сложных целенаправленных движений (навыков), сформировавшихся в онтогенезе, при **отсутствии признаков паралича** или инкоординации движений.

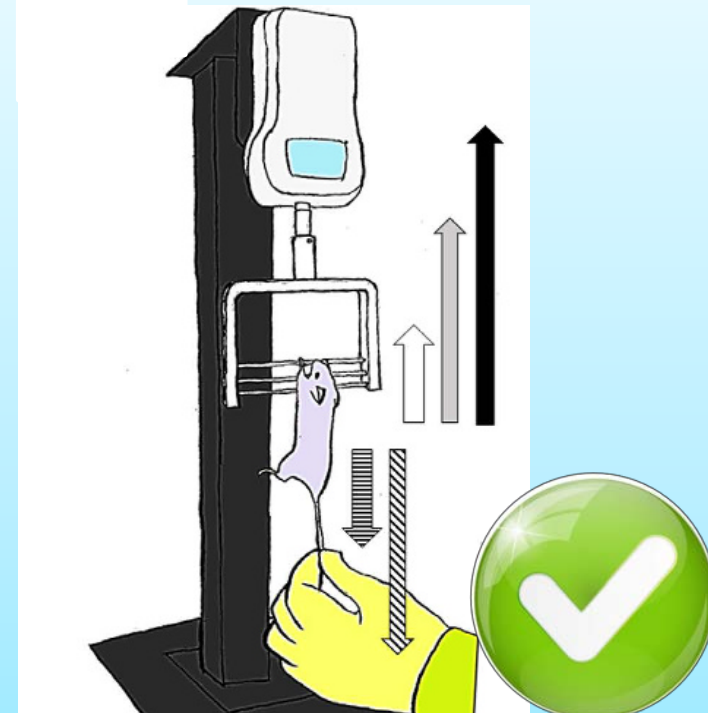
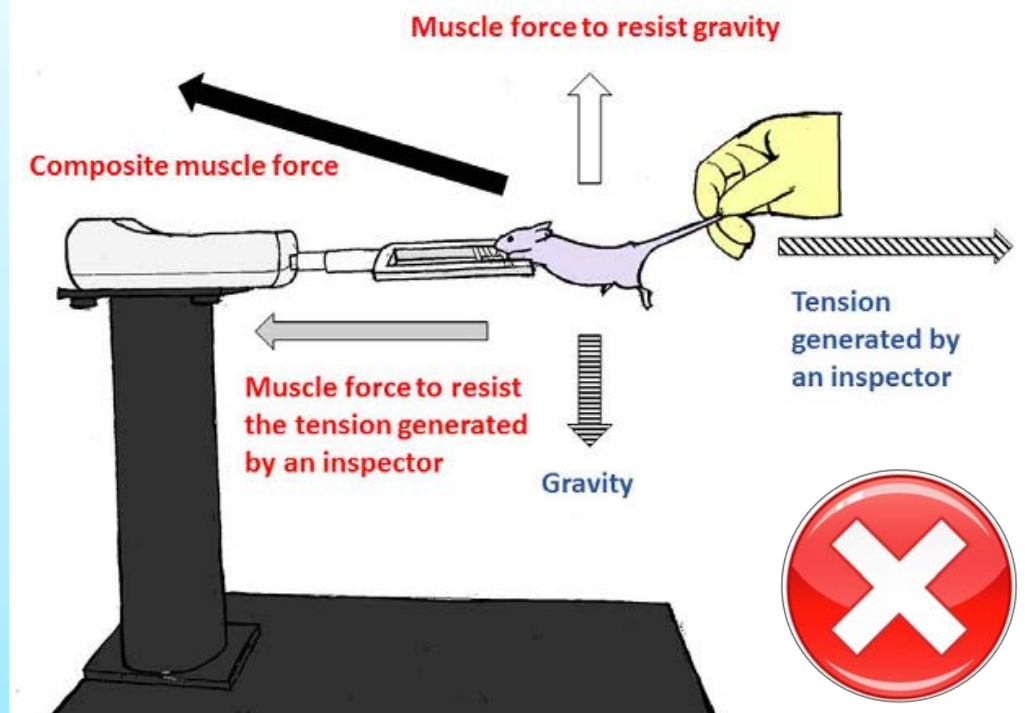


Потребность в четких диагностических критериях нарушений функций ПНС в эксперименте
Дифференцированный подход к оценке результатов комплексного исследования
неврологического дефицита

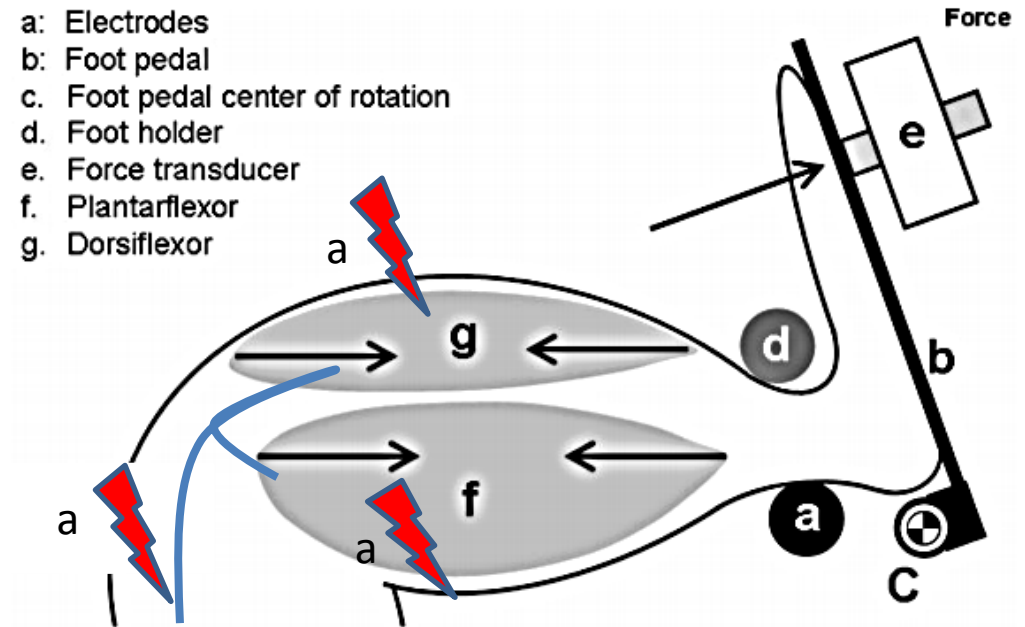
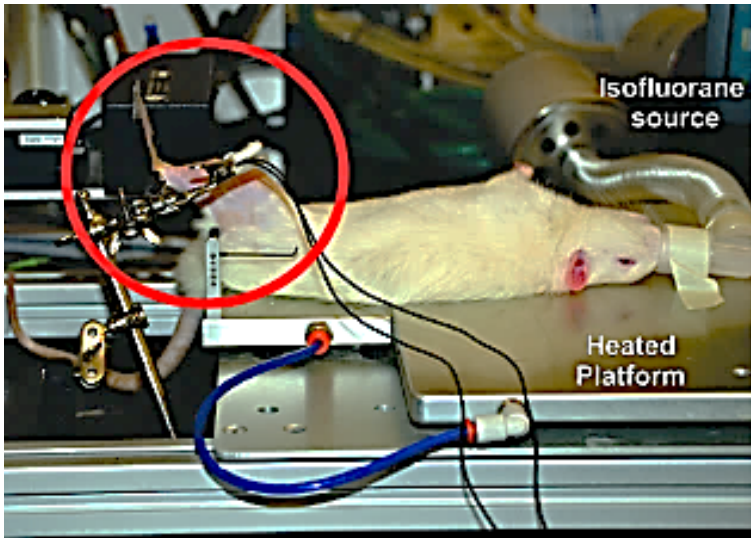
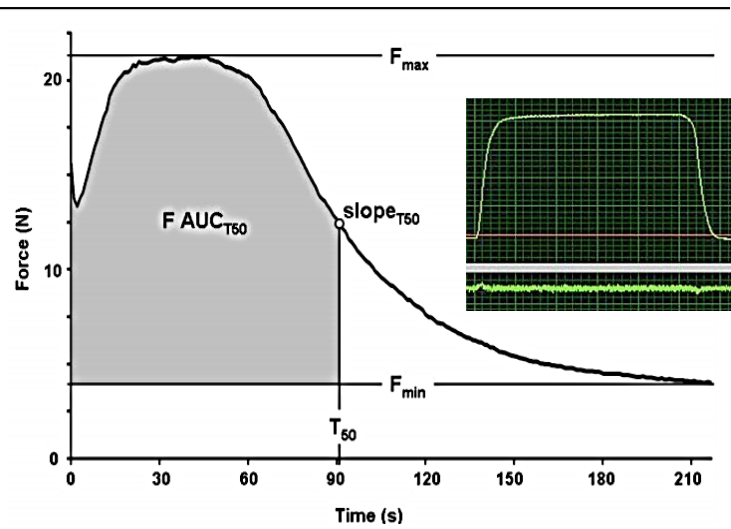
Наиболее распространенные методики исследования двигательных функций у лабораторных грызунов

Методика	Функция
Удерживания на решетке	Мышечная сила
Аппаратное измерение силы захвата	Мышечная сила
Подтягивание на горизонтальной перекладине	Мышечная сила/мышечный тонус (?)
Методы вращающегося стержня («Ротарод»)	Координация движений
Бег на третбане	Физическая работоспособность (?)
Ипсилатеральный сгибательный рефлекс	Болевая чувствительность, проводимость проксимальных отделов двигательных нервов
Пальпация мышц живота	Мышечный тонус (?)

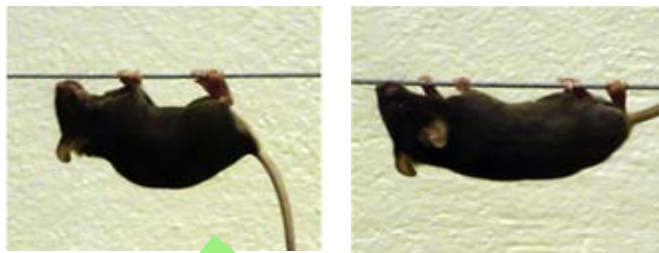
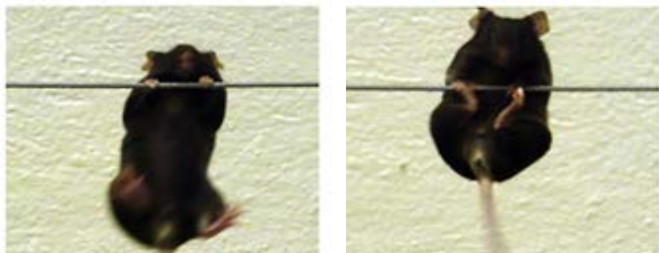
Исследование силы мышц



Исследование силы мышечных сокращений в ответ на электронейростимуляцию



Подтягивание на горизонтальной перекладине: сила или тонус?



Switonski P.M., 2011

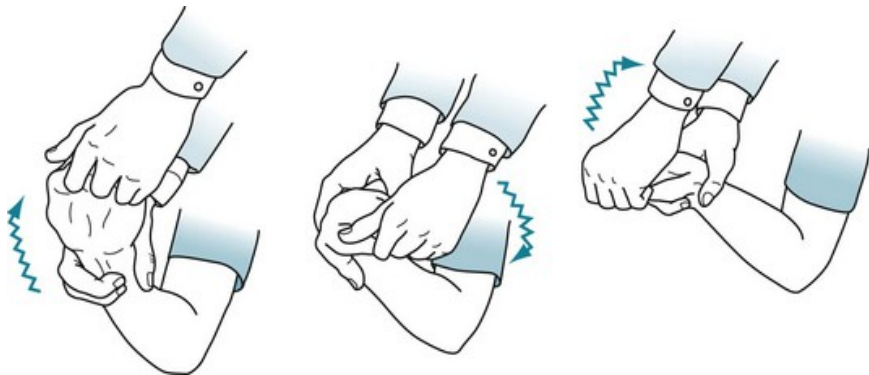
Тест позволяет выявить:

- 1 – неспособность схватывать перекладину (отсутствие хватательного рефлекса);
- 2 – неспособность выполнить сложный двигательный акт (праксис) «подтягивание, схватывание тазовой конечностью, движение в сторону по перекладине»;
- 3 – время виса на перекладине более 15-20 сек может указывать на:
 - а) именно нарушение навыка, но не снижение силы,
 - б) снижение силы мышц проксимальных отделов грудных конечностей с сохранением силы мышц дистальных отделов;
- 4 – слабость мышц дистальных отделов при неспособности удержаться на перекладине, но при сохранности позы животного в покое

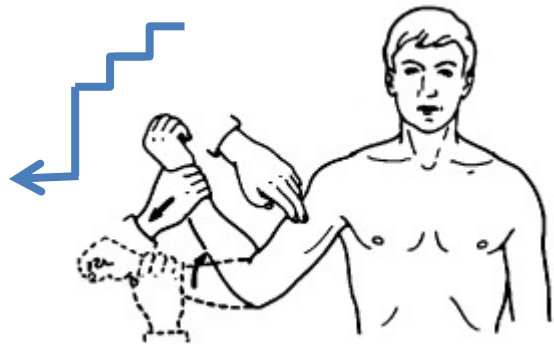
Тест подтягивания на перекладине пригоден для исследования функций двигательного контроля и исследования силы разных групп мышц грудных конечностей

Исследование мышечного тонуса в клинике и эксперименте

Тонус мышц – длительное стойкое возбуждение нервных центров и мышечной ткани, обеспечивающее поддержание определённой позы и положения тела в пространстве, не сопровождающееся утомлением (Орбели Л. А., 1938)



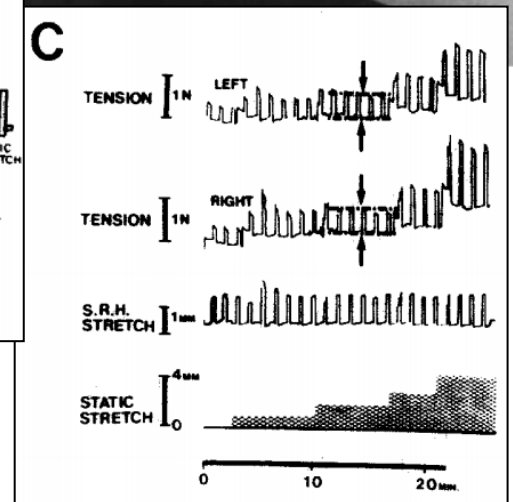
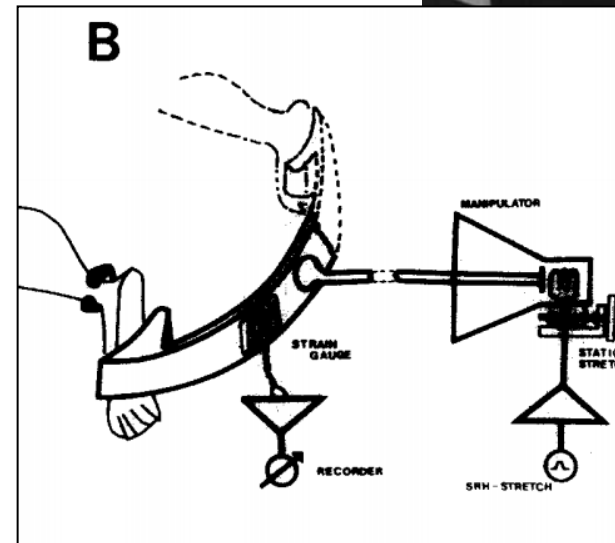
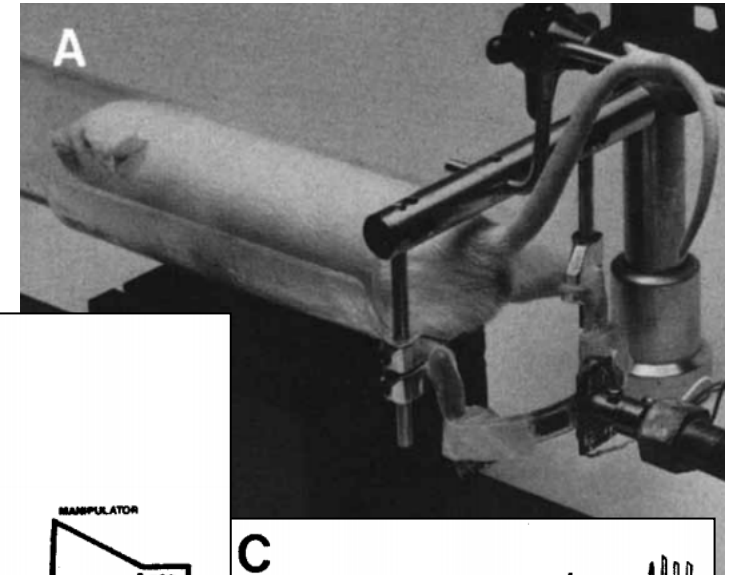
Феномен «зубчатого колеса»



Феномен «складного ножа»



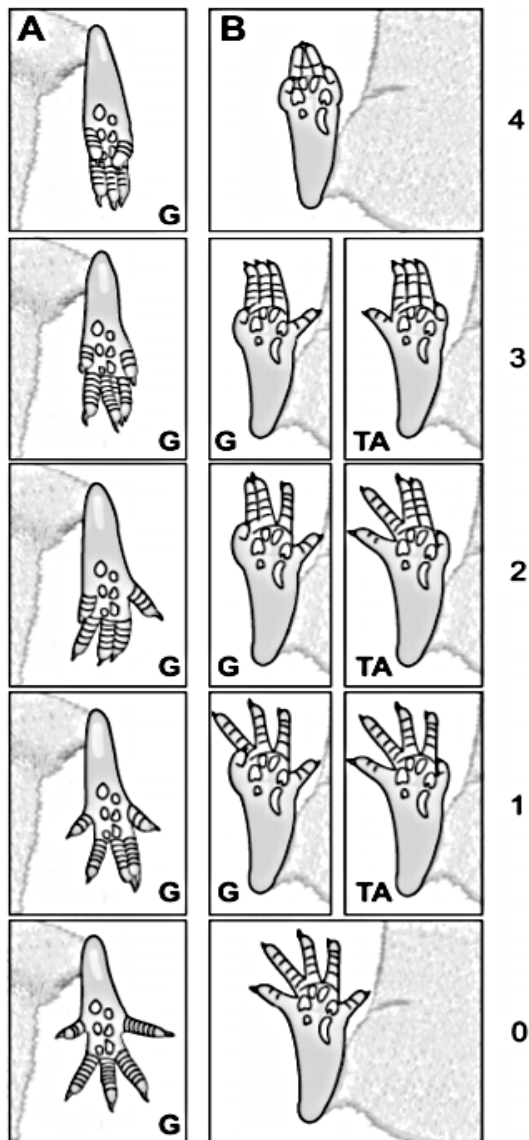
Подтягивание на перекладине
Тонус мышц живота



Шкала отведения пальцев (Digit Abduction Score)

Мыши

Крысы



Выраженность рефлекторного разведения пальцев стоп при поднятии крысы за хвост на высоту 20 см над поверхностью и имитации падения.

В норме крыса готовится к приземлению и широко расставляет грудные и тазовые конечности, разводя при этом пальцы. На фоне токсического пареза выраженность данного рефлекса снижается:

- 0 баллов – здоровое животное способно удерживать пальцы разведенными достаточно длительно (более десяти секунд),
- 1 балл – первоначально крысы разводят пальцы на несколько секунд, затем 1 или 2 пальца стопы оказываются прижатыми друг к другу,
- 2 балла – 3 пальца,
- 3 балла – 4 пальца,
- 4 балла – все 5 пальцев или полное отсутствие попытки разведения пальцев .

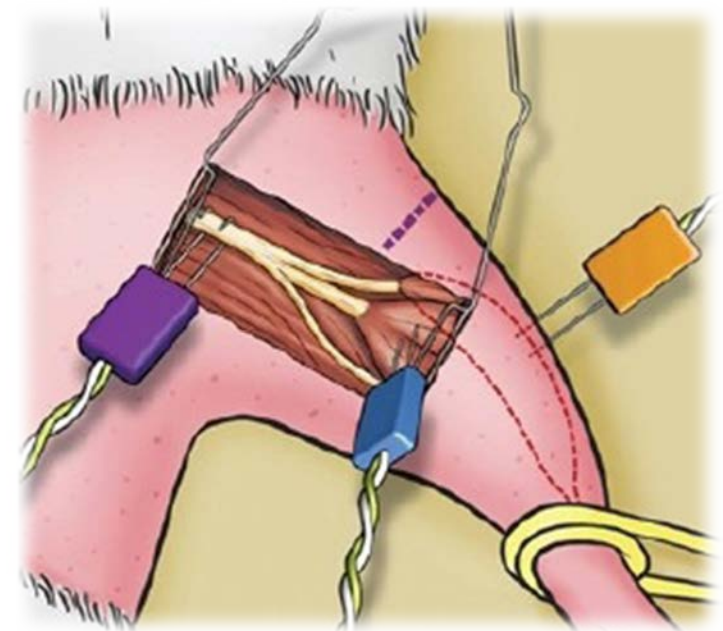
Aoki K. R. Preclinical update on BOTOX®(botulinum toxin type A)-purified neurotoxin complex relative to other botulinum neurotoxin preparations // European Journal of Neurology. – 1999. – V. 6. – P. s3-s10.

Материалы и методы

Крысы-самцы массой 180-220 г, n=10

Модель дистального периферического пареза (токсической полинейропатии): подкожное введение блокатора нейрональных Na-каналов (тетродотоксина) в дозе ЛД₁₆ (8,5 мкг/кг).

Модель миастенического синдрома: подкожное введение АХЭС (неостигмина) в дозе ЛД₁₆ (250 мкг/кг).



Клинико-функциональные тесты:

- «Ротарод»,
- Подтягивание на горизонтальной перекладине,
- Шкала отведения пальцев (ШОП).

- Электромиография (ЭМГ) правого большеберцового нерва (икроножной мышцы) при помощи монополярных игольчатых электродов по стандартной методике «belly-tendon» («Нейро-МВП-4», ООО «Нейрософт»).
- Протокол ЭМГ: одиночная супрамаксимальная стимуляция и ритмическая стимуляция (РС) с частотой 30 Гц по 10 импульсов длительностью 0,2 мс.
- Результаты представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Непараметрическая статистика (критерии Манна–Уитни, Вилкоксона, Фишера).

Результаты сравнительной динамической оценки функционального состояния ПНС при токсическом парезе (тетродотоксин, ЛД₁₆)

Параметр	Фон	10 мин	16 мин	20 мин	26 мин	30 мин
Электромиография						
Амплитуда М-ответа, мВ	40,0 [36,0;43,8]	37,6 [34,9;41,4]	33,6* [31,2;34,2]	29,2* [26,1;31,9]	25,3* [21,3;28,9]	16,7* [14,0;18,0]
Длительность М-ответа, мс	2,5 [2,2;2,7]	2,7* [2,6;2,8]	2,9* [2,8;3,0]	3,1* [2,96;3,2]	3,2* [3,1;3,3]	3,3* [3,1;3,4]
Латентность, мс	0,74 [0,65;0,78]	0,85 [0,74;0,95]	0,85* [0,74;0,85]	0,95* [0,85;1,06]	1,16* [1,14;1,18]	1,16* [1,11;1,27]
Декремент площади, %	1,7 [1,4;1,8]	5,4* [4,6;8,4]	5,8* [2,8;9,8]	7,8* [3,5;10,5]	8,4* [4,1;10,8]	11,1* [7,5;21,2]
Клинико-функциональные тесты						
Шкала отведения пальцев	0	1 [0; 1]	1* [1; 1]	1* [1; 2]	2* [2; 3]	4* [4;4]
«Ротарод», сек	> 120,00	> 120,00	> 120,00	104,7* [95,3; 124,4]	75,8* [64,1;96,2]	28,8* [14,6;45,4]
«Перекладина», % отриц.	0	0	10	80 [#]	100 [#]	100 [#]

Примечания: * - различия статистически значимы с фоновыми (p<0,05, критерий Уилкоксона);

- различия статистически значимы с фоновыми (p<0,05, точный критерий Фишера)

Сравнение результатов оценки функционального состояния ПНС при миастеническом синдроме и полинейропатии токсического генеза

Параметр	Норма	Неостигмин, ЛД ₁₆	Тетродотоксин, ЛД ₁₆
Электронеуромиография			
Амплитуда М-ответа, мВ	40,0 [36,0;43,8]	44,5 [41,1;46,7]	16,7 [14,0;18,0]
Длительность М-ответа, мс	2,5 [2,2;2,7]	2,6 [2,4;2,7]	3,3 [3,1;3,4]
Латентность, мс	0,74 [0,65;0,78]	0,77 [0,68;0,85]	1,16 [1,11;1,27]
Декремент площади, %	1,7 [1,4;1,8]	декремент-инкремент (24,3 [18,1;28,8])	11,1 [7,5;21,2]
Клинико-функциональные тесты			
Шкала отведения пальцев	0	1 [0; 1]	4 [4; 4]
«Ротарод», сек	> 120,00	36,5 [24,3;48,5]	28,8 [14,6;45,4]
«Перекладина», % отрицательных проб	0	100	100

Выводы

1. Внимательная дифференциальная оценка неврологического статуса экспериментальных животных по аналогии с клиническим осмотром позволит повысить эффективность скрининга нежелательных нейротоксичных явлений фармакологически активных веществ или внешнюю валидность моделей заболеваний ПНС.
2. Общепринятый в настоящее время методический аппарат экспериментальной оценки двигательных расстройств у грызунов с помощью клинико-функциональных тестов способен выявить нарушения нервно-мышечного проведения и передачи при достаточной их выраженности.
3. Признаки токсических поражений ПНС могут быть выявлены с помощью ЭМГ раньше, чем с помощью клинико-функциональных тестов.
4. Рассмотренная адаптированная методика шкалы отведения пальцев позволила обнаружить наиболее ранние признаки периферического пареза, что было хронологически сопоставимо с данными ЭМГ.
5. Оценка физиологического двигательного рефлекса у крыс при помощи шкалы отведения пальцев обладает достаточно высокой информативностью и простотой тестирования, делая возможным выявление ранних признаков периферического пареза токсического генеза.



Благодарю за внимание!

снс ГНИИИ ВМ
Ильинский Никита Сергеевич
nika_il2@mail.ru