



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

Научно-исследовательский испытательный центр
прикладных исследований и полигонных испытаний

Электронеуромиография в токсикологическом эксперименте на грызунах

Ильинский Н.С., Козлова А.Н., Тюнин М.А.

Докладчик: Ильинский Никита Сергеевич

Санкт-Петербург, 2022 г

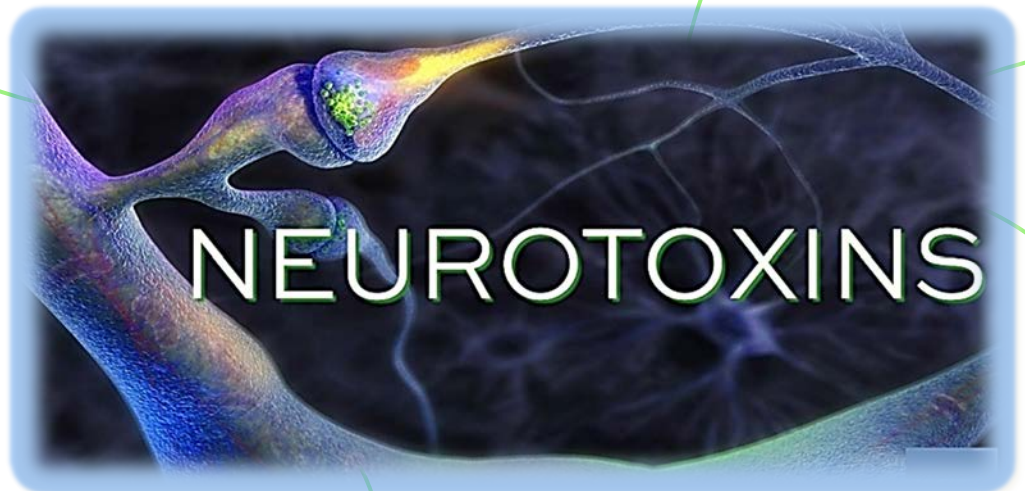
Актуальность

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



Повышение внешней валидности экспериментальных моделей заболеваний ПНС и ЦНС

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

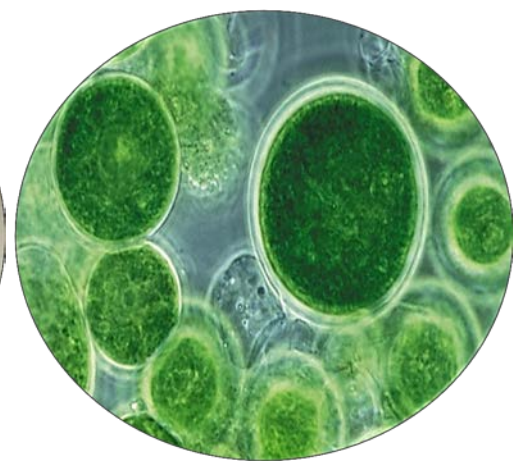


Основные категории нейротоксикантов

Лекарственные средства



Производственные (промышленные или профессиональные) яды



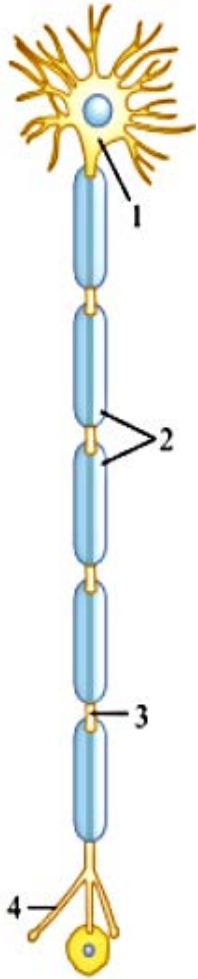
Токсиканты умышленного применения (наркотические вещества, химическое оружие)



Биотоксины (растительного, животного или бактериального происхождения)

Химические загрязнители окружающей среды (экоотоксиканты)

Мишени нейротоксикантов в периферической нервной системе

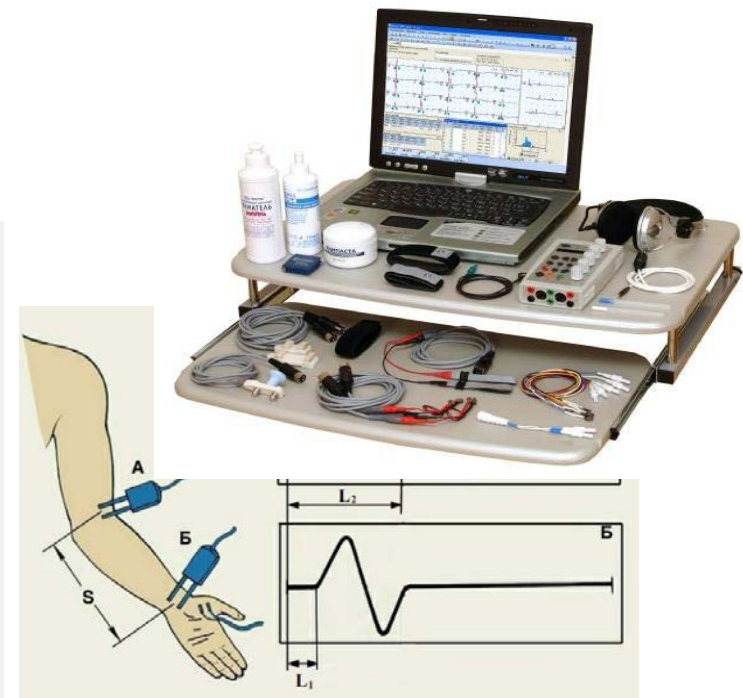


Мишень	Пример
1 – Тела нейронов (дорсальные ганглии, мотонейроны):	цисплатин, ртуть, В ₆ доксорубицин, метилртуть
2 – Миелиновая оболочка смешанных нервов: -преимущественно сенсорные : -преимущественно двигательные:	токсин <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , амиодарон, такролимус, гексакарбон таллий, талидомид, цисплатин, пиридоксин, этанол, метронидазол, нитрофураны ФОС, амиодарон, н-гексан, свинец винкристин, нитрофураны, циметидин
3 – Аксоны смешанных нервов:	фосфолипаза А2, тетаноспазмин, таллий, этанол, органические растворители
4 – Нервные терминали и нервно-мышечный синапс: -пресинаптические структуры: -синаптические структуры: -постсинаптические структуры:	ботулотоксины, тетаноспазмин, сакситоксин, тетродотоксин ФОС, карбаматы, фасцикулины курареподобные средства, конотоксины, аконитин анатоксин-а
5 – Мышцы:	статины, фторхинолоны, кортикостероиды

Электромиография как диагностический метод

Современная электромиография представляет собой комплекс методов оценки состояния нервно-мышечной системы, основанный на регистрации и **качественно-количественном** анализе различных видов электрической активности мышц и нервов (Николаев С.Г., 2013).

В клинической нейрофизиологии могут быть применены около 36 методик, с помощью которых доступны для исследования около 30 мышц и 22 нерва (с каждой стороны).



Основные **задачи** ЭМГ-диагностики нейроинтоксикаций:

1. Определение ведущего механизма нарушений функций ПНС.
2. Определение уровня поражений.
3. Оценка выраженности поражений.
4. Оценка распространенности поражений.

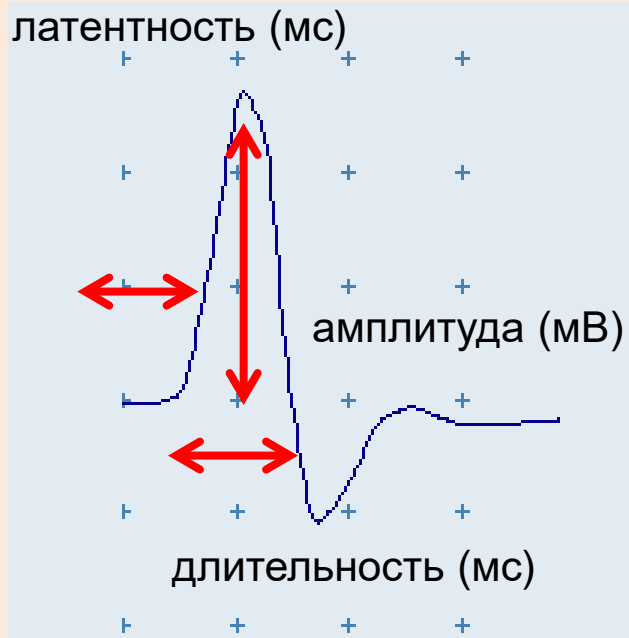
Основные **уровни** поражений нервно-мышечной системы:

1. Мотонейрональные поражения.
2. Поражения корешковой системы.
3. Поражения сплетений (плексопатии).
4. Поражения нервов: моно- и полиневропатии, множественные невропатии.
5. Поражения синапса.
6. Поражения мышц (первично-мышечные поражения).

Решение этих задач дает возможность объективно оценить состояние нервно-мышечной системы, что в совокупности с данными физикального обследования позволит **верифицировать** нозологическую специфичность поражения и **предположить групповую принадлежность токсического фактора**

Основные параметры нормальной электромиограммы

Оценка двигательного проведения с помощью одиночной стимуляции

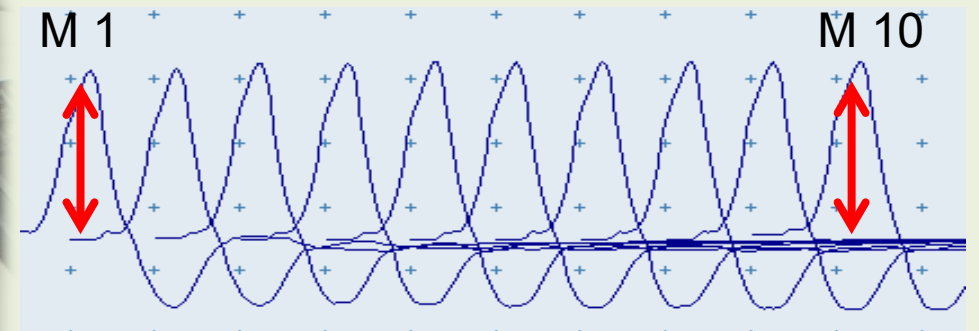


Расчетные параметры: площадь М-ответа и скорость распространения двигательной (моторной) волны

Нормальный М-ответ

одиночный, двухфазный, устойчивый

Оценка нервно-мышечной (синаптической) передачи с помощью ритмической стимуляции

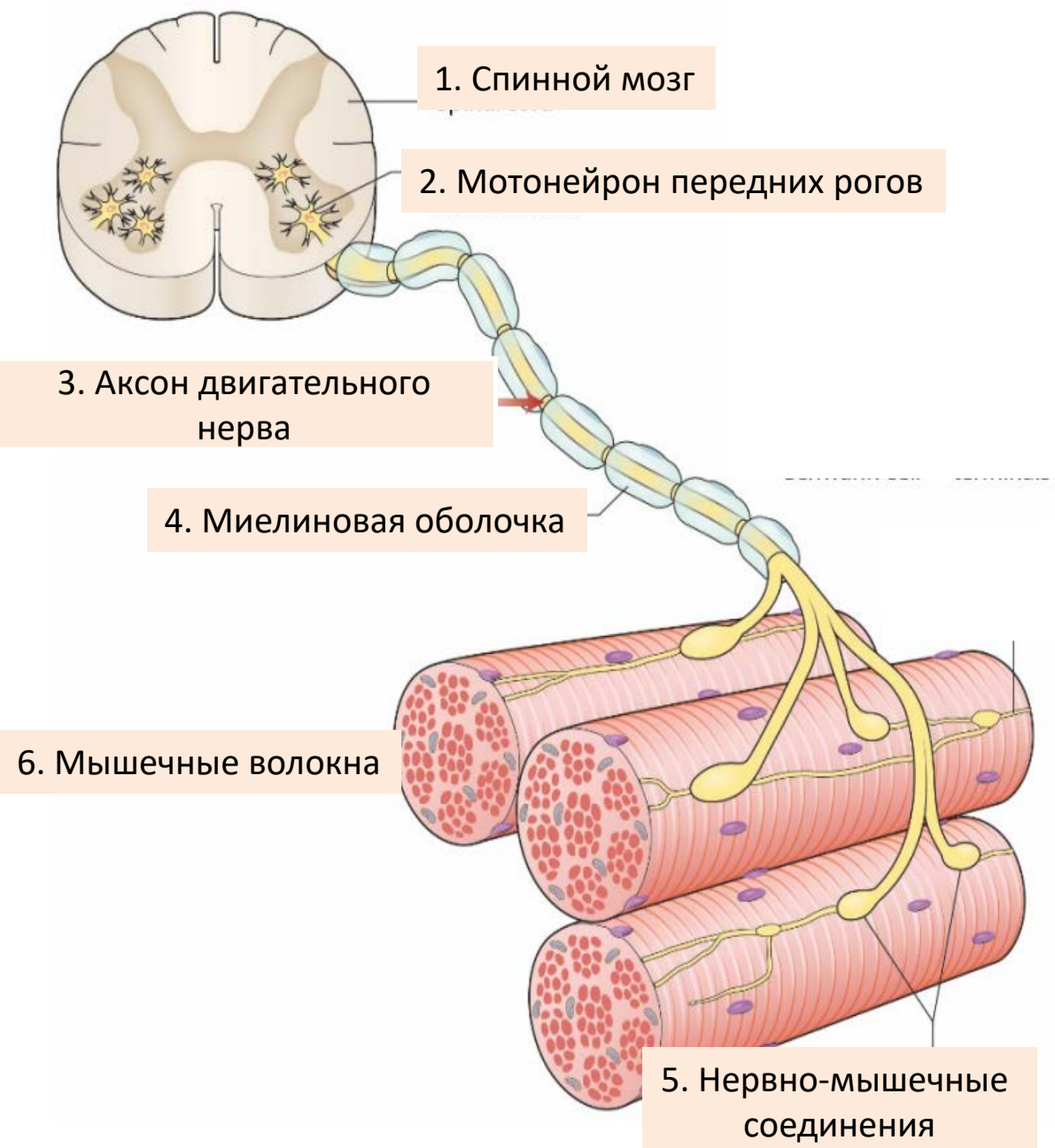


Нормальный ответ на ритмическую стимуляцию

Одинаковая амплитуда и площадь каждого М-ответа. Соотношение амплитуд или площадей первого и последнего М-ответов отличаются не более чем на 10 %

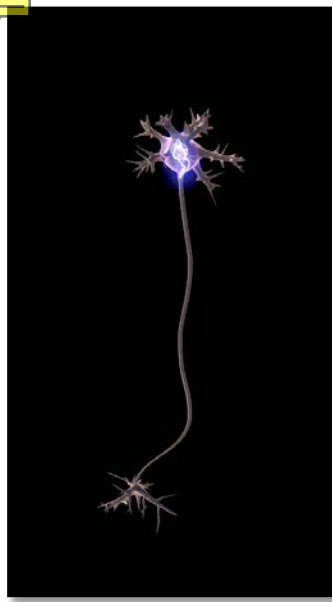


Топическая диагностика уровней поражения периферической нервной системы



Электрофизиологические методы и критерии

Уровень	Методики	Критерии
1	F-волна Н-рефлекс Магнитная стимуляция	Амплитуда М-ответа Латентность Н-рефлекса и F-волны
2	F-волна Н-рефлекс Одиночная стимуляция Игольчатая ЭМГ	Те же Амплитуда, латентность, длительность М-ответа. Потенциалы двигательных единиц
3	Одиночная стимуляция (ЭНМГ)	Амплитуда М-ответа
4		Латентность М-ответа
5	Ритмическая стимуляция (декремент-тест) Проба с тетанизацией	Соотношение амплитуд первого и последнего М-ответов
6	Игольчатая ЭМГ Количественная ЭМГ Макро-ЭМГ	Потенциалы двигательных единиц Количество волокон



Цель исследования



Определить референтные интервалы параметров
электронейромиографии у крыс в норме и при отравлениях
нейротоксинами различных групп

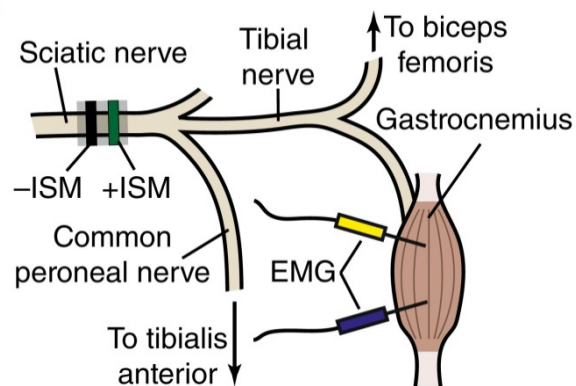
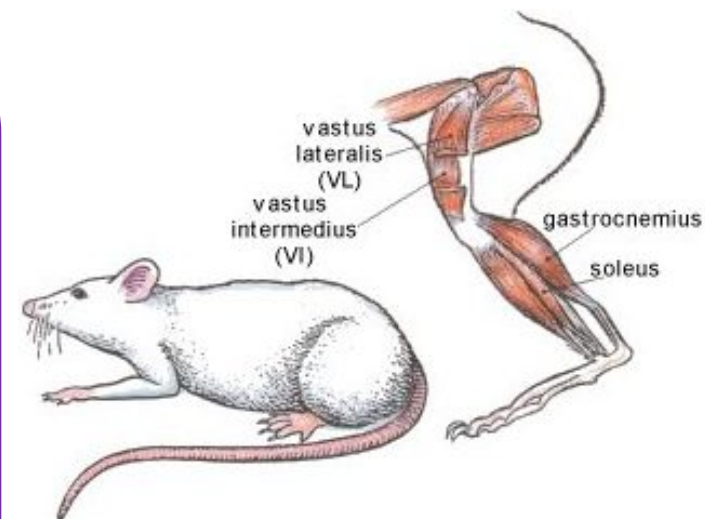
Материалы и методы

Самцы белых беспородных крыс, массой 200-250 г, n=80

Модель смешанной полинейропатии: подкожное введение блокатора нейрональных Na-каналов тетродотоксина в дозах ЛД₁₆ и ЛД₅₀.

Модель холиномиметического синдрома: подкожное введение ингибитора ацетилхолинэстеразы неостигмина в дозах ЛД₁₆ и ЛД₅₀.

Модель холинолитического синдрома: подкожное введение недеполяризующего миорелаксанта панкурония в дозах ЛД₁₆ и ЛД₅₀.



➤ 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 3-30 Гц по 10 импульсов длительностью 0,2 мс.

➤ Результаты представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Непараметрическая статистика (критерии Манна–Уитни, Вилкоксона, Фишера).



Референтные интервалы основных параметров ЭНМГ у самцов белых беспородных крыс возрастом 8–10 недель в норме (n=80)

Параметр	Среднее значение	Стандартное отклонение	95 % доверительный интервал	Коэффициент вариации, %	Медиана	Квартиль 1; Квартиль 3
Масса тела, г	237,40 *	22,36	230,25; 244,52	9,42	237,53	224,32; 249,85
Амплитуда М-ответа, мВ	34,95 *	7,146	32,67; 37,24	20,45	35,85	29,70; 38,85
Сила тока супрамаксимальной стимуляции, мА	8,22 *	3,31	7,17; 9,28	40,23	8,00	5,00; 11,00
Длительность М-ответа, мс	2,27 *	0,282	2,18; 2,36	12,45	2,20	2,10; 2,47
Дистальная латентность М-ответа, мс	0,93	0,308	0,83; 1,03	33,14	0,80	0,70; 1,20
Площадь М-ответа, мВ*мс	37,57 *	10,02	34,36; 40,78	26,68	36,95	30,93; 43,53
Скорость распространения двигательной волны, м/с	28,13 *	10,24	24,85; 31,40	9,421	26,70	19,40; 34,38

* – нормальное распределение (критерий Колмогорова – Смирнова)

Результаты оценки нервно-мышечной (синаптической) передачи у самцов белых беспородных крыс возрастом 6–10 недель в норме (n=80)

Псевдофоссиляция (повышение синхронизации мышечных ответов, как вариант нормы) – 12,5 %

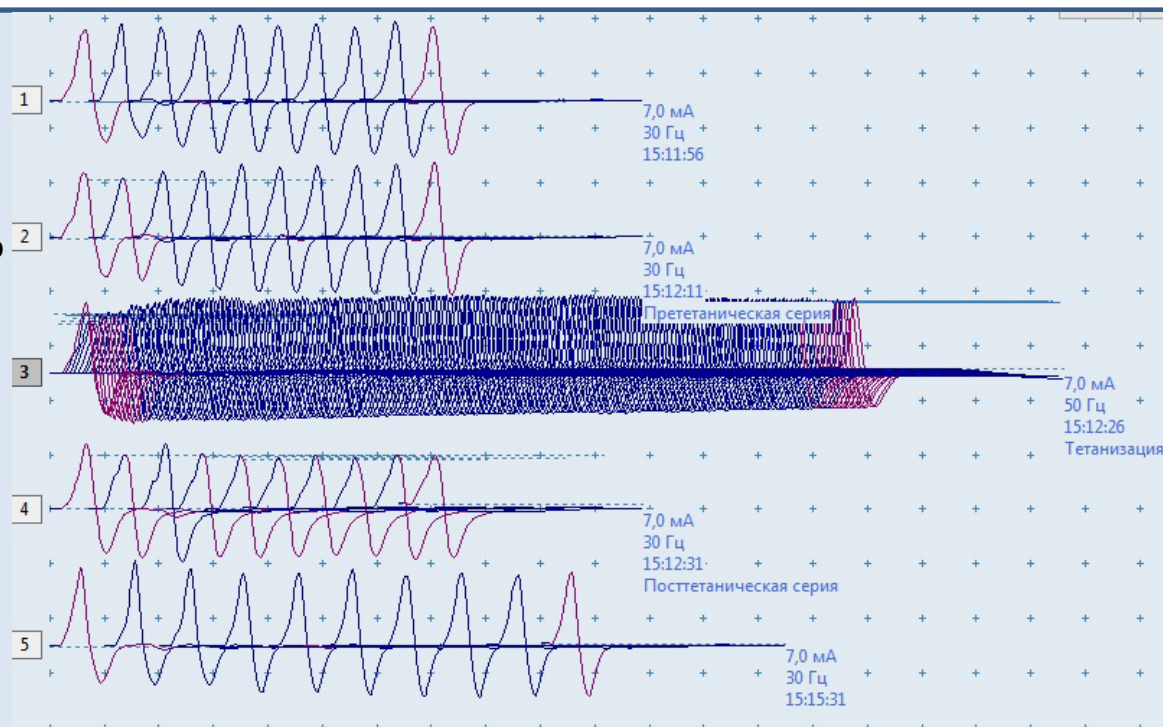
Истинный инкремент (признак слабого холиномиметического действия) – 10,0 %

Декремент:

при низкочастотной стимуляции (3 Гц) – 0,0 %

при высокочастотной стимуляции (30 Гц) – 5,0 %

Истощение нервно-мышечной передачи после тетанизации – 10,0 %



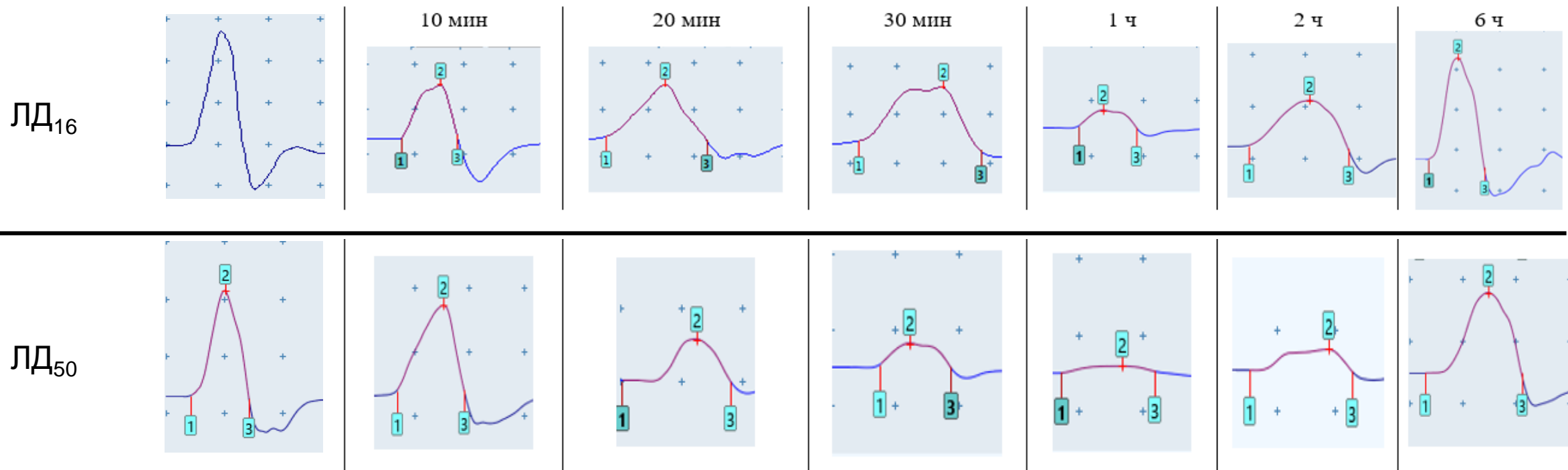
Пример: случай выявления нейротоксических эффектов после введения тестируемого объекта



Методика	Признак
Открытое поле	Снижение всех видов двигательной активности
Удерживание на решетке	Снижение мышечной силы
Измерение силы захвата	Снижение мышечной силы
Подтягивание на горизонтальной перекладине	Снижение мышечной силы / мышечного тонуса (?)
Методы вращающегося стержня («Ротарод»)	Нарушения координации движений
Бег на третбане	Снижение физической работоспособности

Какое патологическое состояние развилось?

ЭНМГ-критерии тяжелых отравлений блокатором натриевых каналов в двух дозах

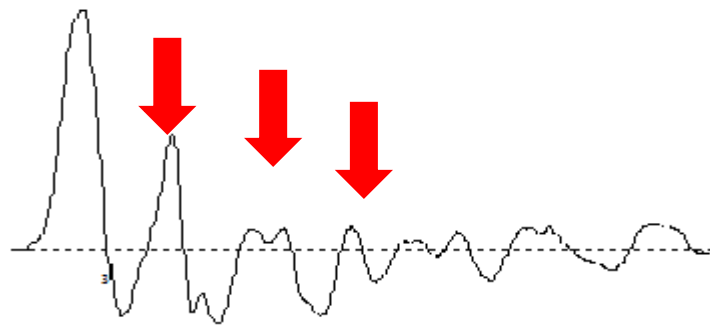


Признаки аксонопатии: снижение амплитуды и площади М-ответов, исчезновение позитивного пика

Признаки миелінопатии: увеличение дистальной латентности и длительности, полифазия М-ответов, снижение скорости распространения волны

Скорость снижения амплитуды и площади составляет 1,5–2,0 % в минуту

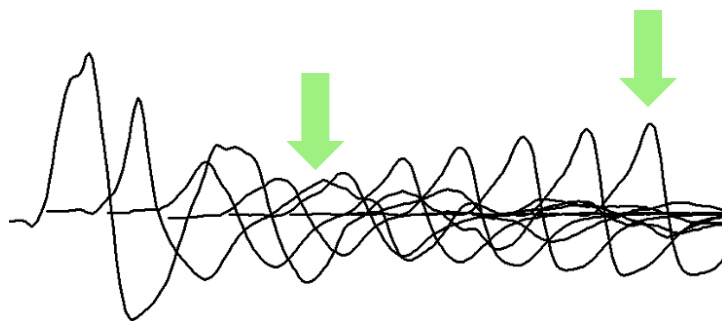
Диагностические ЭНМГ-критерии тяжелых отравлений ингибиторами ацетилхолинэстеразы



Наличие повторных М-ответов при одиночной стимуляции, а также «затухание» этих повторных М-ответов при ритмической стимуляции

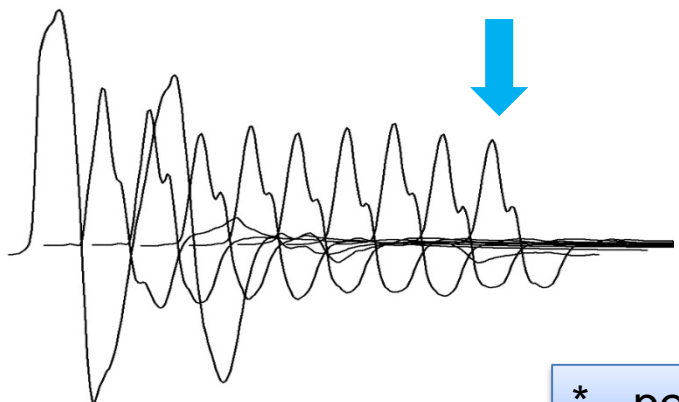
Частота выявления

100 %



Феномен декремента-инкремента (выраженностью более 20 %) при ритмической стимуляции (значимо чаще при высокой частоте 20-30 Гц)

100 %



Феномен декремента (выраженностью более 10 %) при ритмической стимуляции (значимо чаще при высокой частоте 20-30 Гц)

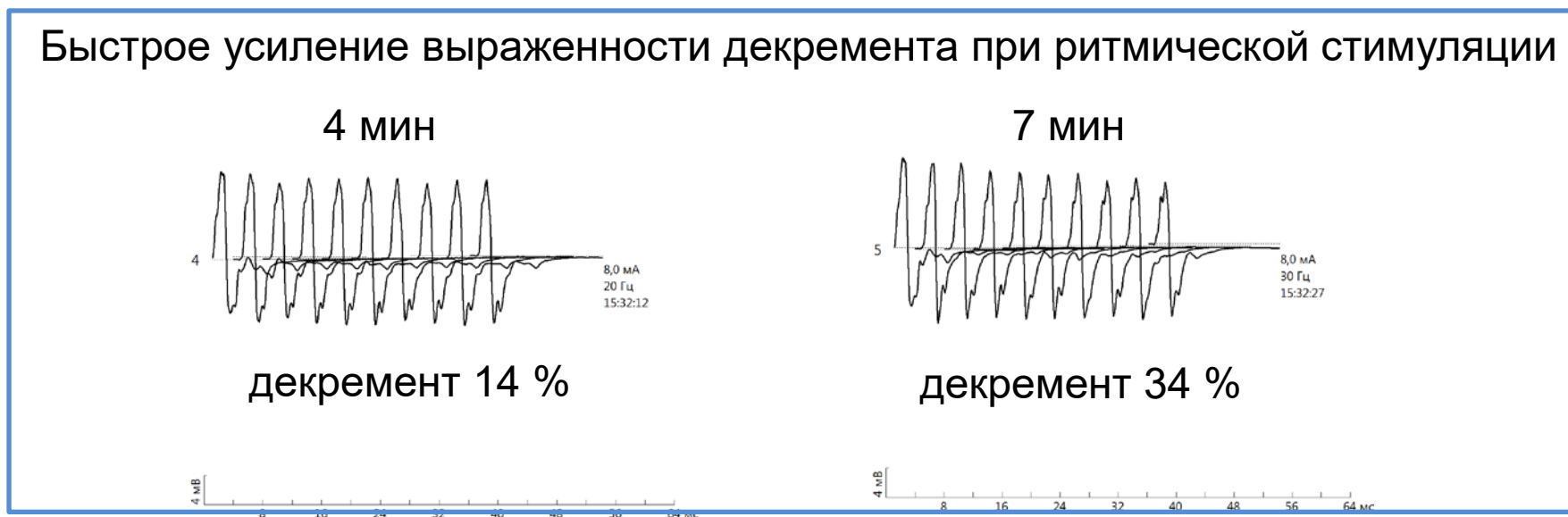
53,3 % *

* - регистрировали позже, чем другие признаки

ЭНМГ-критерии тяжелых отравлений недеполяризирующими блокаторами ацетилхолиновых рецепторов (n=10, Me [Q1; Q3])

Время после введения, мин	фон	5	10	15
Амплитуда первого М-ответа, мВ	32,53 [28,3;36,3]	27,2 [24,0;32,6]	23,3* [17,4;27,1]	21,2* [16,3;24,0]
Декремент, %	0-5	38±7,3	62,5±10,2	80,3±10,1
Скорость нарастания декремента, % / мин	-	7,4	6,6	5,5

* - различия статистически значимы по сравнению с фоновыми (p<0,05)



Выводы

1. Определены референтные интервалы основных параметров ЭНМГ у белых беспородных крыс.
2. Признаки токсических поражений периферической нервной системы могут быть выявлены с помощью ЭНМГ в течение первых минут интоксикации.
3. Динамическое сравнение параметров одиночной и ритмической стимуляции может представлять высокую диагностическую ценность в экспериментальной и клинической практике.
4. ЭНМГ позволяет проводить дифференциальную диагностику поражений нейротоксинами периферического действия различных групп за счет регистрации типовых электрофизиологических паттернов.
5. Применение высокочастотной ритмической стимуляции повышает вероятность выявления нарушений нервно-мышечной передачи различного генеза, в том числе среди «интактных» животных.



Благодарю за внимание!

снс ГНИИИ ВМ
Ильинский Никита Сергеевич
nika_il2@mail.ru