

MEDLINE.RU, ТОМ 20, КЛИНИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 5 МАЯ 2019

**ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЭЛЕКТРОМИОГРАФИИ ПРИ
ОТРАВЛЕНИЯХ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ**

Тюнин М.А., Ильинский Н.С., Матросова М.О.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» МО РФ, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая д. 4, 195043, 8(812)775-02-41, gniiivm_2@mil.ru

Резюме.

В исследовании на крысах показано, что определение активности ацетилхолинэстеразы плазмы крови имеет ограниченные возможности для диагностики степени тяжести отравлений фосфорорганическими соединениями по причине высокой вариабельности показателя. По результатам электромиографии установлено, что для тяжелых отравлений фосфорорганическими соединениями характерно наличие более 3 повторных М-ответов и феномена декремента-инкремента, выраженность которого имеет прямую линейную зависимость от частоты ритмической стимуляции. Выявленные электромиографические признаки целесообразно использовать для определения степени тяжести отравления фосфорорганическими соединениями.

Ключевые слова: фосфорорганические соединения, электромиография, миастенический синдром, декремент-инкремент, повторные М-ответы, декремент-тест

**DIAGNOSTIC POTENTIAL OF ELECTROMYORGRAPHY IN ORGANOPHOSPHATE
POISONING**

Tyunin M.A., Ilinskiy N.S., Matrosova M.O.

State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine, Ministry of Defense of Russian Federation, Saint Petersburg, Lesoparkovaya Str., 4, 195043, 8(812)775-02-41, gniiivm_2@mil.ru

Abstract.

The results of experiment in rats showed that the study of the activity of plasma acetylcholinesterase has limited capabilities in cases of differentiation of mild and severe poisoning by organophosphates due to the wide range of variability of results. According to the results of electromyography established that existence more than 3 repetitive compound muscle action potentials and the linear dependence of the decrement-increment phenomenon expressiveness from the increasing frequency of rhythmic stimulation is characteristic of a severe poisoning. These electromyography sings appropriate to use for assessment severity of organophosphate poisoning.

Key words: organophosphate, electromyography, myasthenic syndrome, decrement-increment, repetitive compound muscle action potentials, decrement-test

Введение

По официальным данным интоксикации, вызванные антихолинэстеразными соединениями (АХЭС), занимают порядка 5 % в общей структуре отравлений [1, 2]. В настоящее время верификация отравлений АХЭС основана на выявлении типичных клинических признаков в сочетании с результатами лабораторных исследований активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) крови. С этой целью наиболее часто используют спектрофотометрический метод, предложенный еще в начале 1960-х годов Г.Л. Элманом с соавт. [3]. Однако информативность данного метода ограничена из-за широких пределов индивидуальных колебаний активности фермента и отсутствия точно определенных референсных значений для различных сред (цельная кровь, плазма, эритроциты) и степеней тяжести отравления [1, 4]. Помимо этого метод Г.Л. Элмана является очень чувствительным и требует точного соблюдения алгоритма анализа. На результаты измерения активности АХЭ могут оказывать влияние высокая способность гемоглобина поглощать спектр с длиной волны 412 нм и присутствие в пробе лекарств из группы реактиваторов АХЭ [4, 5]. Таким образом, низкая информативность исследования активности АХЭ для определения степени тяжести отравлений определяет необходимость использования дополнительных методов, позволяющих оценить состояние холинергической нейромедиации. С данной целью могут быть применены электромиографические (ЭМГ) тесты, эффективность которых ранее была продемонстрирована экспериментально и клинически при отравлениях различными фосфорорганическими соединениями (ФОС) [6, 7]. Однако до настоящего времени не определены дифференциально-диагностические ЭМГ-критерии выраженности интоксикации.

Цель. Исследовать изменения показателей ЭМГ в зависимости от степени тяжести отравления ФОС.

Материалы и методы

Исследование выполнено на крысах-самцах массой 180-220 г (ФГУП «ПЛЖ «Рапполово», Ленинградская область). Отравление моделировали путем внутримышечного введения фосфорорганического инсектицида диметоата («Диметоат-400», ООО НПО «РосАгроХим») в дозах 50 (1/8 ЛД₅₀), 95 (1/4 ЛД₅₀), 240 (ЛД₁₆), 380 (ЛД₅₀) и 550 мг/кг (ЛД₉₉). ЭМГ выполняли у наркотизированных животных (препарат «Золетил100», 25 мг/кг, внутривенно) за 1 сутки до и через 2 часа после введения диметоата с помощью электромиографа «Нейро-МВП-4» («Нейрософт», Россия) и программного обеспечения «Нейро-МВП-омега (версия 3.7.3.1)». ЭМГ проводили на правой икроножной мышце крысы (стимулировали n. tibialis) с помощью монополярных игольчатых электродов по стандартной методике «belly-tendon» [8]. Протокол ЭМГ включал: одиночную супрамаксимальную стимуляцию и батарею тестов ритмической стимуляции (10 импульсов длительностью 0,2 мс) со ступенчато нарастающей частотой от 3 до 30 Гц (через каждые 15 секунд). Активность АХЭ в плазме венозной крови определяли также за 1 сутки до и через 2 часа после затравки по методике Г.Л. Элмана на биохимическом анализаторе «Chem Well Combo Chemistry and ELISA» (США) в те же сроки, что и проводили ЭМГ [3]. Результаты обрабатывали с помощью методов непараметрической статистики, реализованных в пакете прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft, США) с применением критериев Манна-Уитни, Вилкоксона и

коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Номинальный уровень статистической значимости – $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Клинические проявления интоксикации модельным ФОС у крыс характеризовались дозовой зависимостью. При введении токсиканта в смертельных дозах у животных через 2 часа отмечали признаки холинергического криза (слезотечение, гиперсаливация, инконтиненция, расстройства дыхания в виде брадипноэ, мелкий тремор конечностей, хвоста и головы, тризм, миофибрилляции) и двигательных расстройств в виде гиподинамии, атаксии и дискоординации. После введения диметоата в сублетальных дозах ($1/8 \text{ ЛД}_{50}$, $1/4 \text{ ЛД}_{50}$) основными признаками интоксикации были гиподинамия, гиперсаливация и тахипноэ.

Активность АХЭ в плазме крови статистически значимо зависела от дозы токсиканта ($r_s = -0,95$, $p = 0,01$, $r^2 = 0,91$). Параметры рассеивания полученных значений представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика рассеивания показателей активности АХЭ в плазме крови крыс спустя 2 ч после отравления диметоатом в различных дозах, $n=10$

Доза, мг/кг	Средняя активность, мкмоль/мл*мин ($M \pm CO$)	Коэффициент вариации активности, %	Средняя остаточная активность, %	Коэффициент вариации остаточной активности, %
50	$0,352 \pm 0,052$	16,5	72,1	14,4
95	$0,247 \pm 0,021$	9,3	59,7	8,6
240	$0,178 \pm 0,069^*$	17,8	48,8	19,5
380	$0,125 \pm 0,036$	26,4	39,3	23,4
550	$0,072 \pm 0,023$	77,3	22,4	82,1
Примечание: * – статистически значимо не отличается от значений, полученных у крыс при введении диметоата в дозе 95 мг/кг ($p > 0,05$, критерий Манна–Уитни)				

Данные таблицы 1 наглядно демонстрируют высокую вариабельность величин активности АХЭ плазмы крови при введении летальных доз, в то время как при интоксикациях, вызванных введением сублетальных доз коэффициент вариации отличали слабые и средние колебания. При этом, было отмечено отсутствие статистически значимых различий между показателями активности АХЭ, наблюдаемыми при воздействии токсиканта в сублетальной дозе (95 мг/кг) и минимальной смертельной дозе (240 мг/кг). Следовательно, интерпретация результатов лабораторной диагностики в случаях отравлений ФОС для определения степени тяжести может быть неточной, что ограничивает клиническую информативность данного метода.

По результатам ЭМГ в тесте одиночной стимуляции было выявлено статистически значимое обратно пропорциональное снижение силы тока супрамаксимального стимула при увеличении дозы ФОС. Так, для сублетальных доз диметоата (50, 95 мг/кг) средняя сила супрамаксимального стимула составила 13 и 10 мА, соответственно, а для смертельных доз уже 4,0–6,0 мА. Также было отмечено дозозависимое увеличение количества повторных М-ответов. В частности, при введении диметоата в сублетальных дозах количество повторных М-ответов не превышало 2, в то время как после воздействия токсиканта в летальных дозах оно во всех наблюдениях составляло 3 и более, при этом средние значения показателя в группах дозозависимо нарастали в диапазоне от 4 до 8.

Важно подчеркнуть, что феномен повторных М-ответов является специфичным для отравлений ФОС. В качестве иных причин его возникновения известны некоторые достаточно редкие миастенические синдромы [9]. По другим показателям (дистальная латентность, скорость распространения моторной волны, амплитуда, длительность и площадь М-ответов), регистрируемым в тесте одиночной стимуляции, статистически значимых изменений, отражающих тяжесть интоксикации ФОС, выявлено не было.

В тесте ритмической стимуляции у крыс регистрировали несколько типов патологических феноменов: декремент-инкремент (ДИ), декремент, инкремент. Наблюдаемые патологические феномены количественно характеризовали двумя показателями, выраженными в процентах относительно первого М-ответа: степенью декремента – разностью между значением амплитуды (площади) первого и наименьшего М-ответов в серии; степенью инкремента – разностью между значением амплитуды (площади) наименьшего и последнего М-ответов серии. Важно отметить, что при анализе ритмической серии необходимо ориентироваться на изменения площади М-ответов, как на более информативный параметр, чем снижение амплитуды, значения которой в большей степени подвержены псевдофасилитации на ранних сроках интоксикации.

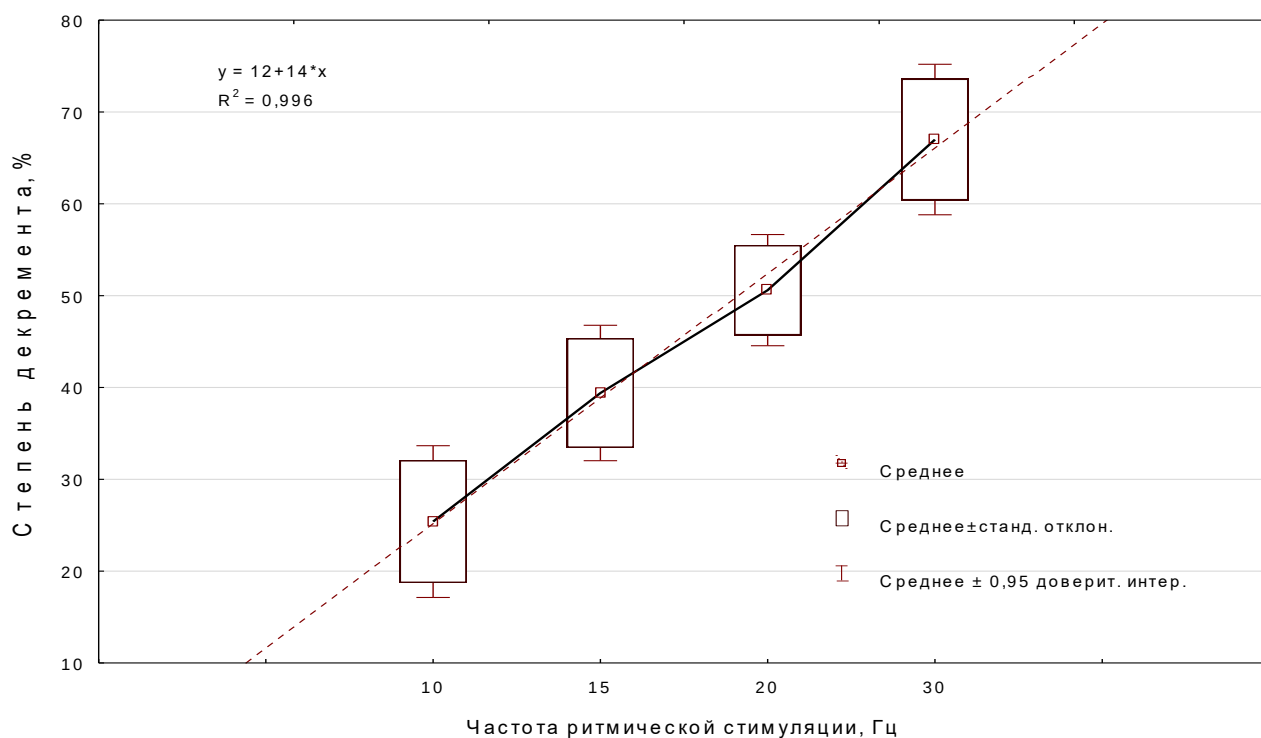


Рисунок 1 – Линейная зависимость увеличения выраженности степени декремента при возрастании частоты ритмической стимуляции икроножной мышцы крыс после отравления диметоатом в абсолютной смертельной дозе

Среди регистрируемых феноменов, вне зависимости от дозы диметоата, наиболее часто у крыс наблюдали развитие ДИ. Было установлено, что феномен ДИ площади М-ответов является достаточно чувствительным диагностическим критерием интоксикации ФОС. Его регистрировали на частотах 10–30 Гц при введении как сублетальной дозы 95 мг/кг, так и при введении смертельных доз диметоата. ДИ при низкой частоте ритмической стимуляции (3 Гц) наблюдали только после введения токсиканта в абсолютной смертельной дозе. Кроме того, отличительной чертой отравлений в высоких дозах являлось наличие прямой линейной зависимости нарастания выраженности степени декремента ($r_s=0,97$, $p=0,001$, $r^2=0,99$) от частоты ритмической стимуляции (рисунок 1).

Аналогичная корреляция была установлена и для степени выраженности инкремента. Необходимо подчеркнуть, что только в случаях тяжелого отравления диметоатом в дозах ЛД₅₀ и ЛД₉₉ у животных регистрировали декремент при различной частоте стимуляции.

Изучение ФОС-индуцированных расстройств нервно-мышечной передачи (НМП) привлекало внимание ученых в течение длительного периода времени, однако, большинство работ были посвящены исследованиям промежуточного синдрома и отдаленных полинейропатий [7, 10, 11]. В частности, оценивая диагностическую значимость ЭМГ при отравлениях ФОС, Р. Jayawardane с соавт. разработали клиническую шкалу тяжести промежуточного синдрома у людей [12]. Согласно этой шкале умеренному снижению мышечной силы соответствует наличие ДИ-ответа при частоте стимуляции 15–30 Гц, в то время, как крайняя степень промежуточного синдрома с дыхательной недостаточностью сопровождается тяжелым и прогрессирующим декрементом, начиная с частоты стимуляции 10 Гц. Результаты нашего исследования, в целом, подтверждают эти данные с учетом того факта, что клиническая манифестация расстройств НМП ассоциирована с более чем 50 % ингибированием активности АХЭ крови как у людей, так и у лабораторных животных [13]. Следовательно, выбранная экспериментальная модель валидна и позволяет экстраполировать полученные результаты на случаи отравлений людей.

Большинство клинических исследований, посвященных изучению электрофизиологических аспектов отравлений ФОС, лишены возможности анализа зависимости параметров ЭМГ от дозы токсиканта, либо в них оценивали параметры одиночной стимуляционной ЭМГ, которые малоинформативны при отравлениях ФОС [14, 15]. При этом именно результаты исследования дозозависимости позволили нам сформулировать новые ЭМГ-критерии тяжелого отравления ФОС. В частности, факт перехода ДИ в декремент давно известен как признак ухудшения и НМП, и общего состояния пораженного [10, 13]. Однако в ходе литературного поиска нами не обнаружено результатов анализа другими авторами зависимостей количества повторных М-ответов и выраженности феномена ДИ от дозы токсиканта, активности АХЭ плазмы крови и исхода интоксикации.

Считаем возможным предположить, что генез повторных М-ответов и ДИ при отравлениях ФОС может иметь взаимосвязанный механизм, заключающийся в гиперфункции постсинаптической концевой пластинки. Время жизни свободного ацетилхолина (АХ) в нервно-мышечном синапсе составляет порядка 200 микросекунд, что меньше, чем период спада потенциала концевой пластинки (рефрактерный период мышцы) [16]. Именно поэтому каждый нервный импульс вызывает одну волну деполяризации мышечного волокна, обеспечивая дискретность проведения. В условиях ингибирования АХЭ время пребывания АХ и его количество в синапсе увеличивается, что обеспечивает боковую диффузию и взаимодействие медиатора с несколькими рецепторами [9]. Эта последовательная стимуляция сайтов соседних рецепторов концевой пластинки приводит к увеличению времени затухания потенциала концевой пластинки. Как следствие, происходит асинхронное возбуждение и фасцикуляции мышечных волокон. При выраженном ингибировании АХЭ деполяризация концевой пластинки преобладает и развивается деполяризационный блок, характеризующийся декрементом по данным ЭМГ.

В таких условиях большинство ионных каналов (никотин-чувствительных ацетилхолиновых рецепторов) остается в открытом положении дольше, что приводит к

значительно более длительной фазе деполяризации концевой пластинки (более 5 мс), и закономерно влечет за собой увеличение периода абсолютной рефрактерности постсинаптической мембраны. Следовательно, второй и третий стимулы ритмической серии приходятся на фазу невозбудимости большинства рецепторов постсинаптической концевой пластинки, формируя тем самым феномен ДИ при выполнении ЭМГ [10].

Заключение

Низкая информативность исследования активности АХЭ плазмы крови для дифференциации легких и тяжелых отравлений ФОС определяет необходимость использования дополнительных методов оценки функционального состояния холинергической нейромедиаторной системы. Для данной цели могут быть использованы методы электромиографии, позволяющие оценить тяжесть нарушений этой системы на уровне нервно-мышечных синапсов. Результаты настоящего исследования позволяют рекомендовать в качестве таких критериев наличие более 3 повторных М-ответов при одиночной стимуляции, а также регистрацию при ритмической стимуляции ДИ с линейным увеличением степени декремента в диапазоне частот от 10 до 30 Гц. Для диагностики интоксикаций ФОС представляется целесообразным применение расширенного ЭМГ-протокола, который должен включать апробированную в настоящем исследовании батарею тестов ритмической стимуляции с нарастающей частотой в диапазоне 3–30 Гц. Наблюдаемые при отравлениях ФОС ЭМГ-признаки являются следствием холинергической гиперреактивности концевой пластинки, которая вызвана пролонгированной активацией н-холинорецепторов и увеличением длительности потенциалов концевой пластинки, превышающих рефрактерный период потенциала действия.

Литература

1. Медицинская токсикология: национальное руководство. Под ред. Е.А. Лужникова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 928 с.
2. Basic and clinical toxicology of organophosphorus compounds. M. Balali-Mood, M. Abdollahi, eds. – London: Springer, 2014. – 263 p.
3. Ellman G.L., Courtney D.K., Andreas V. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // *Biochem. Pharmacol.* – 1961. – Vol. 7. – P. 88–95.
4. Worek F. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood / F. Worek [et al.] // *Clinica Chimica Acta.* – 1999. – Vol. 288, № 1–2. – P. 73–90.
5. Sinko G. Limitation of the Ellman method: cholinesterase activity measurement in the presence of oximes / G. Sinko [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2007. – Vol. 370. – P. 223–227.
6. Ильинский Н.С. Электрофизиологическая характеристика расстройств нервно-мышечной передачи при остром отравлении фентионом / Н.С. Ильинский [и др.] // *Медико-биологические аспекты химической безопасности: сборник трудов III Всероссийской научной конференции молодых ученых.* – 2018. – С. 204–205.
7. Senanayake N. Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome / N. Senanayake, L. Karalliedde // *N. Engl. J. Med.* – 1987. – Vol. 316, № 13. – P. 761–763.
8. Николаев С.Г. Электромиография. Клинический практикум. – Иваново: ПресСто, 2013. – 394 с.
9. Kumar R.S. Repetitive compound muscle action potentials in electrophysiological diagnosis of congenital myasthenic syndromes: a case report and review of literature / R.S. Kumar, A. Kuruvilla // *Ann Indian Acad. Neurol.* – 2010. – Vol. 13, № 2. – P. 139–141.

10. Maselli R. Edrophonium: an aid in the diagnosis of acute organophosphate poisoning / R. Maselli, J.H. Jacobsen, J.P. Spire // *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. – 1986. – Vol. 19, № 5. – P. 508–510.
11. Чепур С.В. Отдаленные органофосфатные нейропатии: патогенез, профилактика и лечение / С.В. Чепур // *Токсикологический вестник*. – 2010. – № 3. – С. 42-43.
12. Jayawardane P. The spectrum of intermediate syndrome following acute organophosphate poisoning: a prospective cohort study from Sri Lanka / Jayawardane P. [et al.] // *PLoS medicine*. – 2008. – Vol. 5, № 7. – P. 1143–1153.
13. Thiermann H. Monitoring of neuromuscular transmission in organophosphate pesticide-poisoned patients / H. Thiermann [et al.] // *Toxicology Letters*. – 2009. – Vol. 191. – P. 297–304.
14. Karami-Mohajeri S. A systematic review on the nerve–muscle electrophysiology in human organophosphorus pesticide exposure / S. Karami-Mohajeri, S. Nikfar, M. Abdollahi // *Human & experimental toxicology*. – 2014. – Vol. 33, № 1. – P. 92–102.
15. Najari F. Evaluating diagnostic value of electrophysiological testing (emg-ncv) compared to the activity level of acetylcholinesterase in serum and red blood cells of patients with moderate to severe organophosphate poisoning / F. Najari [et al.]. – *Razavi Int. J. Med.* – 2017. – e44107.
16. Patrick J.M. A review of: «Human physiology» by R.F. Schmidt and G. Tews / J.M. Patrick. – 1983. – Vol. 26. – № 11. – P. 53.