

НАРУШЕНИЯ НЕРВНО-МЫШЕЧНОЙ ПЕРЕДАЧИ ПРИ ОТРАВЛЕНИЯХ БЛОКАТОРАМИ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Ильинский Н.С., Тюнин М.А., Гоголевский А.С., Матросова М.О., Кручинин Е.Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая д. 4, телефон/факс 8-812-775-02-41, gniiivm_2@mil.ru

Резюме. Возрастающая актуальность исследования нейротоксинов биологического происхождения обусловлена экспансией пресноводных водоемов цианобактериями, сопровождающейся учащением случаев алиментарных отравлений животных и людей. Среди нейротоксинов цианобактерий по уровню токсичности наиболее опасными являются вещества из группы блокаторов натриевых каналов (сакситоксины, тетродотоксин). С целью совершенствования методов диагностики отравлений блокаторами натриевых каналов выполнено экспериментальное исследование расстройств нервного проведения и нервно-мышечной передачи с помощью электромиографии на экспериментальной модели острого тяжелого отравления крыс тетродотоксином. Установлено, что наиболее характерными электромиографическими признаками тяжелых отравлений тетродотоксином являются прогрессивное снижение амплитуды и площади М-ответов, а также быстрое нарастание их длительности и латентности в сочетании с умеренно выраженным декрементом при ритмической стимуляции.

Ключевые слова: отравление, блокаторы натриевых каналов, электромиография, тетродотоксин, нейрофизиология, диагностика.

NEUROMUSCULAR TRANSMISSION DISORDERS FOLLOWING INTOXICATIONS WITH SODIUM CHANNEL BLOCKERS: EXPERIMENTAL STUDY

Ilinskiy N.S., Tyunin M.A., Gogolevskiy A.S., Matrosova M.O., Kruchinin E.G.

State Scientific-research Test Institute of the Military Medicine, Russian Federation
Defense Ministry, Saint-Petersburg, Russia.

Abstract. The growing relevance of research of neurotoxins having biological origin is stipulated by expansions of freshwater reservoirs by cyanobacteria, accompanied by an increase in the incidence of alimentary poisoning of animals and people. Among the cyanobacteria neurotoxins in terms of toxicity, the most dangerous are substances from the group of sodium

channel blockers (saxitoxins, tetrodotoxin). In order to improve the quality of diagnosis of poisoning by sodium channel blockers an experimental study of neural conduction and neuromuscular transmission disorders was performed using electromyography in an experimental model of an acute severe poisoning of rats with tetrodotoxin. It was found that the most characteristic electromyographic signs of severe tetrodotoxin poisoning are a progressive decrease in the amplitude and area of compound muscle potentials, as well as a rapid increase in their duration and latency in combination with a moderately pronounced decrement during rhythmic stimulation.

Key words: poisoning, sodium channel blockers, electromyography, tetrodotoxin, neurophysiology, diagnostics.

Введение. В последние годы в связи с нарастающей антропогенной эвтрофикацией водных систем отмечено расширение ареалов обитания цианобактерий (сине-зеленых водорослей), что представляет собой серьезную экологическую проблему, в том числе, и на территории Российской Федерации [1]. Экспансия пресноводных водоемов цианобактериями сопровождается учащением случаев алиментарных отравлений животных и людей многочисленными токсинами этих микроорганизмов, так как помимо непосредственного накопления в воде, они могут быть аккумулированы рыбами и моллюсками [2].

Цианобактерии способны синтезировать сотни биологически активных веществ с различной токсичностью, среди которых выделяют нейротоксины, гепатотоксины, цитотоксины и эндотоксины. По уровню токсичности наибольшую опасность представляют нейротоксины, основные физиологические эффекты которых обусловлены способностью блокировать ионную проводимость потенциал-зависимых натриевых каналов [3]. К данной группе нейротоксинов относят сакситоксины (более 57 веществ) и тетродотоксины (около 25 веществ), продуцентами последних являются не менее 10 родов различных микроорганизмов [4, 5, 6].

Проблемными вопросами оказания медицинской помощи при отравлениях блокаторами натриевых каналов остаются трудности верификации диагноза [3, 7, 8]. Точное определение причины отравления может быть выполнено только в результате химико-токсикологического исследования или использования лабораторных средств экспресс-индикации нейротоксинов [9, 10]. Учитывая стремительное течение интоксикаций многие специалисты подчеркивают необходимость разработки

эффективных и быстрых способов диагностики отравлений нейротоксинами из группы блокаторов натриевых каналов [11].

В качестве решения данной проблемы может быть использована электромиография [12]. Возможности данного метода позволяют в течение нескольких минут установить основной механизм нарушений электрофизиологических процессов в периферической нервной системе, лежащих в основе нейротоксического действия, и проследить их динамику как при утяжелении интоксикации, так и в период выздоровления. Вместе с тем, для внедрения метода электромиографии в диагностику отравлений нейротоксинами из группы блокаторов натриевых каналов требуется совершенствование методического аппарата и расширение знаний о характерных признаках расстройств нервно-мышечной передачи, развивающихся при подобных интоксикациях.

Цель. Исследовать расстройства нервно-мышечной передачи при острых тяжелых отравлениях веществами нейротоксического действия из группы блокаторов натриевых каналов на примере тетродотоксина.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 15 беспородных крысах-самцах (питомник ФГУП «ПЛЖ «Рапполово», Ленинградская обл.), массой 220–250 г. Отравление моделировали путем подкожного введения раствора тетродотоксина (98%, Sigma Aldrich, Германия) в среднесмертельной дозе (17 мкг/кг).

Электромиографию (ЭМГ) у крыс выполняли через каждые 10 мин в течение первого часа наблюдения с помощью электромиографа «Нейро-МВП-4» («Нейрософт», Россия) и программного обеспечения «Нейро-МВП-омега» (версия 3.7.3.1). Исследование проводили без применения общей анестезии на правой икроножной мышце крысы (стимулировали *n. tibialis*) с помощью монополярных игольчатых электродов при комнатной температуре (20–22 °С) и общей нормотермии крысы. Электромиографическое исследование включало одиночную супрамаксимальную стимуляцию, ритмическую стимуляцию (10 импульсов длительностью 0,2 мс) с частотой 3–30 Гц (с интервалом в 15 сек) и пробу с тетанизацией по стандартной методике.

При одиночной стимуляции оценивали следующие параметры М-ответа: амплитуда, длительность, площадь, дистальная латентность, скорость распространения моторной волны (СРВ). При ритмической стимуляции (РС) фиксировали характер и степень выраженности ЭМГ-феноменов (декремент, инкремент, декремент-инкремент). Сравнение показателей проводили с данными, полученными заблаговременно до индукции отравления (фоновые значения). ЭМГ-феномены количественно характеризовали степенью снижения амплитуды последнего М-ответа относительно

первого. При выявлении инкремента проводили анализ по площади негативного пика для исключения псевдофасилитации. Колебания амплитуды М-ответов в пределах 10 % принимали за норму [13].

Полученные на связанных выборках данные анализировали с помощью критерия Вилкоксона. Результаты представлены в виде медианы и межквартильного интервала. Для статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft, США) в операционной среде Windows 7. За номинальный уровень статистической значимости принимали значение $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Первые признаки интоксикации у крыс после подкожного введения тетродотоксина манифестировали в среднем через 8 мин (от 5 до 13 мин). Первыми явными клиническими признаками отравления у крыс были поведенческие нарушения в виде моторного возбуждения и повышенной агрессии. Затем, в течение следующих 10–20 мин, последовательно наступали общее угнетение, цианоз дистальных отделов конечностей, постуральная неустойчивость, утрата рефлекса поддержания позы, адинамия, тетраплегия, диспноэ. Гибель животных наблюдали в течение первого часа после введения токсина (таблица 1). У выживших животных отмечали постепенное восстановление общего состояния в течение первых суток наблюдения. У выживших крыс отмечали транзиторное снижение массы тела в среднем на 10 % в течение первых трех суток, после чего она восстанавливалась до прежних значений.

Таблица 1

Распределение гибели и динамика показателей стимуляционной ЭМГ у крыс после подкожного введения тетродотоксина в среднесмертельной дозе (17 мкг/кг),

Me [Q1;Q3], n=15

Время после заправки, мин	Гибель, абс.	Амплитуда М-ответа, мВ	Длительность М-ответа, млс	Дистальная латентность, млс	Площадь М-ответа, мВ*млс	СРВм, м/с
фон	-	34,5 [30,0;37,6]	2,3 [2,1;2,6]	0,7 [0,6;0,9]	47,3 [38,1;49,0]	32,6 [28,0;36,3]
10	0/15	25,2 [23,0;33,4]	2,5 [2,4;2,7]	1,1* [1,0;1,1]	38,2 [27,6;44,5]	23,4* [20,0;25,0]
20	4/15	21,3* [17,4;27,1]	2,7* [2,5;3,0]	1,2* [1,0;1,3]	32,5* [25,2;39,7]	21,4* [19,1;23,8]
30	7/15	7,9* [7,0;19,0]	3,2* [3,0;3,4]	1,2* [1,1;1,4]	16,5* [10,8;37,0]	20,2* [16,3;25,5]
40	8/15	8,5* [7,3;19,4]	3,1* [2,8;3,5]	1,3* [1,0;1,5]	18,4* [12,3;35,3]	22,2* [17,3;27,5]
50	9/15	12,8* [8,3;23,4]	2,9* [2,5;3,3]	1,2* [1,0;1,4]	28,5* [24,5;34,6]	24,2* [20,1;27,3]

Время после заправки, мин	Гибель, абс.	Амплитуда М-ответа, мВ	Длительность М-ответа, млс	Дистальная латентность, млс	Площадь М-ответа, мВ*млс	СРВм, м/с
60	9/15	18,4* [14,3;23,1]	2,8* [2,4;3,3]	1,1* [0,9;1,3]	30,3* [25,4;38,5]	25,2* [21,2;29,1]
Примечание: * - различия статистически значимы относительно фоновых значений при $p > 0,05$						

По результатам одиночной стимуляционной ЭМГ регистрировали быстропрогрессирующее снижение амплитуды и площади М-ответов, увеличение дистальной латентности и, как следствие, понижение моторной СРВ. Эти изменения возникали уже через 10 мин после заправки, однако первыми, уровня статистической значимости различий с фоновыми показателями, достигли только последние два признака. При последующих исследованиях наблюдали выраженное уменьшение амплитуды и площади М-ответов (таблица 1).

Учитывая, что при отравлениях тетродотоксином изменения ЭМГ-картины отражали быстрое прогрессирование интоксикации, то для количественной оценки феномена прогрессии указанных параметров нами предложена характеристика «скорость снижения М-ответа», которая может быть рассчитана как отношение разницы амплитуд М-ответов при двух последовательных исследованиях, выраженной в процентах относительно первого значения, к единице времени в минутах. Выполнив расчет данного показателя относительного фонового (нормального) значения М-ответов, было установлено, что в течение первых 30 мин после введения токсина скорость снижения амплитуды М-ответа составила 2,2–2,6 %/мин. Стоит отметить, что столь быстрое изменение данного параметра, вероятно, может представлять собой самостоятельный диагностический критерий тяжелого отравления тетродотоксином.

При одиночной стимуляции выявляли характерные изменения формы М-ответов. Через 20–30 мин после введения токсина в 66,7 % регистрировали появление полифазии М-ответов (чаще в виде «двугорбого») и уплощение позитивного пика, отражающее нарушение процессов реполяризации мышц (рисунок 1).

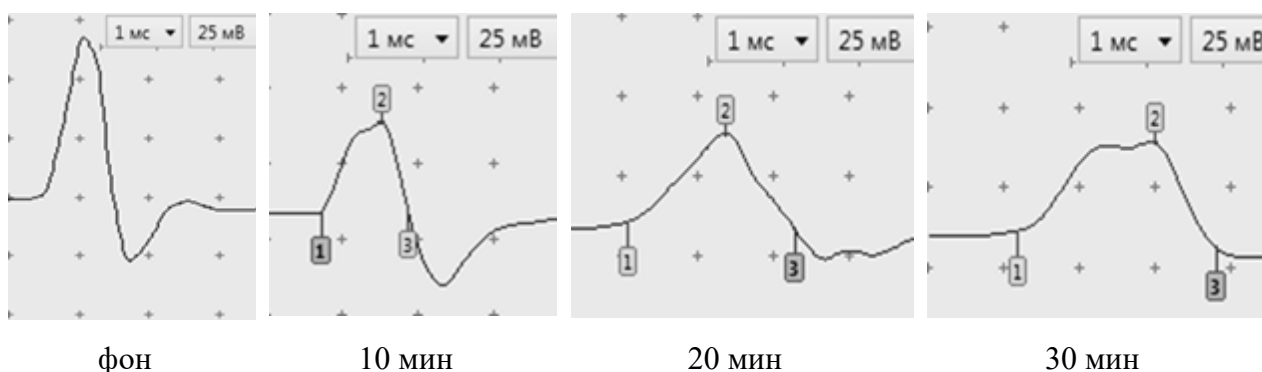


Рисунок 1 – Типичные изменения формы М-ответов, наблюдаемые в динамике у крыс при отравлении тетродотоксином в среднесмертельной дозе (17 мкг/кг, подкожно)

Анализ данных, полученных в тесте ритмической стимуляции (РС) показал, что тяжелое отравление тетродотоксином сопровождается развитием умеренно выраженного декремента амплитуды и площади М-ответов в пределах 14–35 %. Клинически и статистически ($p < 0,05$) значимый декремент наблюдали уже спустя 10 мин после введения токсина. В течение первых 30–40 мин также определяли нарастание выраженности декремента с последующим восстановлением к нормальным значениям у выживших животных. У погибших животных регистрировали усиление декремента. Примечательно, что вероятность обнаружения расстройств нервно-мышечной передачи возрастала с частотой стимуляции, что также было описано нами ранее на моделях интоксикаций антихолинэстеразными соединениями [14].

В ходе пробы с тетанизацией были выявлены признаки нарушения НМП по миастеническому типу с декрементом амплитуды М-ответов величиной 45,7 % при первом исследовании (через 10 мин) и величиной 68,9 % при четвертом обследовании (через 40 мин). В дальнейшем регистрировали тенденцию к улучшению ответа на тетанизацию. По результатам пробы с тетанизацией в течение всего периода наблюдения выявлено посттетаническое истощение, так как в поздней серии (через 3 мин после тетанизации) у всех животных обнаруживали усиление выраженности декремента. Помимо этого, проба с тетанизацией приводила к уменьшению амплитуды первого М-ответа на 16–30 % в ранней и поздней посттетанических сериях по сравнению с прететаническим состоянием.

В литературе представлено незначительное количество работ, посвященных электрофизиологическим исследованиям при отравлениях блокаторами натриевых каналов. Большая часть этих работ представляет собой описания единичных клинических случаев отравлений тетродотоксином при употреблении в пищу рыбы семейства *Tetraodontidae* [12, 15, 16]. Краткий литературный обзор позволил заключить, что

полученные нами экспериментальные данные соответствуют имеющимся сведениям о нарушениях проводимости периферических нервов и дополняют их в понимании нарушений нервно-мышечной передачи, характерных для тяжелых интоксикаций. Выявленные нами нарушения нервно-мышечной передачи при ритмической стимуляции подтверждают ранее опубликованные данные о прямом влиянии блокаторов натриевых каналов на постсинаптические структуры [17]. Однако в сравнении со степенью нарушений проводимости на всем протяжении нерва (латентность, амплитуда, длительность М-ответа, СРВм) расстройства синаптической передачи менее выражены, что указывает на ведущую роль неврального компонента в проявлении нейротоксичности блокаторов натриевых каналов.

Заключение. Настоящее экспериментальное исследование позволило проследить характерные электромиографические признаки нарушений нервной проводимости и нервно-мышечной передачи при тяжелых отравлениях тетродотоксином, а именно: прогрессивное снижение амплитуды и площади М-ответов, быстрое нарастание их длительности и латентности в сочетании с умеренно выраженным декрементом при ритмической стимуляции. Полученные результаты демонстрируют не только возможности электрофизиологических исследований в диагностике острых интоксикаций тетродотоксином, но и в мониторинге состояния пострадавшего. Исходя из полученных данных, можно прогнозировать схожую электромиографическую картину при интоксикациях другими нейротоксикантами из группы блокаторов натриевых каналов. В дальнейшем представляется целесообразным продолжение исследований, направленных на изучение дозозависимых нарушений нервно-мышечной передачи при интоксикациях веществами нейротоксического действия из групп блокаторов и активаторов натриевых каналов различной структуры.

Литература

1. Chernova E. et al. Dolichospermum and Aphanizomenon as neurotoxins producers in some Russian freshwaters / *Toxicon*. 2017. V. 130. Article: 47e55.
2. Miller T.R. et al. Cyanobacterial toxins of the Laurentian Great Lakes, their toxicological effects, and numerical limits in drinking water / *Mar. Drugs*. 2017. V. 15. N 6. P. E160–211.
3. Llewellyn L.E. Sodium channel inhibiting marine toxins / *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. 2009. V. 46. P. 67–97.

4. Pratheepa V., Vasconcelosa V. Microbial diversity associated with tetrodotoxin production in marine organisms / *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2013. V. 36. P. 1046–1054.
5. Гелашвили Д.Б., Крылов В.Н., Романова Е.Б. Зоотоксикология: биоэкологические и биомедицинские аспекты. Нижний Новгород: Изд-во ННГУ, 2015. 770 с.
6. Chau R., Kalaitzis J.A., Neilan B.A. On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin / *Aquatic Toxicology*. 2011. Vol. 104. P. 61–72.
7. Власенко А.Е. и др. Исследование белков, связывающих токсины гуанидинового ряда в морском черве *Cephalothrix simula*: поиск потенциальных антидотов морских токсинов / *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2016. Т. 18. N 2–3. С. 647–652.
8. Encyclopedia of toxicology. 2nd edition. Ed. P. Wexler. Academic Press, 2005. P. 161–162.
9. Кузнецов В.Г. Антитела против низкомолекулярных гуанидиновых нейротоксинов как средство детоксикации и аналитической диагностики / *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2017. Т. 19. N 5-2. С. 313–317.
10. Рыбальченко И.В. и др. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения для определения подлинности и количественного содержания тетродотоксина в лекарственных препаратах / *Журнал аналитической химии*. 2017. Т. 72. N 6. С. 545–551.
11. Knutsen H.K. et al. Risk for public health to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA Journal*. 2017. V. 15. N 5. Article 4752.
12. Liu D., Zhang J., Han B., Pen L. An electrophysiological study of acute tetrodotoxin poisoning / *Cell Biochem. Biophys.* 2011. Vol. 59. N 1. P.13–18.
13. Николаев С.Г. Электромиография: клинический практикум. Иваново: ПресСто, 2013. 394 с.
14. Ильинский Н.С., Тюнин М.А., Матросова М.О. Экспериментальное обоснование применения высокочастотной ритмической стимуляции для диагностики нарушений нервно-мышечной передачи при дефиците ацетилхолинэстеразы. Материалы конференции «Болезни периферических нервов и мышц: необходимый и достаточный объем исследования», Москва. 2019. С. 17.
15. Fong V.H., Chow S.Y. Electrophysiological studies on acute tetrodotoxin poisoning: a case report / *Chinese medical journal*. 1996. V. 58. N 4. P. 299–302.

16. Trevett A.J., Mavo B., Warrell D.A. Tetrodotoxic poisoning from ingestion of a porcupine fish (*Diodon hystrix*) in Papua New Guinea: nerve conduction studies / *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1997. V. 56. N 1. P. 30–32.
17. Moczydlowski E.G. The molecular mystique of tetrodotoxin / *Toxicon*. 2012. V. 4461. P. 1–19.

Reference

1. Chernova E. et al. Dolichospermum and Aphanizomenon as neurotoxins producers in some Russian freshwaters / *Toxicon*. 2017. V. 130. Article: 47e55.
2. Miller T.R. et al. Cyanobacterial toxins of the laurentian great lakes, their toxicological effects, and numerical limits in drinking water / *Mar. Drugs*. 2017. V. 15. N 6. P. E160–211.
3. Llewellyn L.E. Sodium channel inhibiting marine toxins / *Progress in Molecular and Subcellular Biology*. 2009. V. 46. P. 67–97.
4. Pratheepa V., Vasconcelosa V. Microbial diversity associated with tetrodotoxin production in marine organisms / *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2013. V. 36. P. 1046–1054.
5. Gelashvili D.B., Krylov V.N., Romanova E.B. *Zootoxinology*. Nizhniy Novgorod: NNGY, 2015. 770 p. [In Russian].
6. Chau R., Kalaitzis J.A., Neilan B.A. On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin / *Aquatic Toxicology*. 2011. Vol. 104. P. 61–72.
7. Vlasenko A.E. et al. Research the guanidine-binding proteins in a marine worm *Cephalothrix simula*: search of promising antidotes for marine toxins / *Izvestia Samarskogo nauchnogo centra Rossiyskoy akademii nauk*. 2016. V. 18. N 2–3. P. 647–652. [In Russian].
8. *Encyclopedia of toxicology*. 2nd edition. Ed. P. Wexler. Academic Press, 2005. P. 161–162.
9. Kuznetsov V.G. Antibodies against low-weight guanidine neurotoxins as an instrument of detoxication and analytical diagnostic. *Izvestia Samarskogo nauchnogo centra Rossiyskoy akademii nauk*. 2017. V. 19. N 5-2. P. 313–317. [In Russian].
10. Rybal'chenko I.V. et al. The use of high performance liquid chromatography in combination with high resolution mass spectrometry to determine the consistency and quantitative content of tetrodotoxin in drugs / *Journal of analytical chemistry*. 2017. V. 72. N 6. P. 545–551. [In Russian].
11. Knutsen H.K. et al. Risk for public health to the presence of tetrodotoxin (TTX) and TTX analogues in marine bivalves and gastropods. *EFSA Journal*. 2017. V. 15. N 5. Article 4752.

12. Liu D., Zhang J., Han B., Pen L. An electrophysiological study of acute tetrodotoxin poisoning / *Cell Biochem. Biophys.* 2011. Vol. 59. N 1. P.13–18.
13. Nikolaev S.G. *Electromyography: clinical practice.* Ivanovo: PresSto, 2013. 394 p. [In Russian].
14. Ilinskiy N.S., Tyunin M.A., Matrosova M.O. Experimental substantiation of the use of high-frequency rhythmic stimulation for the diagnosis of neuromuscular transmission disorder with acetylcholinesterase deficiency. Materials of conference «Disorders of peripheral nerves and muscle: necessary and sufficient amount of research», Moscow. 2019. P. 17 [In Russian].
15. Fong V.H., Chow S.Y. Electrophysiological studies on acute tetrodotoxin poisoning: a case report / *Chinese medical journal.* 1996. V. 58. N 4. P. 299–302.
16. Trevett A.J., Mavo B., Warrell D.A. Tetrodotoxic poisoning from ingestion of a porcupine fish (*Diodon hystrix*) in Papua New Guinea: nerve conduction studies / *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1997. V. 56. N 1. P. 30–32.
17. Moczydlowski E.G. The molecular mystique of tetrodotoxin / *Toxicon.* 2012. V. 4461. P. 1–19.