

Методические подходы к оценке паралитического синдрома токсического генеза в экспериментах на грызунах

Н.С. Ильинский, заместитель начальника отдела ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ.

ORCID: 0000-0001-7406-753X

М.А. Тюнин, начальник отдела ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ, к.м.н.

ORCID: 0000-0002-6974-5583

М.О. Матросова, младший научный сотрудник ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ.

ORCID: 0000-0002-1395-823X

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины»
Министерства обороны Российской Федерации
195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4

Резюме. Требования фармакологической безопасности предписывают необходимость выполнения экспериментальной оценки потенциальных нейротоксичных эффектов разрабатываемых лекарственных средств. При этом сохранена необходимость экспериментального моделирования заболеваний периферической нервной системы для изучения их патогенеза и разработки новых подходов к терапии. В настоящее время внедрен в практику широкий перечень клинко-функциональных тестов, позволяющих выявить многие виды неврологического дефицита. Однако сохраняются некоторые терминологические и методологические разночтения между клинической и экспериментальной практикой. Все это обуславливает высокую актуальность исследований по совершенствованию методов оценки нейротоксических эффектов ксенобиотиков в экспериментах на лабораторных грызунах.

Цель – сравнить информативность исследования физиологического двигательного рефлекса у крыс при помощи шкалы отведения пальцев с другими рекомендованными методиками оценки периферического пареза.

Проведено комплексное клинко-инструментальное исследование по динамической оценке неврологического статуса самцов беспородных крыс на модели токсического тетрапареза, вызванного подкожным введением ЛД16 тетродотоксина. Введение тетродотоксина способно стабильно и с высокой повторяемостью вызывать у подопытных животных своеобразный синдром моторного дефицита (периферический парез) за счет неврального и мышечного компонентов. Внешние проявления интоксикации у крыс оценивали с помощью теста подтягивания на перекладине, «Ротарод» и шкалы отведения пальцев. С целью верификации нарушений процессов невального проведения и нервно-мышечной передачи животным выполняли электронейромиографию и декремент-тест.

Результаты исследования продемонстрировали, что общепринятый в настоящее время методический аппарат экспериментальной оценки неврологического статуса способен выявить нарушения двигательных функций у крыс при достаточной их выраженности, когда по данным нейрофизиологического исследования уже наличествуют грубые изменения основных параметров. В ходе сравнения скорости возникновения и выраженности внешних признаков интоксикации установлено, что оценка физиологического двигательного рефлекса при помощи шкалы отведения пальцев обладает достаточно высокой информативностью и простотой тестирования, делая возможным выявление ранних признаков периферического пареза токсического генеза.

Ключевые слова: нейротоксичность, методика, парез, паралич, тетродотоксин, крысы, электромиография..

Для цитирования: Ильинский Н.С., Тюнин М.А., Матросова М.О. Методические подходы к оценке паралитического синдрома токсического генеза в экспериментах на грызунах. Лабораторные животные для научных исследований. 2021; 03: 70–74. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-03-09>

Methodological approaches to the assessment of paralytic syndrome of toxic genesis in experiments on rodents

N.S. Ilinskiy, deputy head of the department of the State scientific-research test Institute of military medicine of Defense Ministry of the Russian Federation. ORCID: 0000-0001-7406-753X

M.A. Tyunin, head of department of the State scientific-research test Institute of military medicine of Defense Ministry of the Russian Federation. ORCID: 0000-0002-6974-5583.

M.O. Matrosova, Junior Research Fellow. ORCID: 0000-0002-1395-823X

State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine, Ministry of Defense of Russian Federation
195043, Russian Federation, Saint Petersburg, Lesoparkovaya Str., 4

Abstract. Pharmacological safety requirements dictate the need to perform an experimental assessment of the potential neurotoxic effects of drugs under development. At the same time, the need for experimental modeling of diseases of the peripheral nervous system for studying their pathogenesis and developing new approaches to therapy has been preserved. Currently, a wide range of clinical and functional tests has been introduced into practice, allowing to identify many types of neurological deficits. However, some terminological and methodological discrepancies remain between clinical and experimental practice. All this determines the high relevance of studies to improve methods for assessing the neurotoxic effects of xenobiotics in experiments on laboratory rodents.

The aim this study – compare the information content of the study of the physiological motor reflex in rats using the finger abduction scale with other recommended methods for assessing peripheral paresis.

A complex clinical and instrumental study was carried out to dynamically assess the neurological status of male outbred rats using a model of toxic tetraparesis caused by subcutaneous administration of tetrodotoxin at a dose of LD16. The introduction of tetrodotoxin is capable of stably and with high repeatability causing a kind of motor deficiency syndrome (peripheral paresis) in experimental animals due to the neural and muscle components. External manifestations of intoxication in rats were assessed using the pull-up test on the bar, Rotarod, and the digit abduction scale. In order to verify violations of the processes of neural conduction and neuromuscular transmission, the animals underwent electroneuromyography and decrement-test.

The results of the study demonstrated that the currently generally accepted methodological apparatus for the experimental assessment of neurological status is capable of detecting motor dysfunctions in rats if they are sufficiently pronounced, when, according to neurophysiological research, gross changes in the main parameters are already present. When comparing the rate of onset and severity of external signs of intoxication, it was found that the assessment of the physiological motor reflex using the finger abduction scale has a sufficiently high information content and ease of testing, making it possible to identify early signs of peripheral paresis of toxic genesis.

Key words: neurotoxicity, technique, paresis, paralysis, tetrodotoxin, rats, electromyography.

For citation: Ilinskiy N.S., Tyunin M.A., Matrosova M.O. Methodological approaches to the assessment of paralytic syndrome of toxic genesis in experiments on rodents. *Laboratory Animals for Science*. 2021; 03: 70–74. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-03-09>

Введение

Вопросы стандартизации и повышения качества исследований безопасности химических соединений, особенно в отношении нейротоксичности, в экспериментах на животных представляют актуальную задачу, в том числе по причине методических разночтений. На сегодняшний день сохранена проблема неоднозначных подходов к терминологии, способам оценки и трактовке результатов исследований параличей (парезов) токсического генеза, при этом их скрининговая доклиническая оценка на грызунах представляет собой необходимый минимум, что подтверждено наличием многочисленных вариаций батарей клинико-функциональных тестов (КФТ) [1]. В соответствии с принятой в неврологии терминологией [2] расстройство двигательной функции в виде полного отсутствия произвольных движений вследствие нарушения иннервации соответствующих мышц называют параличом. При частичном нарушении двигательной функции говорят о парезе. Для периферических параличей (парезов) характерно сочетание следующих признаков: снижение объема активных движений и/или мышечной силы; снижение мышечного тонуса, физиологических рефлексов, замыкающихся на этих мышцах; атрофия или гипотрофия

паретичных мышц; фасцикуляции (или фибрилляции) пораженных мышц [2]. Следовательно, для одновременной оценки всех вышеописанных симптомов необходимо применять комплекс соответствующих диагностических приемов. Методический аппарат по исследованию мышечной силы у мелких лабораторных животных наиболее разнообразен и популярен среди иностранных и отечественных ученых. Широко применяют методики подтягивания на горизонтальной перекладине, удерживания на решетке, измерение силы захвата с использованием специализированных приборов [1]. Несколько несоответствующими цели, однако, общепринятыми и традиционными способами оценки состояния мышечного тонуса (или миорелаксанта-ного эффекта) в экспериментах являются методы вращающегося стержня («Ротарод»), бега на тротуаре, ипсилатеральный сгибательный рефлекс. Наиболее близкая к клинической практике методика пальпаторного исследования тонуса мышц живота у крыс выглядит излишне субъективной и трудно ранжируемой [2].

Вместе с тем в отечественной литературе представлено недостаточно методик исследования состояния двигательных рефлексов у грызунов как признаков периферического пареза. В связи с этим проведено сравнительное динамическое исследо-

вание информативности различных способов оценки двигательных функций крыс в эксперименте на модели острого тяжелого отравления блокаторм натриевых каналов. Выбор тетродотоксина (ТТ) в качестве модельного токсиканта обусловлен особенностями его механизма действия, определяемыми наличием точек приложения на протяжении аксонов смешанных периферических нервов и на сарколемме поперечнополосатых миоцитов, что позволяет в течение короткого времени стабильно и с высокой повторяемостью вызывать у подопытных животных своеобразный синдром моторного дефицита (периферический парез) за счет неврального и мышечного компонентов.

Цель исследования – сравнить информативность исследования физиологического двигательного рефлекса у крыс при помощи шкалы отведения пальцев (ШОП) с другими рекомендованными методиками оценки периферического пареза.

Материал и методы

Эксперименты выполнены с соблюдением принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986), в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики и директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Исследование проведено на 40 самцах беспородных крыс (питомник ФГУП «ПЛЖ «Рапполово», Ленинградская обл., Россия). Животных содержали в стандартных условиях окружающей среды (фото-режим 12 ч свет/12 ч темнота, температура воздуха $22 \pm 3^\circ\text{C}$, влажность $55 \pm 10\%$). В качестве корма использовали «Корм для содержания лабораторных животных» ЛБК-120, приготовленный в соответствии с ГОСТом Р 50258-92. Воду в стандартных поилках со стальными крышками-носиками давали *ad libitum*. В качестве подстила использовали древесные опилки из лиственных пород деревьев. После завершения эксперимента животных подвергали эвтаназии в CO_2 -камере.

Периферический парез токсической природы моделировали путем подкожного введения раствора ТТ (CAS № 4368-28-9, Sigma Aldrich, Германия) в дозе ЛД₁₆ (8,5 мкг/кг). В качестве растворителя использовали цитратный буфер (рН 4,5). Исследования выполняли в двух равных группах животных. Весь объем обследования животных проводили с периодичностью в 2 мин в течение первых 30 мин после введения ТТ.

Первую группу ($n=20$) оценивали с помощью КФТ (ШОП, «Ротарод», ООО «Нейроботикс», Россия),

подтягивание на горизонтальной перекладине). Оценку по ШОП выполняли в соответствии с методикой R.S. Broide и соавт. [3] в собственной модификации. Оценивали 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. Здоровое животное способно удерживать такое положение достаточно длительно (>10 с), что соответствовало 0 баллов ШОП. На фоне токсического пареза выраженность данного рефлекса снижалась: первоначально крыса расставляла пальцы на несколько секунд, затем 1 или 2 пальца стопы оказывались прижатыми друг к другу – 1 балл, 3 пальца – 2 балла, 4 пальца – 3 балла, все 5 пальцев или полное отсутствие попытки разведения пальцев – 4 балла. Методику «Ротарод» (ООО «Нейроботикс», Россия) выполняли, измеряя время (с), в течение которого крыса способна передвигаться по вращающемуся со скоростью 5 об/мин стержню (в норме >120 с) [1]. Тест подтягивания на горизонтальной перекладине («перекладина») оценивали по способности крыс подтянуться из положения виса на передних конечностях и зацепиться нижней конечностью за перекладину в течение 20 с. Тест считался не выполненным (отрицательным), если животному требовалось больше времени или оно вовсе не удерживалось на перекладине [1].

С целью объективизации нарушений нервно-мышечного проведения и передачи второй группе крыс ($n=20$) выполняли электронейромиографию (ЭНМГ) икроножной мышцы (*n. tibialis*) правой тазовой конечности по методике, описанной ранее [4]. При одиночной стимуляции оценивали следующие параметры М-ответа: амплитуда, длительность, площадь, дистальная латентность. При ритмической стимуляции фиксировали характер и степень выраженности декремента площади М-ответов. Сравнение показателей проводили с данными, полученными заблаговременно до индукции отравления (фоновые значения). ЭНМГ-феномены количественно характеризовали степень снижения амплитуды последнего М-ответа относительно первого. При выявлении инкремента выполняли анализ по площади негативного пика для исключения псевдофасилитации. Колебания площади М-ответов в пределах 10% принимали за норму.

Связанные выборки сравнивали с помощью непараметрического критерия знаковых рангов Уилкоксона; бинарные данные определяли, используя точный критерий Фишера. Результаты представляли в виде медианы и межквартильного

Основные результаты динамического клинико-инструментального обследования крыс после подкожного введения тетродотоксина в дозе 8,5 мкг/кг (n=40, Me [Q1; Q3])

Параметр	Фон	10 мин	16 мин	20 мин	26 мин	30 мин
ЭНМГ						
Амплитуда М-ответа, мВ	41,0 [38,0; 41,8]	38,6 [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]
Площадь М-ответа, мВ×мс	44,5 [43,9; 47,6]	52,2 [51,3; 52,6]	49,3 [49,2; 49,8]	45,8 [43,3; 50,7]	40,3* [35,7; 43,4]	26,9* [23,9; 30,7]
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]
КФТ						
ШОП	0	1 [0; 1]	1* [1; 1]	1* [1; 2]	2* [2; 3]	4* [4; 4]
«Ротарод», с	> 120,00	> 120,00	> 120,00	104,7* [95,3; 124,4]	75,8* [64,1; 96,2]	28,8* [14,6; 45,4]

интервала. Для статистической обработки данных использовали пакет прикладных программ Statistica 10.0 (StatSoft, США) в операционной среде Windows7. За номинальный уровень статистической значимости принимали значение $p < 0,05$.

Результаты

Первые признаки отравления регистрировали у крыс в среднем через 14 мин (8–20) после подкожного введения ТТ. Они выражались в усилении активно-поискового поведения за счет ориентировочно-исследовательских компонентов (учащение горизонтальных перемещений, принюхивание), резко сменявшихся эпизодами адинамии. Затем (через 15–30 мин) отмечали снижение спонтанной двигательной активности, гипертонус хвоста, признаки нарастающего паралитического синдрома. Обращали на себя внимание нарушения со стороны дыхательной системы: первоначально наблюдали увеличение частоты дыхания, затем (через 30–45 мин) – снижение глубины и частоты дыхания, участие вспомогательной мускулатуры, вынужденные позы. В течение первых 1,5–2 ч у всех животных отмечали задержку урикации и дефекации. Гибель 10 % (2/20) крыс регистрировали в течение 60–75 мин после аппликации ТТ.

У всех животных регистрировали типичную этапность паралитического синдрома на фоне отравления ТТ: в первую очередь проявлялись постуральные изменения в виде прекращения опоры только на дистальные отделы конечностей («опора на предплечья и голени»). Затем выявляли двустороннее снижение роговичного рефлекса, симме-

тричный птоз, атаксию в виде заваливания в сторону и несколько асинхронного перемещения конечностей. При подъеме крысы за хвост отмечали уменьшение расстояния между разведенными конечностями, а затем и полную невозможность их разведения. Постуральные нарушения усиливались и к 40-й минуте животные были не способны удерживать голову достаточно приподнятой над поверхностью, полностью утрачивали опору на конечности. В ответ на болевые раздражения регистрировали попытки передвижения ползком, вытягивание конечностей в стороны под углом, близким к прямому от сагиттальной плоскости тела.

Интересно, что отсутствие способности удерживать разведенные пальцы в течение 10 с (снижение физиологического рефлекса) регистрировали у 40% уже через 8 мин после затравки, а к 16-й минуте состояние 100% крыс оценивали в 1 балл по ШОП, причем в этот период с помощью других КФТ не было выявлено значимых отклонений у абсолютного большинства животных. Через 20 мин после введения ТТ по данным всех применяемых КФТ было зарегистрировано развитие токсического периферического пареза (см. таблицу), характеристики которого продолжали ухудшаться в течение следующих 10 мин наблюдения.

ЭНМГ-исследование позволило выявить ТТ-индуцированное страдание функций периферической нервной системы в виде статистически значимых изменений основных параметров невралгического проведения раньше, чем любой из КФТ. Так, длительность М-ответов увеличилась ($p=0,04$) уже через 6 мин после введения ТТ, амплитуда умень-

шилась ($p=0,01$) через 10 мин, латентность увеличилась ($p=0,03$) через 15 мин. Нарастание декремента площади М-ответов как признак снижения надежности нервно-мышечной передачи достигло уровня статистической значимости через 8 мин.

Заключение

Результаты проведенного исследования позволяют заключить, что общепринятый в настоящее время методический аппарат экспериментальной оценки паралитического или миорелаксанта действия ксенобиотиков с помощью КФТ способен выявить нарушения нервно-мышечного проведения и передачи при достаточной их выраженности, когда по данным ЭНМГ уже наличествуют грубые изменения основных параметров. При этом рассмотренная адаптированная методика ШОП позволила обнаружить наиболее ранние признаки периферического пареза, что было хронологически сопоставимо с данными ЭНМГ. Оценка физиологического двигательного рефлекса у крыс при помощи ШОП обладает достаточно высокой информативностью и простотой тестирования, делая возможным выявление ранних признаков периферического пареза на фоне отравления ТТ. С целью дальнейшей валидации искомой методики целесообразно проводить эксперименты с применением нейротоксичных ксенобиотиков других химических групп и механизмов действия, а также изучить зависимость баллов по ШОП с дозами выбранных токсикантов.

Вклад авторов

Н.С. Ильинский – концепция, сбор и анализ данных, написание текста статьи.

М.А. Тюнин – научное консультирование, утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

М.О. Матросова – сбор и анализ данных.

Сведения о конфликте интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Author's Contribution

Ilyinskiy N. S. – deputy head of the department of the State scientific-research test Institute of military medicine of Defense Ministry of the Russian Federation. ORCID: 0000-0001-7406-753X

Tyunin M. A. – head of department of the State scientific-research test Institute of military medicine of Defense Ministry of the Russian Federation., Ph.D. ORCID: 0000-0002-6974-5583.

Matrosova M. O. – Junior Research Fellow. ORCID: 0000-0002-1395-823X

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К. – 2012. – 944 с. [Rukovodstvo po doclinicheskim issledovaniyam lekarstvennyh sredstv [Preclinical drug research guide]. Moscow: Grif i K, 2012. – 944 p. (In Russ.)].
2. Одинак М.М., Дыскин Д.Е. Клиническая диагностика в неврологии. – СПб.: СпецЛит. – 2007. – 710 с. [Odinak M.M., Dyskin D.E. Klinicheskaya diagnostika v nevrologii [Clinical diagnostic in neurology]. Saint-Petersburg: SpecLit, 2007:710. (In Russ.)].
3. Broide R.S., Rubino J., Nicholson G.S. et al. The rat Digit Abduction Score (DAS) assay: a physiological model for assessing botulinum neurotoxin-induced skeletal muscle paralysis // Toxicon. – 2013. – Vol.71. – P. 18-24.
4. Тюнин М.А., Ильинский Н.С., Матросова М.О. Диагностические возможности электромиографии при отравлениях фосфорорганическими соединениями // Medline.ru. – 2019. – 20(1). – С.254–260. [Tyunin M.A., Ilinskiy N.S., Matrosova M.O. Diagnosticheskie vozmozhnosti electromiografii pri otravleniyah fosfororganicheskimi soedineniyami [Diagnostic potential of electromyography in organophosphate poisoning]. Medline.ru. 2019. – 20 (1). – P. 254-260. (In Russ.)].