

Экспериментальное исследование прямой мышечной возбудимости после синаптической блокады методом стимуляционной импедансной миографии с использованием вольт-омических характеристик

В. И. Бабинков

Контактное лицо: Виктор Иванович Бабинков, v.babinkov@mail.ru

При изучении функциональных показателей прямой мышечной возбудимости (ПМВ) мышечной ткани *in vivo* возникают определенные трудности, связанные с влиянием нервно-синаптической внутримышечной сети. С целью применения стимуляционной импедансной миографии (СИМ) для диагностики ПМВ проведено исследование мышц после синаптического блокирования (СБ), используя вольт-омические характеристики вызванных ответных реакций (ОР). В результате был разработан новый метод оценки вызванных сокращений при изменении вольт-омических характеристик и уточнены параметры стимулирующих импульсов для исследования ПМВ.

Ключевые слова: прямая мышечная возбудимость, стимуляционная импедансная миография, синаптическая блокада, вольт-омические характеристики, оценка жизнеспособности мышечной ткани.

Для цитирования: Бабинков В. И. Экспериментальное исследование прямой мышечной возбудимости после синаптической блокады методом стимуляционной импедансной миографии с использованием вольт-омических характеристик. Раны и раневые инфекции. Журнал им. проф. Б. М. Костюченка. 2017; 4 (4): 12–17.

DOI: 10.25199/2408-9613-2017-4-4-12-17.

Experimental study of score direct muscle excitability after synaptic blockade by stimulating impedance myography by using volt-omics characteristics

V. I. Babinkov

When examining the performance of direct muscle excitability of muscle tissue *in vivo* there are some difficulties related to the impact of neuro-synaptic intramuscular network. To the aim of apply method stimulating impedance myography to diagnostic of direct muscle excitability after synaptic blocking the research was performed by using volt-omics characteristics of muscle evoked contraction. In result a new measuring method by estimate of changing muscle resistivity was developed. Stimulative impulse parameters for a new method were applied.

Key words: direct muscular excitability, stimulating impedance myography, synaptic blockade, volt-omics characteristics, assessment of the viability of muscle tissue.

For citation: Babinkov V. I. Experimental study of score direct muscle excitability after synaptic blockade by stimulating impedance myography by using volt-omics characteristics (experimental study). Wound and Wounds Infections. The Prof. B. M. Kostyuchenok Journal. 2017; 4 (4): 12–17.

Введение

Правильная оценка жизнеспособности мышц, лишенных внутримышечных нервно-синаптических связей вследствие острой ишемии, может сыграть решающую роль в выборе стратегии лечения, в частности для прогноза возможности восстановления функции сегмента конечности после ишемии или механической травмы. Свойства ПМВ собственно мышечной ткани, лишенной внутримышечных нервно-синаптических связей, изучены недостаточно. Объем и интенсивность сокращений мышечной ткани

в ответ на стимулирующие импульсы возрастающей амплитуды может быть функциональной характеристикой мышцы, а сохранность нервно-синаптического аппарата мышцы — свидетельством ее жизнеспособности после перенесенной ишемии. Доступные методы функционального исследования мышечной ткани востребованы в связи с ростом числа экологических и промышленных катастроф. Для определения свойств денервированных мышц предложен метод тестирования мышц кратковременными и долговременными импульсами [1]. На короткие импульсы,

соответственно, реагируют мышечные волокна через сохраненные нервы и синапсы, в то время как на длинные импульсы реагируют и мышечные волокна, имеющие низкую возбудимость. Рядом авторов показана синхронизирующая роль нервно-синаптических связей в мышце, маскирующих свойства собственно мышечной ткани и препятствующих их исследованию [2, 3]. Это позволяет, блокируя нервно-синаптическую внутримышечную сеть, изучить свойства мышечных волокон мышечной ткани, лишенной внутримышечных связей, которые синхронизируют мышечные волокна и играют роль своеобразного усилителя сокращений. Вопросу сохранности внутримышечных нервно-синаптических структур было уделено много внимания при изучении влияния дегенерации нерва на перспективы сохранения сегментов конечности путем измерения хронаксии мышц [1]. Однако установленный авторами исследования диапазон продолжительности импульсов для различения возбудимости нерва и мышцы превышает диапазон импульсов экспериментальной установки СИМ. В связи с этим возникла необходимость сужения диапазона длительности стимулирующих импульсов, оптимального для работы СИМ, что и стало одной из задач исследования.

Ранее было показано, что сокращение мышечной ткани сопровождается увеличением ее электропроводности при контактном методе измерения, а позднее подтверждено методом СИМ с применением комбинированного игольчатого электрода [4–7]. Анализ одиночной реакции на стимул имеет ряд недостатков. Во-первых, исследуется микроскопически малый участок ткани вблизи острия игольчатого электрода; во-вторых, имеется много непредсказуемых переменных факторов (глубина погружения иглы, угол погружения иглы и др.), влияющих на результат и не позволяющих сравнивать мышцы между собой и с контрольными данными. Влияние этих факторов можно устранить, применяя серию одиночных стимулов возрастающей амплитуды без перемещения электродов. Благодаря этому происходит обнуление переменных факторов и увеличивается объем реагирующей ткани за счет рекрутирования дополнительных сократительных структур (саркомеров, волокон), что позволяет получить интегральную функцию «стимул — эффект» в более или менее «чистом виде». Однако все это требует проверки, что также стало одной из задач исследования.

Цель: исследовать возможность применения СИМ для диагностики ПМВ.

Задачи исследования

1. Найти оптимальные параметры продолжительности стимулирующих импульсов тока для диагностики ПМВ (по данным литературы).

2. Апробировать метод вольт-омических кривых сокращающейся мышцы.

3. Исследовать изменения параметров возбудимости и сократимости мышц кураризованных животных по вольт-омическим характеристикам.

Материалы и методы исследования

Работа с измерительным устройством. Блок-схема экспериментальной установки СИМ и принцип ее работы опубликованы ранее [6]. Для исследования выбирают участки мышц в области двигательных точек, чтобы сразу задействовать окончания входящих двигательных нервов. Схемы их расположения известны из работ по электродиагностике [8]. Агрессивный мини-электрод погружают на нужную глубину поперек мышечных волокон. Ступенчато увеличивая ток стимула от сокращения к сокращению, через равные промежутки времени регистрируют кривые нескольких одиночных ОР до прекращения прироста амплитуды и выхода на плато. Для этого сначала устанавливают параметр тока, затем включают кнопку «стимул». Через стандартный интервал времени действие повторяется. Таким методом регистрируют вольт-омические кривые одиночных сокращений при серии импульсов. В макете диагностического прибора такие установки делаются автоматически.

Интегральную кривую функции строят в процессе обработки полученных записей. Ось ординат градуируют в единицах сопротивления (Ом) или в мм амплитуды (рис. 1). Ось абсцисс градуируют в единицах тока (мА) или напряжения (В). Если полученная функция имеет прямолинейный вид, то дополнительных действий не требуется; если она имеет S-образный вид (см. ниже), то кривую выпрямляют, соединяя нижнюю точку излома кривой с верхней точкой выхода на плато. Пологие кривые промежуточных форм кривых подвергают линеаризации, проводя линию по большинству точек. Линеаризация кривых требуется для дальнейшего сравнения графиков разных мышц сегмента конечности между собой и между контрольными данными.

Для выбора параметров длительности стимулирующих импульсов были проанализированы работы, посвященные электродиагностике поражения нервов с помощью кожных электродов и демонстрирующие графически полученные этой методикой кривые электровозбудимости нервного ствола и поперечно-полосатой мышцы [1]. Кривые «амплитуда стимула — время стимула (хронаксия)», демонстрирующие пороговые сокращения, близки к форме гиперболы, а кривые электровозбудимости мышцы, расположенные на абсциссе в области долговременных показателей хронаксии, имеют более пологий вид, и вертикальные их части сдвинуты по горизонтали вправо за счет разницы хронаксии. Разница хронаксии нерва и мышцы

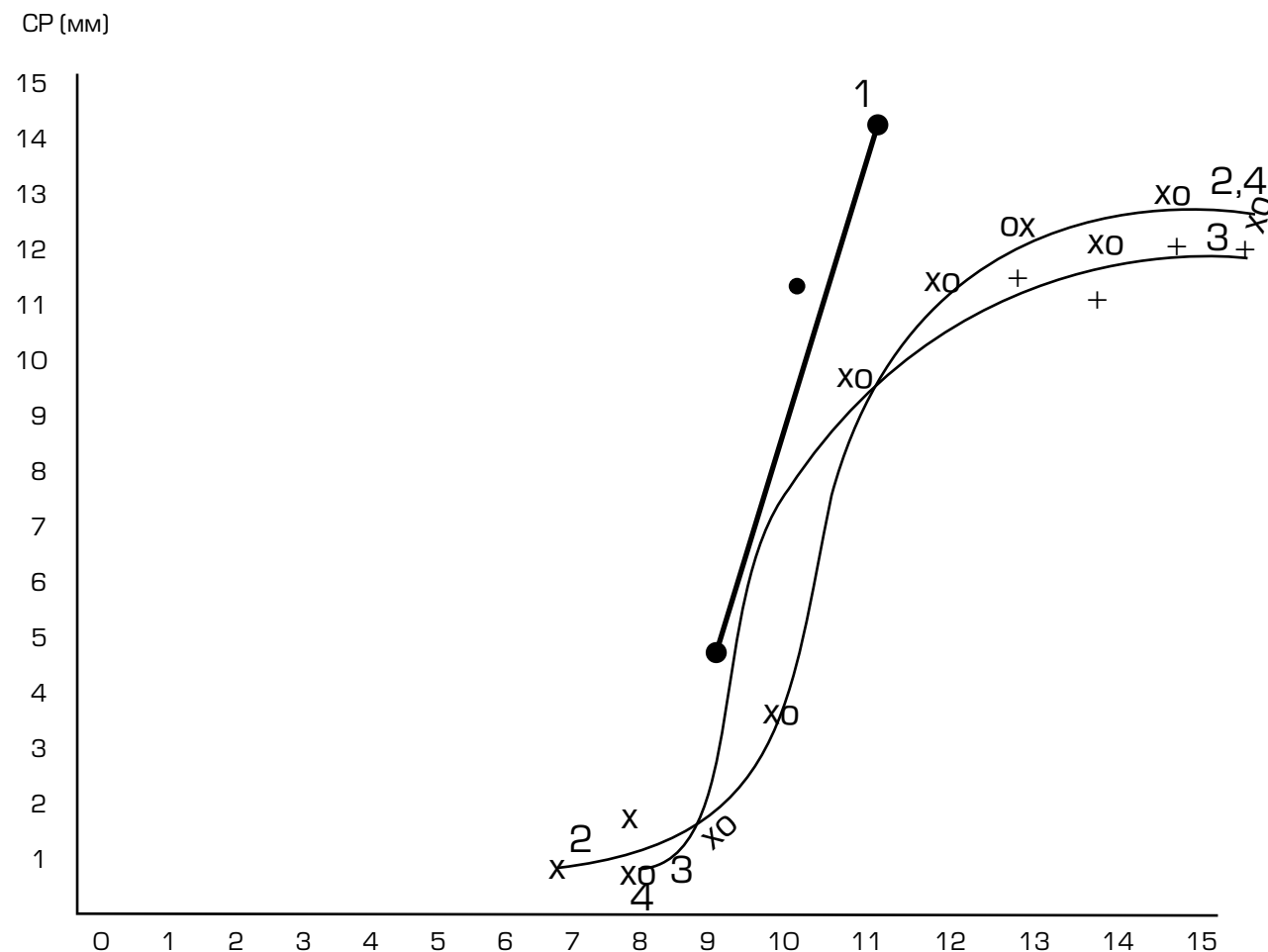


Рис 1. Изменение амплитуды сократительных реакций мышц животных до (1) и после (2, 3, 4) парентерального введения тубокурарина при плавном увеличении стимулирующего напряжения (по оси ординат амплитуда сократительных реакций (мм), по оси абсцисс — напряжение стимулирующего импульса (В))

Fig. 1. Changes the amplitude of the contractile responses of animals muscles before (1) and (2, 3, 4) after injecting tubocurarin with smooth increase in stimulating voltage (ordinate — contractile amplitude responses (mm), abscissa — stimulating impulse voltage (V))

весьма велика. Она составляет, по данным этой методики, от 0,0001 до 0,01 с. В этом диапазоне тока стимула вертикальные части кривых гипербол не могут пересекаться, но их верхние части сближаются при значительном увеличении тока стимула, который не надо превышать. Временной диапазон установки СИМ позволяет варьировать время импульса от 0 до 0,001 с и укладывается в предлагаемый авторами широкий диапазон импульсов, различающий возбудимости нерва и мышцы. Стимулы длительностью 0,001 с и более могут одновременно с нервом возбуждать и мышцу, если токи стимула превысят 8–12 мА (при стимуляции через накожный электрод). Установка СИМ позволяет создать ток стимула до 24 мА, что дает возможность проверить выбранные параметры стимулирующего

тока от 0,01 до 1,0 мс для метода СИМ в ходе экспериментов.

Работа с животными. В экспериментах на животных использовано 14 лабораторных крыс массой 200,0 г. Животное фиксировали на специальном столике. С каудальной конечности животного предварительно удаляли шерсть и на коже выше скакательного сустава фиксировали пластинчатый электрод через марлевую прокладку, смоченную 0,9 % раствором NaCl. Активный игольчатый электрод погружали в медиальную головку икроножной мышцы в области брюшка поперек мышечных волокон. При стимуляции мышцы применяли импульсы продолжительностью 1 мс и короткие импульсы — 0,01 мс. Для обезболивания операции трахеостомии использовали

нембулал в дозировке, соответствующей массе животного. Методика аппаратного дыхания мелких животных описана ранее [9]. Блокирование синапсов осуществляли d-тубокурарином (ТК), препаратом конкурентного действия, который вводили внутрибрюшинно дробно, до полной релаксации и прекращения собственного дыхания, в суммарной дозе, не превышающей 0,5 мг на 1,0 кг массы животного.

Собственное дыхание исчезало в среднем через 9 мин. после инъекции. После этого животное немедленно переводили на аппаратное нормовентиляционное искусственное дыхание. Электрофизиологическое исследование мышечной ткани обездвиженных животных осуществляли через каждые 20 мин. после введения ТК до появления дыхательных движений; фиксировали пороговые значения стимула и, повышая напряжение стимула, определяли точку выхода на плато по максимально достигаемым ответным реакциям в серии возрастающих по амплитуде одиночных стимулов. При обработке материала записей определяли величину приращения амплитуды ОР (в абсолютных значениях) на единицу увеличения напряжения стимула (dOhm/dV). Этот показатель наиболее полно отражает способность к рекрутированию сократительных единиц (крутизну вольт-омической характеристики).

Кроме истинных значений амплитуды и длительности сокращений в миллиметрах определяли длительность сократительных реакций и их отдельных фаз (сокращения и расслабления) при одинаковой величине амплитуды сокращения, равной 10 мм, а также отношение амплитуды к длительности сокращения. Регистрацию импедансограмм осуществляли на электрокардиографе ЛКАР с тепловой записью сокращений при скорости до 10 мм/с и калибровке 1 Ом / 10 мм.

Влияние блокады синапсов на форму кривых рекрутабельности определяли выборочно при обработке записей у нескольких животных во время максимального снижения амплитуды вызванных сокращений под действием ТК. На графиках кривых рекрутабельности (рис. 1) сопротивление представлено в абсолютных значениях амплитуды (с положительным знаком, в масштабе 1 Ом / 10 мм). Результаты экспериментов обработаны статистическими методами для малых выборок и достоверны при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

Значительное понижение возбудимости на коротких импульсах тока выражается в увеличении порогов ОР и сопровождается заметным падением показателя приращения амплитуды ОР на единицу стимулирующего тока (da/dV, столбиковая диаграмма) (рис. 2). Таким образом, выпадение внутримышечного механизма регуляции мышцы приводит к резкому снижению

возбудимости и рекрутабельности при тестировании короткими импульсами к 20-й минуте опыта.

Необходимо отметить, что снижение максимальной амплитуды ОР на высоте действия ТК выражается в изменении формы кривых (рис. 1). На графике видно, что при сохранности регуляторных связей у интактных животных характеристическая кривая прямолинейна (рис. 1, кривая 1). При блокировании внутримышечных связей характеристические кривые меняют форму на S-образную, с выходом на плато, за счет снижения амплитуды максимальных ОР (рис. 1, кривые 2, 3, 4).

Показатели времени сокращения при СБ изменялись, указывая на нарушение синхронизации сокращения мышечных волокон, осуществляемого нервными проводниками. Продолжительность всего сократительного акта у интактных животных постепенно увеличивалась после воздействия ТК с 56 до 70 мс к концу опыта, т. е. на 25,0 % ($p \leq 0,05$). Увеличение продолжительности сократительного акта происходило за счет обеих фаз, но статистически значимые изменения были в продолжительности фазы сокращения, которая увеличивалась с 17,5 до 22,5 мс, т. е. на 29,0 % к 60-й и 80-й минутам опыта. Кроме СБ нарушение сократительной способности мышц (в конце опыта) может объясняться присоединяющейся ишемией мышц вследствие длительной гиподинамии.

Обсуждение

Вольт-омические характеристики. Следует заметить, что термин «вольт-омическая» зависимость использован по аналогии с термином «вольт-амперная» зависимость применяющимся в методах физико-химических исследований растворов, основанных на контактной кондуктометрии. В случае СИМ «вольт-омическая» зависимость указывает на снижение сопротивления сокращающейся мышцы, связанное с электропроводностью растворов через величину ионного потока. Смена номиналов стимулирующего тока не меняет сути дела, поскольку параметры тока стимула определяются работой стимулятора, а величины тока и напряжения связаны законом Ома. Но в некоторых случаях удобнее работать с показателями тока, чтобы не превышать максимально допустимых значений для тканей. Кроме того, в кондуктометрии растворов в кюветах электроды напрямую контактируют с растворами, в отличие от метода СИМ, в котором измерение сопротивления опосредовано процессом возбуждения мышечной ткани. Дело в том, что в процессе зарядки двойного электрического слоя активного электрода стимулирующим импульсом вокруг него образуется пространственный заряд, который после возбуждения мышечных волокон принимает участие в процессе деполяризации через открывшиеся ионные каналы, внося свой вклад в конфигурацию и величину

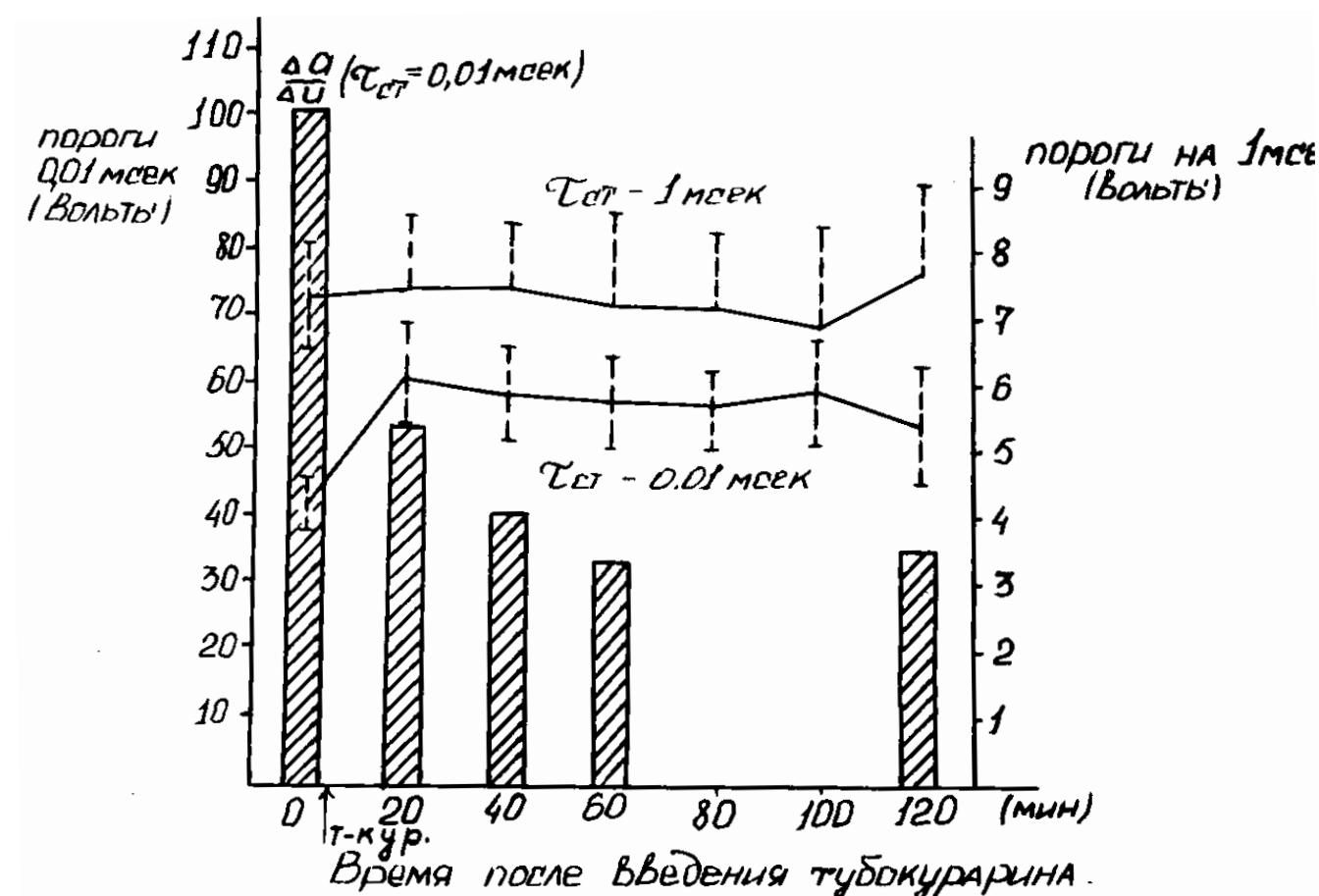


Рис. 2. Пороги возбудимости и амплитуда сократительных реакций кураризированных животных (по оси ординат — пороги возбудимости мышц при длительности стимулирующего импульса 0,01 мс (слева) и 1,0 мс (справа). Столбиковая диаграмма — приращение амплитуды сократительной реакции на единицу стимулирующего напряжения в процентах от исходного значения. По оси абсцисс — время после введения тубокурарина, мин. Стрелка — введение тубокурарина)

Fig. 2. Thresholds of excitability and the amplitude of the contractile reactions of kurarizirovannyh animals (On the y-axis — rapids excitability of muscles when the duration of the stimulus impulse 0.01 MS (left) and 1.0 MS (right). Record chart increment amplitude of the contractile response to stimulating unit voltage as a percentage of the original value. On the x-axis — time after the introduction of the tubocurarin, m. Arrow — introduction of tubokurarin)

ОР. Роль поляризационных процессов на электроде и приэлектродном пространстве при контактной кондуктометрии подчеркивается В. С. Андреевым, 1973 [10].

Важным моментом анализа функций является определение их верхнего предела и причин ограничения кривых функций. Прямолинейная функция, близкая вертикальной оси, образуется в интактной мышце, волокна которой хорошо синхронизированы, и верхний предел максимальной ОР при использованной системе регистрации не достигается по причине взрывного характера реакции (по техническим ограничениям). Пик сокращения волокон совпадает с раскрытием ионных каналов мембран саркоплазматического ретикула и с максимальной концентрацией Ca^{2+} в межфибрилярном пространстве [11]. Игольчатый электрод регулирует величину измерительного тока высокой частоты 2 кГц из-за большой плотности

тока на нем, поэтому значительная площадь, на которой происходит быстрая деполяризация тканей, создает эффект взрывного характера реакции. В отличие от прямолинейной зависимости в интактной мышце, верхний предел S-образной функции в депривированной мышце устанавливается из-за отсутствия синхронизации волокон, что уменьшает количество активированных мышечных волокон. Исследования физиологов показали, что в мышце существует система внутримышечных прямых и обратных связей, которая, независимо от места стимуляции, передает возбуждение на все мышечные волокна, принадлежащие двигательной единице, синхронизируя волокна и выполняя функцию своеобразного усилителя [2, 3]. Нервно-синаптическая сеть наиболее уязвима к гипоксии, выпадение ОР на короткие импульсы не означает гибели мышечной ткани. В сохранности ПМВ мышечных волокон можно убедиться, применяя

возбуждающие короткие импульсы большей амплитуды или длительности, увеличив тем самым суммарное количество электричества, которое определяется величиной заряда и временем воздействия. Прямолинейная кривая, параллельная горизонтальной оси, возникает в невозбудимой мышечной ткани. Имеющаяся иногда локальная реакция сохраняется до максимального значения тока стимула, не сопровождаясь приращением амплитуды ОР.

Заключение

Вольт-омические функции электропроводности сокращающихся мышц на серию одиночных стимулов возрастающей амплитуды дают возможность

количественной оценки сократительной способности мышц по максимально достигаемым ответным реакциям, углом наклона характеристик, значениям пороговых реакций. Синаптическая блокада мышц выражается в смене прямолинейной кривой вольт-омической характеристики на S-образную, понижении амплитуды максимально достигаемой реакции и увеличении времени сокращения. Эти вольт-омические характеристики могут быть использованы для оценки ПМВ. Мышцы при СБ сохраняют способность сокращаться, если сила и длительность стимулирующего тока достаточны для возбуждения мышцы. Выбранные параметры стимулов могут быть использованы для оценки степени повреждения мышц.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Обросов А. Н., Ливенцев Н. М. Электродиагностика и электростимуляция мышц при поражениях периферических нервов. М.: Медгиз, 1953 [Obrosova A. N., Liventsev N. M. Electrodiagnostics and electrical stimulation of muscles in patients with lesions of the peripheral nerves. Moscow: Medgiz].
- Экклс Дж. Физиология синапсов. Перевод с английского. М.: Мир, 1966. [Eccles John Physiology of synapses. English translation. Moscow: World, 1966].
- Табин В. И. Об электрическом взаимодействии между мышечными волокнами. Биофизика. 1979. XXIV: 2: 274–279. [Tabin V. I. On the electrical interaction between muscle fibers. Biophysics. 1979. XXIV: 2: 274–279].
- Dubuisson M. Impedance changes in muscle and their possible relation to chemical processes. 1977; (39): 132–152.
- Кузин М. И., Бабинков В. И. Оценка повреждения мышц конечности при экспериментальном СДР у кролика с помощью метода прямой мышечной возбудимости. Актуальные вопросы военной травматологии. 1979; (7):74–79. [Kuzin M. I., Babinkov V. I. Evaluation of limb muscle damage in experimental SDRs in rabbits using the method of direct muscle excitability. Topical issues of military traumatology = Aktual'nye voprosy voennoj travmatologii. 1979; (7):74–79 (In Russ.)].
- Бабинков В. И., Яковенко В. Н. Раны и раневые инфекции. 2017; 4 (2):12–17. [Babinkov V. I., Yakovenko V. N. Theoretical basis of the method for measuring direct muscular excitability (experimental research). Wounds and wound infections. The prof. B. M. Kostyuchenok journal. 2017;4(2):12–17. (In Russ.)].
- Бабинков В. И. Новая закономерность изменения электрических параметров вызванных сокращений скелетной мышцы при ее некробиозе. Бюллетень экспериментальной биологии. 2000; (10): 374–377. [Babinkov V. I. New regularity of changes in electrical parameters caused by skeletal muscle contractions in its necrobiosis. Bulletin of experimental biology. 2000; (10): 374–377].
- Костадинов Д. Классическая электродиагностика. Функциональная диагностика в детском возрасте под ред. С. Коларова, В. Гатева. София: Медицина и физкультура, 1979. С. 44–54. [Kostadinov D. Classical electrodiagnosis. Functional diagnosis in childhood under. ed. S. Kolarova, V. Gateva. Sofia: Medicine and physical education, 1979. P. 44–54].
- Бабинков В. И., Шнапер А. Л. Аппарат искусственного дыхания и ларингоскоп для мелких животных. Экспериментальная хирургия и анестезиология. 1969; (4):77–78. [Babinkov V. I., Snapper A. L. Respirator and laryngoscope for small animals. Experimental surgery and anesthesiology. 1969; (4): 77–78].
- Андреев В. С. Кондуктометрические методы и приборы в биологии и медицине. М.: Медицина, 1973. [Andreev V. S. Conductometric methods and devices in biology and medicine. Moscow: Medicine, 1973].
- Жуков Е. К. Очерки по нервно-мышечной физиологии. Л.: Наука, 1967. [Zhukov E. K. Essays on neuromuscular physiology. L.: Science, 1967].