

Кінетика пригнічення поодиноких скорочень при ішемії-реперфузії як показник функціонального стану *m. gastrocnemius* щура

Д.М. Ноздренко, В.М. Сорока, О.М.Хома

ІНЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка; email: ddd@univ.kiev.ua

*Вивчали процес деградації показників сили та довжини поодиноких ізотонічних скорочень литкового м'яза *m. gastrocnemius* щурів за умов ішемії-реперфузії. Показано, що зменшення цих показників залежить від тривалості ішемії з наступної симетричної за часом реперфузії. Продемонстровано, що за використаних в експерименті умов повне зникнення скоротливої активності відбувається протягом 90-100 хв після початку ішемії. Наступне часткове відновлення залежало від тривалості ішемії. Найбільшим воно було після 4 (2+2) год ішемії-реперфузії і сягало $72 \pm 3,2\%$ від попереднього значення сили і $7 \pm 1,3\%$ довжини, при 3 і 4 год ішемії і еквівалентного часу реперфузії відновлення становило $42 \pm 4,1$ і $12 \pm 2,3\%$ від контрольного значення сили відповідно, тоді як зміна довжини залишалася на нульовому рівні. Відновлення функції м'яза в близькому реперфузійному періоді сягало певного стійкого у часі рівня, що дає змогу оцінити міру пошкоджень, які були викликані ішемією. Простота, універсальність та неінвазивність використання наведеного методу надає можливість застосовувати його в медичній практиці для моніторингу функціонального стану м'язів після ішемічно-реперфузійної або інших видів травм.*

Ключові слова: ішемія-реперфузія; скелетний м'яз; ізотонічне скорочення; поодинокі скорочення; сила; довжина.

ВСТУП

Скелетні м'язи мають помірну стійкість до ішемії, яка вища, ніж у тканин мозку, печінки чи серцевого м'яза, але нижча, ніж у інших складових кінцівки, таких як шкіра кістки чи підшкірна клітковина, котрі можуть витримувати ішемію протягом десятків годин чи навіть доби [1]. В цілому скелетні м'язи здатні без значних втрат толерувати повну ішемію протягом 1-1,5 год, однак тривале понад 2-4 год припинення кровопостачання може призвести до значних втрат функції, патології та некрозу і втрати м'яза чи навіть кінцівки [2]. Основне завдання при лікуванні травм або патологій, ускладнених ішемією, чи гіпоксією - швидке відновлення кровотоку (реперфузія) в пошкоджених тканинах. Проте це не повне рішення проблеми, після трива-

лої ішемії різко зростає вільнорадикальне окиснення та відбувається розвиток тяжкого стану. Ці фактори самі по собі є руйнівними та можуть індукувати подальшу гіпоксію, утворюючи петлю позитивного зв'язку патології. Таким чином, реперфузійна терапія призводить до нового патофізіологічного процесу, що в цілому є основою ішемічно-реперфузійної травми [3,4].

Загалом ішемія - патологічний стан місцевого недокрів'я, яке зазвичай, зумовлено судинним чинником (звуженням просвіту артерії), що призводить до тимчасової дисфункції або стійкого пошкодження тканини або органа. Наслідки ішемії залежать від ступеня і швидкості зниження параметрів кровотоку, тривалості ішемії, чутливості тканин до гіпоксії, загального стану організму. Зазвичай післятравматичне ішемічне пош-

кодження м'язів виникає внаслідок місцевого гіпертензійного ішемічного синдрому. Ішемічні контрактири з'являються у результаті порушення кровообігу в м'язах, нервах і інших тканинах з наступними їх рубцевими змінами. Важливу роль при цьому відіграє ішемічне пошкодження нервових стовбурів і навколо суглобових нервових сплетінь. Здебільшого лікування вимагає інвазійного втручання.

Успіхи в розкритті молекулярних механізмів патологічних змін при розвитку м'язових захворювань значною мірою залежать від адекватної оцінки зміни їх кінематичних характеристик [5]. Принципова різниця динамічних властивостей скорочення та розслаблення м'язів, а також істотна залежність динамічних характеристик від напрямку руху суттєво ускладнює експериментальний аналіз цих процесів. Часова взаємозалежність частотного кодування та реальних патернів еферентної активності навіть непошкоджених м'язових одиниць, поки що детально не вивчена [6]. Тому дослідження загального порушення роботи м'язової системи внаслідок розвитку патологічного процесу є досить складною та маловивченою проблемою, яку ускладнює і те, що дія патологічних факторів на м'язову систему не є сталою величиною, а залежить від швидкості розвитку сили, міри втомлюваності, особливостей скорочення м'язів та часу релаксації [7].

Клінічні прояви ішемії несистематизовані і досить складні. Вченими ще тільки нещодавно були описані ступені тяжкості та стадійності гіпертензійного ішемічного синдрому та ішемічної контрактири, що виникає потім. Досліджено тільки невелику кількість проявів, якими супроводжується ішемія. Цікавим і недостатньо вивченим залишається питання про функціонування уражених ішемією кінцівок. Отримані дані на експериментальних об'єктах стосовно ініціалізації та прогресування ішемічного ураження спорадичні та часто описують окремі випадки чи етапи патогенезу. Швидке виявлення ступеня ішемічної травми має вирішальне значення для

подальшої терапії, проте наразі немає ні точних діагностичних тестів, які б вважалися достатньо достовірними, особливо на початкових етапах ушкоджень, ні методів медикаментозного терапевтичного лікування цих патологій.

Метою нашої роботи було вивчити кінетику пригнічення поодиноких скорочень при ішемії-реперфузії як показник функціонального стану *m. gastrocnemius* щура.

МЕТОДИКА

В експерименті використано 20 дорослих щурів масою 300 ± 15 г. Силу та зміну довжини скорочення м'яза вимірювали протягом 2, 3- та 4-годинної ішемізації та наступної симетричної реперфузії. Анестезували тварин внутрішньоочеревинним введенням пентобарбіталу (70 мг/кг). Для ішемізації м'язів на нижню кінцівку тварини накладали щільний джгут, що викликає повне припинення кровотоку в ній, якість перетягування перевіряли за допомогою невеликого надрізу шкіри стопи. Реперфузія після 2, 3 та 4 год ішемізації відбувалася після зняття джгута і продовжувалася 2, 3 та 4 год відповідно. Підготовка експерименту також включала канюлювання (*a. carotis communis sinistra*) для введення фармпрепаратів і вимірювання тиску, температури тіла і задіяного в експерименті м'яза контролювали інструментально та підтримували в фізіологічних межах. Литковий м'яз щура (*muscle gastrocnemius*) звільняли від навколишніх тканин, ретельно зберігаючи живлячі судини. У дистальній частині впоперек перерізували його сухожильну частину до якої далі прив'язували лігатуру з поліамідного хірургічного матеріалу.

Протокол дослідження був затверджений комісією з питань біоетики КНУ імені Тараса Шевченка (Протокол № 1 від 14 вересня 2017 р.), згідно з правилами "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях" і норм біомедицини, відповідно до Закону України

№: 3447 - IV 04.08.2017 р. “Про захист тварин від жорстокого поводження”.

Для реєстрації сили та довжини скорочення *muscle gastrocnemius* використовували тензометричну установку [4]. Цей пристрій являв собою комплекс аналогових датчиків сили та довжини та чутливий аналого-цифровий перетворювач – цифро-аналоговий перетворювач (АЦП-ЦАП). Застосовували також сервокерований механостимулятор, який був створений на основі прецизійного лінійного електромагнітного двигуна і на рухливій частині якого були змонтовані датчики сили та довжини.

Скорочення цільового м'яза викликали методом безпосередньої стимуляції імпульсним електричним струмом фіксованої частоти 1 Гц. Використовували патерни тривалістю 1хв, кожен поодинокий імпульс тривав 5 мс, амплітуда 10 В. Вони були сформовані за допомогою генератора імпульсів, керовані АЦП через платинові електроди, релаксація продовжувалася 10 хв. Контроль зовнішнього навантаження на м'яз здійснювали за допомогою системи механостимуляторів.

Ішемічно-реперфузійні травми скелетних м'язів після гострої артеріальної оклюзії у багатьох випадках є причиною важких патологій і смертності [8]. Вони знижують силу скорочення м'яза до 40% після 1 год ішемії і до 90% після 2 год. Відновлення силової продуктивності м'яза спостерігали тільки після 2-го тижня ішемії-реперфузії [9]. Також існує висока кореляція між тривалістю ішемізації і життєздатністю м'язового волокна [2,10]. Швидке виявлення міри ішемічної травми має вирішальне значення для подальшої терапії, проте нині немає точних діагностичних тестів, доступних для досягнення цієї мети. Попри те, що різні типи волокон скелетного м'яза мають значні метаболічні відмінності це не має істотного впливу на їх чутливість до травм від ішемії-реперфузії [11]. Експериментально доведено, що первинні патологічні ефекти після тривалої ішемії-реперфузії можуть бути неповними, тим самим продовжу-

ючи ішемічні стани до декількох діб [6,3,12].

Усе це дало нам підставу для дослідження змін параметрів скорочення під час розвитку ішемічно-реперфузійної травми, що виникають в м'язі в перші години після 2, 3- і 4-годинної ішемізації і наступної реперфузії.

Одержані експериментальні криві відображають зміну у відсотках від контрольних значень непошкодженого м'яза, які приймали за 100%. Статистичну обробку результатів вимірювання проводили методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Origin 8.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 представлені зміни сили та довжини скорочення, ішемізованого м'яза *m. gastrocnemius* (за схемою 2+2, 3+3, 4+4 год ішемії та реперфузії відповідно) в кінці реперфузивної стадії експерименту. За цих умов сила скорочення поступово зменшувалася у всіх представлених схемах і за перші 20 хв експерименту вже становила 80% від вихідного рівня, відповідно до відповіді на перший пул імпульсів. Слід зазначити, що нативний м'яз, за такого протоколу експерименту, скорочувався без помітних змін протягом 8 год. Зменшення було зафіксовано, починаючи з відповіді на перший пул стимуляційних сигналів, після якого, на відміну від контролю, повторного утримання рівня сили не спостерігалось, зниження сили продовжувалося й надалі. Досліджені м'язи виявляли чітку тенденцію до зменшення силової відповіді зі збільшенням кількості реалізованих стимуляційних скорочень. При цьому вже після 30 хв дослідження силова відповідь не перевищувала при 2-годинній ішемізації 50 %, при 3- та 4-годинній – 32 та 27% відповідно щодо контрольних значень.

Максимальне зменшення сили м'язового скорочення відбувалося на 90-100-й хвилині ішемії. Після цього не спостерігалися навіть мінімальні ознаки відповіді на прикладену стимуляцію. При 3- та 4-годинній ішемізації

цей час зменшувався до 43 та 29 хв після реперфузії відповідно. Максимально довжина м'язового скорочення знижувалася на 40-50-й хвилині ішемічної частини дослідження (див. рис.1). Зміни довжини скорочення після перших 50 хв (після початку ішемії), внаслідок майже повного пригнічення, протягом усього часу експерименту не відновлювали свого значення у всіх схемах дослідження крім 1-ї (до 10%).

Отже, можна стверджувати, що кожного наступного пулу максимальна сила скорочення зменшувалася майже вдвічі порівняно з такою попереднього. У процесі фіксації сили та довжини скорочення ішемізованого м'яза спостерігалися сильні флуктуації силової відповіді як на дотетанічних ділянках, так і на фазах утримання стаціонарного рівня. Флуктуаційна компонента силової відповіді не залежала від тривалості експерименту, частоти стимуляції, що застосовувалася,

та прикладеного зовнішнього навантаження. Можна допустити, що тремор силових кривих, котрий спостерігався, є наслідком патологічних внутрішньоклітинних процесів у васкулярно ішемізованому м'язі.

Зміни силових характеристик скелетних м'язів на початку розвитку гострої ішемії подібні до таких динамічних параметрів скорочення скелетних м'язів у разі виникнення втоми [13,14]. Однак характерною ознакою скорочення ішемізованого м'яза є наявність тремору та відсутність формування рухового патерну [1,2,4], що неспецифічно для процесу втоми м'язових волокон. Ці ефекти можуть бути пов'язані з тим, що 2- і більше годинна ішемія-реперфузія камбалоподібного м'яза істотно знижує концентрацію аденозинтрифосфату (АТФ) одночасно зі значним збільшенням вмісту лактату. При 3-годинній ішемії виснаження запасів АТФ становить близько 95%, а глікоген вичерпаний на 88%

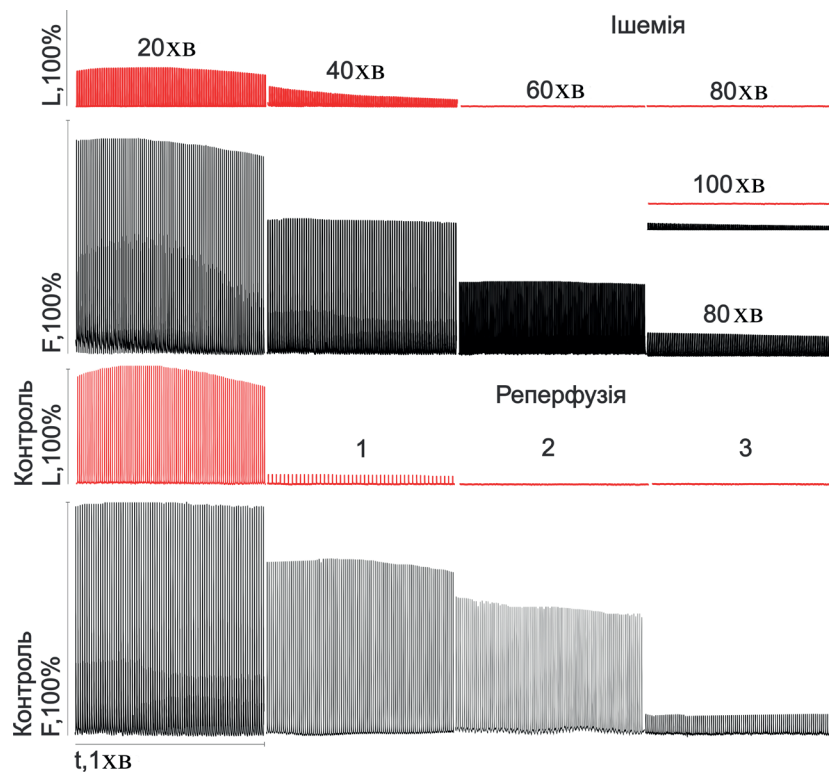


Рис. 1. Зміна сили (F) та довжини (L) скорочення m. gastrocnemius, отримані при стимуляції м'яза електричним імпульсами протягом 1 хв з частотою 1Гц. Графіки 1,2,3 ілюструють скорочення м'язів (за схемою 2+2, 3+3, 4+4 год ішемії та реперфузії відповідно) в кінці реперфузивної стадії експерименту

[15]. Ці результати підтверджують гіпотезу, що велика кількість високоенергетичних фосфатів витрачається пошкодженою м'язовою клітиною на підтримку гомеостазу, і це порушення обміну речовин в результаті і призводить до великої стомлюваності.

Патологічні процеси після реперфузії тривають в м'язі декілька діб з прогресуючою динамікою. Міграція нейтрофілів у ендомізій, а потім в перемізій відбувається вже через 24 год після 2годинної ішемії-реперфузії. Структурні процеси регенерації починається тільки у кінці першого тижня після 2 год реперфузії. Існують функціональні і морфологічні докази ішемічного і реперфузійного пошкодження м'язових тканин навіть через 1 тиж після реперфузії [15]. А збільшення часу ішемії від 1 до 2 год затримує процеси регенерації [16]. Тому найбільш оптималь-

ним для фіксації динамічних параметрів скорочення ішемічно пошкодженого м'яза є саме час, коли ці патологічні процеси мають явну тенденцію прогресуючого збільшення. Дослідження саме такого часового проміжку (2-4 год після реперфузії) є обґрунтованим для можливої регуляції та корекції патологічних процесів скорочення ішемізованого м'яза. Фіксовані нами під час експерименту максимальна сила скорочення і зміни довжини м'яза дають можливість встановити важливі співвідношення реальних макроскопічних параметрів стану ішемізованого м'яза та рівня еферентної активності, що надходить до нього, на найперших етапах ішемічного ушкодження.

Результати наших досліджень свідчать про те що ішемізація *muscle gastrocnemius* та його наступна реперфузія мають часозалежну

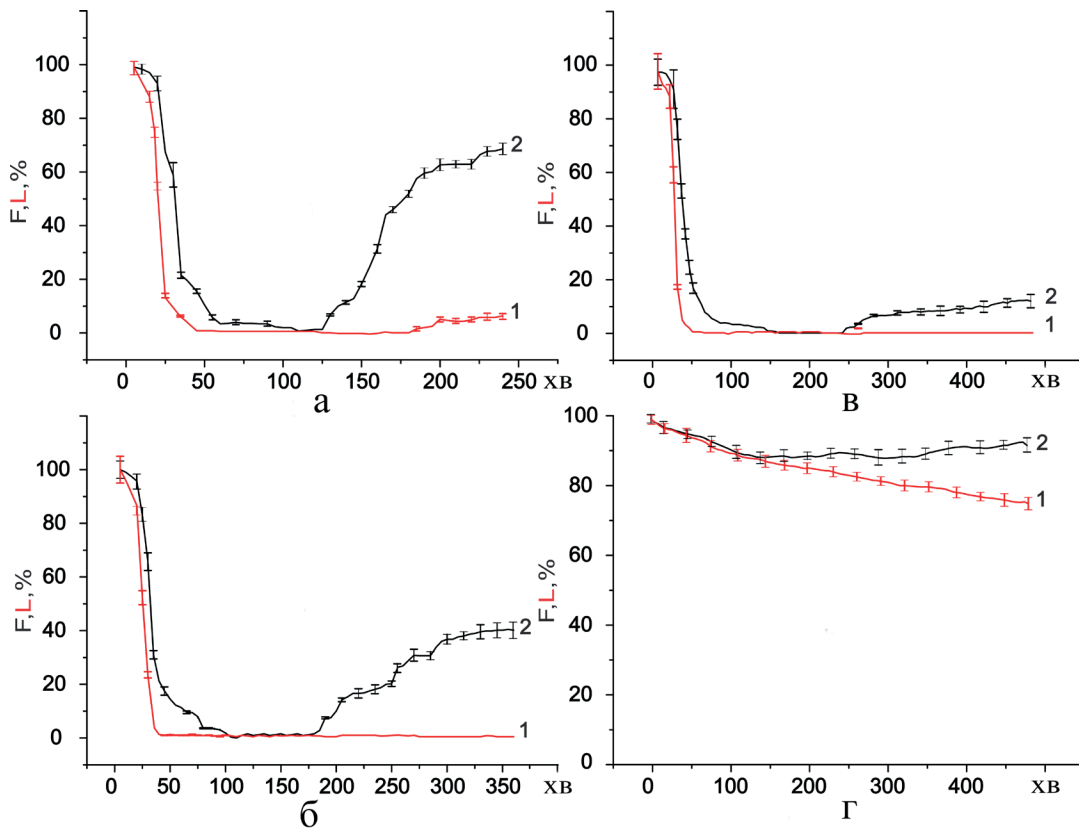


Рис. 2. Зміна довжини (1, L) та сили (2, F) скорочення м'яза, за схемами 2+2 (а), 3+3 (б), 4+4 (в) год ішемії та реперфузії відповідно, в кінці реперфузивної стадії експерименту; г – зміна показників скорочення в контрольній групі тварин протягом 8 год

кінетику впливу на динамічні параметри скорочення. Показники генерації сили та скорочення м'язових волокон у часовому інтервалі нашого спостереження та протягом кожного окремого перебігу постійно знижуються і здебільшого носять лінійний характер.

Таким чином, тензометричні дослідження та контроль морфофункціонального стану ішемізованого м'яза в змозі не тільки ідентифікувати місце знаходження пошкоджених м'язових клітин, але і визначити стадію ішемічного ушкодження. Виявлені особливості динаміки скорочення ішемізованого м'яза дають перспективу для подальшої розробки методів ідентифікації ішемічного ушкодження на ранніх етапах розвитку патологічних змін, диференціювати його від фізіологічних проявів втоми, та визначити рівень розвитку патологічного стану. Подальші дослідження молекулярних, кінематичних та периферичних механізмів активності м'язів за умов розвитку ішемічних пошкоджень можуть бути використані для наступної розробки комплексної методики неінвазивного методу діагностування та лікування ранніх етапів ішемічного ушкодження скелетних м'язів людини.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

D.M. Nozdrenko, V.M. Soroka, O.M. Khoma

KINETICS OF SINGLE CONTRACTIONS INHIBITION UNDER ISCHEMIA-REPERFUSION AS AN INDICATOR OF M. GASTROCNEMIUS FUNCTIONAL STATE IN RATS

The degradation of strength and lengths of isotonic twitch contractions of rat gastrocnemius muscle under ischemia-reperfusion conditions was described in the article. We demonstrated that the strength and lengths of recession were directly dependent on ischemia and subsequent reperfusion duration.

It was found that in the selected conditions detectable muscle contraction reaches zero level after 90-100 minutes of the ischemia. In the reperfusion phase partial contraction restoration was detected. Recovery level depended on preliminary ischemia duration. Maximum recovery level was observed after 4 (2+2) hours of ischemia-reperfusion, strengths restored up to $72 \pm 3,2\%$ and lengths reached $7 \pm 1,3\%$ of nonischemic control. In the case of 3+3 and 4+4 hours of ischemia-reperfusion function regenerated up to $42 \pm 4,1\%$ and $12 \pm 2,3\%$ of strengths control accordingly, lengths stayed on zero level in both situations. Contraction properties in reperfusion period recovered to some steady state level that probably allows us to determine muscle damage in ischemia stage. Simple, utility and possibility of noninvasive use of this method of muscle function evaluation can be useful in clinical practice. Key words: ischemia-reperfusion; skeletal muscle; isotonic twitch; strength; length.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, ESC "Institute of Biology and Medicine".

REFERENCES

1. Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. Therapeutic interventions against reperfusion injury in skeletal muscle. J Surg Res. 2011;171(1):175-82.
2. Turóczy Z, Arányi P, Lukáts Á, Garbaisz D, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A. Muscle fiber viability, a novel method for the fast detection of ischemic muscle injury in rats. PLoS One. 2014;9(1):e84783.
3. Nozdrenko DM, Bogutska KI, Prylutsky YuI, Korolovych VF, Evstigneev MP, Ritter U, Scharff P. Impact of C₆₀ fullerene on the dynamics of force-speed changes in soleus muscle of rat at ischemia-reperfusion injury. Fiziol Zh. 2015; 61(2):48-59. [Ukrainian].
4. Khoma OM, Zavodovs'kyi DA, Nozdrenko DN, Dolhopolov OV, Miroshnychenko MS, Motuziuk OP. Dynamics of ischemic skeletal soleus muscle contraction in rats. Fiziol Zh. 2014;60(1):34-40. [Ukrainian].
5. Nozdrenko DN, Shut AN, Prylutsky YI. The possible molecular mechanism of the nonlinearity muscle contraction and its experimental substantiation. Biopolymers and Cell. 2005;21(1):80-83. [Ukrainian].
6. Loerakker S, Oomens CW, Manders E, Schakel T, Bader DL, Baaijens FP, Nicolay K, Strijkers GJ. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle assessed with T2-weighted and dynamic contrast-enhanced MRI. Magn Reson Med. 2011; 66(2):528-37.
7. Nozdrenko DN, Bogutska KI. About molecular mechanisms of fiber muscle contraction at transition to new equilibrium state: Analysis of experimental data using three-componential electrical stimulating signal. Biopolymers and Cell. 2005; 21(3):285-286. [Ukrainian].
8. Erkut B., Özyazıcıoğlu A., Karapolat B.S., Koçoğulları C.U., Keles S., Ateş A., Gundogdu C, Kocak H. Effects of ascorbic Acid, alpha-tocopherol and allopurinol on ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle: an

- experimental study. Drug Target Insights. 2007;2:249-258.
9. Rácz IB, Illyés G, Sarkadi L, Hamar J. The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle. J.Eur Surg Res. 1997;29(4):254-263.
 10. Bortolotto SK, Morrison WA, Messina A. The role of mast cells and fibre type in ischaemia reperfusion injury of murine skeletal muscles. J. Inflamm. (Lond). 2004;1(1):2.
 11. Zay SY, Zavodovskiy DA, Bogutska KI, Nozdrenko DN, Prylutskiy YI. Prospects of C₆₀ fullerene application as a mean of prevention and correction of ischemic-reperfusion injury in the skeletal muscle tissue. Fiziol Zh. 2016;62(3): 66-77. [Ukrainian].
 12. Nocella M, Colombini B, Benelli G, Cecchi G, Bagni MA and Bruton J. Force decline during fatigue is due to both a decrease in the force per individual cross-bridge and the number of cross-bridges. J. Physiol, 2011;589:3371 – 3381.
 13. Allen DG, Lamb GD And Westerblad H. Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms. Physiol Rev January 2008;88(1):287-332.
 14. Carvalho AJ, McKee NH, Green HJ. Metabolic and contractile responses of fast and slow twitch rat skeletal muscles to ischemia and reperfusion. Plast Reconstr Surg. 1997;99(1):163-71.
 15. Racz I, Illyés G, Sarkadi L, Hamar J. The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle. Rácz J.Eur Surg Res. 1997; 29(4):254-63.
 16. Nozdrenko DM, Zavodovskiy DO, Matvienko TYu, Zay SYu, Bogutska KI, Prylutskiy YuI, Ritter U and Scharff P. C₆₀ fullerene as promising therapeutic agent for the prevention and correction of skeletal muscle functioning at ischemic injury. Nanoscale Res Lett. 2017;12(1):115.

*Матеріал надійшов до
редакції 12.05.2018.*