

НЕРВОВО-М'ЯЗОВИЙ ПРЕПАРАТ *IN SITU* ЯК ІНДИКАТОР ВПЛИВУ ФАКТОРІВ ДОВКІЛЛЯ НА ОРГАНІЗМ

*Запропоновано використовувати нервово-м'язовий апарат експериментальних тварин як чутливий індикатор впливу хімічних та фізичних факторів довкілля на організм. Метод полягає в автоматизованій непрямій стимуляції нервово-м'язового препарату *in situ* за уніфікованою комп'ютерною програмою. Тривалість тесту 10 хвилин. Комп'ютерне ведення експерименту дозволяє уніфікувати дослідження і проводити коректну статистичну обробку отриманих результатів. Наведені приклади м'язової працездатності при дії іонізуючого випромінювання та солей плюмбуму.*

Нервово-м'язова система є надзвичайно чутливим і інтегральним індикатором стану організму як на різних етапах онтогенезу, так і при захворюваннях. Крім того, нервово-м'язовий апарат може бути чутливим індикатором впливу шкідливих факторів довкілля. Слід розуміти під факторами довкілля широкий спектр хімічних речовин, ліків, фізичних факторів. Серед багатьох показників стану організму саме скоротлива функція м'язів, їх працездатність і характер стомлення є цінними функціональними параметрами і водночас індикатором змін у багатьох системах організму. Працездатність нервово-м'язової системи – це й скоротлива функція самих м'язів, стан біоенергетичних процесів у них, стан кровопостачання м'язів, їх нервової регуляції, синаптичної передачі й таке інше. Але для того щоб вивчати закономірності впливу факторів довкілля на нервово-м'язовий апарат, необхідно створити умови уніфікації експериментів, які забезпечують їх об'єктивність і повторюваність. Необхідно також підібрати адекватну систему статистичної обробки цифрового матеріалу. Раніше один із нас [Замост'ян В. П., 1976]

показав, що при певних умовах стимуляції й збереженому кровопостачанні скелетні м'язи в умовах непрямой стимуляції можуть підтримувати свою працездатність без подальших ознак стомлення дуже довго, десятки годин. Основні процеси адаптації м'яза до початку скорочувальної функції, процес так званого впрацювання, проходить за 8–10 хвилин.

Матеріали і методи дослідження.

Об'єкт дослідження

Експеримент було проведено на 30 білих лабораторних щурах-самках масою від 180 до 210 г, віком 5–6 місяців. Щурів було розподілено на 2 групи – «контроль» (15 голів) та «експеримент» (15 голів).

Група «експеримент» протягом 3 тижнів до початку експерименту пила воду з розчином ацетату плюмбуму ($Pb(CH_3COO)_2$) – одна з небагатьох добре розчинних солей плюмбуму, яка широко використовується в лабораторній практиці. В експерименті розчин ацетату плюмбуму робили з розрахунку 150 мкг/3 л, ГДК (50 мкг/л).

В іншій серії вивчався вплив фізичних факторів на організм. Таким фактором була іонізуюча радіація. На 15 щурах-самках вивчали дію іонізуючої радіації через 3 місяці після опромінення в дозі 100 сГр. 15 інших щурів слугували для контролю.

Кожного дня експеримент ставився на 2 щурах (контроль і затравку робили через день). Тварин анестезували внутрішньочеревним введенням 10%-го розчину уретану з розрахунку 1 мл на 100 г живої маси щура.

Накладалися лігатура на ахіллове сухожилля, з її допомогою м'яз кріпився до жорсткого тензодатчика, що забезпечувало скоротливу діяльність в режимі, близькому до ізометричного. Кінцівку фіксували в районі колінного та гомілкового суглобів. М'язове напруження визначали з допомогою тензоплатівки з наклеєними на неї тензорезисторами. Сигнал з моста тензорезисторів подавався на вхід тензопідсилювача УТ-4. З виходу підсилювача сигнал подавався на осцилограф С1-93 й паралельно на вхід одного з кана-

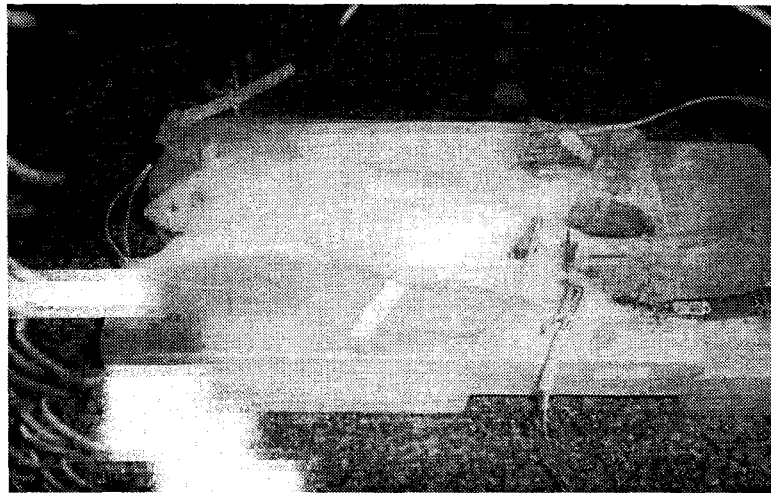


Рис. 1 Фіксація тварини та встановлення електродів

Методика проведення експерименту з дослідження нервово-м'язового апарату *in situ* була модифікована й оновлена Замостьяном В. П. [Замостьян В. П., 1976, 1989]. Також для проведення експерименту були використані дані інших джерел [Carp, 1999; Barclay, 1996; Westerbland, 1993; Lowrie, 1984 та інші].

Тварина фіксувалася в горизонтальному положенні на спеціальному станку, з фіксацією верхніх та нижніх кінцівок. Досліджували м'язову скоротливу активність *m. triceps surae in situ* в умовах її непрямой електростимуляції. Амплітуда стимулюючих імпульсів була в 8–10 разів вища за порогову, частота 40 в 1 сек. Така частота стимуляції забезпечувала злитний тетанус. За даними В. П. Замостьяна, в таких умовах (40 Гц, ізометричний режим) м'яз міг після встановлення стійкої працездатності підтримувати фазну функцію без подальших ознак стомлення 20 і більше годин [В. Замостьян, 1976; В. Замостьян, С. Зотов, 1976]. Суттєвим методичним моментом було максимальне збереження кровопостачання нервово-м'язового апарату та його максимально можлива неушкодженість.

лів аналого-цифрового перетворювача в комп'ютері. Використовуючи дані стандартного каліброваного сигналу, розраховували величину фактичного напруження в ньютонах. Оскільки маса тіла тварин в наших групах суттєво не відрізнялася, то нормування зусилля за масою, тобто вираження м'язового напруження в ньютонах на 100 грамів ваги тварини, не проводили.

Проксимально від накладених стимулюючих електродів перев'язувався сідничний нерв для припинення поширення збудження, що виникало, в структури спинного мозку. Нижче лігатури знаходився стимулюючий електрод, що подавав до м'яза імпульс подразнення. Подразнення проводили біполярними імпульсами, тривалість імпульсу – 2 мс та частота – 40 Гц. Тривалість цього тесту на стомлюваність була 10 хвилин. Реєстрацію та первинну обробку сигналів здійснювали під час комп'ютерного проведення експерименту на РС IBM. Програма комп'ютерної реєстрації й аналізу інформації експерименту була розроблена Ю. Хмелевським [Ю. М. Хмелевський, 1992].

Під час електростимуляції нервово-м'язового апарату з частотою 40 Гц м'яз досягає максимального напруження, яке поступово спадає в міру стомлення.

Проведені дослідження дозволяють підійти до окремих нових методів діагностики нервово-м'язового апарату, а також до діагностики нервово-м'язового апарату як інтегрального індикатора стану всього організму.

На рис. 2 представлено загальну схему експериментальної установки.

Вона складається з таких основних частин: об'єкта дослідження (м'яз *m. triceps surae*), датчиків з підсилювачами, які з'єднані з АЦП; АЦП в свою чергу має зв'язок з електростимулятором та підсилювачами. На схемі показано 2 канали, якими може подаватись аналогова інформація, але в цій статті дані про динаміку сумарного

потенціалу дії під час 10-хвилинного тесту не розглядаються.

Результати досліджень

Слід зауважити, що в перші десятки секунд скорочення спостерігається так званий процес впрацьовування, під час якого відбувається втягування рухових одиниць (РО) в процес скорочення, зміна порогу втягування РО та переважна скоротлива функція тих РО, енергопостачання яких йде переважно шляхом гліколізу («швидкі» РО). На фоні переважної кількості швидких РО (гліколітичних РО) питома вага внеску повільних РО значно менша. Під час впрацьовування робота швидких РО сприяє тому, що частина артеріол м'яза перетискується працюючими РО. Таким чином порушується кровопостачання



Рис. 2. Принципова схема установки, на якій проводився експеримент

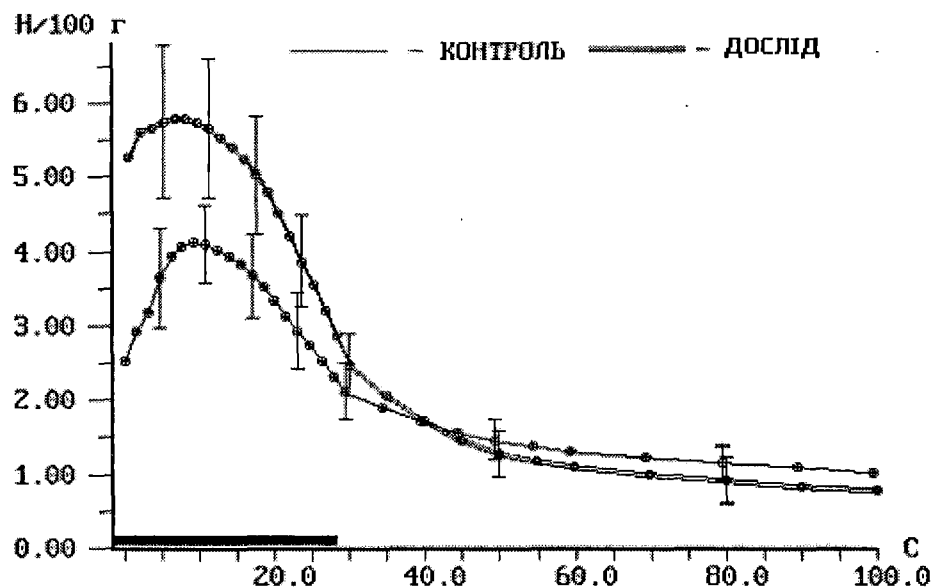


Рис. 3. Тензограми контрольних і дослідних тварин через 3 міс. після рентгенівського опромінення в дозі 1 Гр. Жирна лінія на осі абсцис – межа достовірності відмінностей

тих РО, скоротлива функція яких терміново залежить від кровопостачання. В міру витрат гліколітичного потенціалу, відносно незалежного від термінового кровопостачання, відбувається стомлення «швидких» РО, збільшується кровопостачання й активізується робота повільних РО, енергопостачання яких здійснюється завдяки окислювальному фосфорилуванню, терміново залежному від кровопостачання. Таким чином, частина тензограми, яка віддзеркалює процес впрацювання – це переважно робота гліколітичних РО, наступний період – це переважно робота повільних РО.

У першій серії з 15 контрольних і 15 дослідних тварин вивчали дію іонізуючого випромінювання на функцію нервово-м'язового апарату.

У другій серії з 15 контрольних і 15 дослідних тварин вивчали дію ацетату плумбуму на функцію нервово-м'язового апарату.

На графіку (рис. 4) показано результат двох серій експериментів із затравкою дослідних щурів ацетатом плумбуму. Як видно з порівняння тензограм, через 1 місяць затравки дослідних тварин ацетатом плумбуму виникають дещо інші закономірності відмінностей у працездатності. Як видно з рис. 4, тензограма щурів, що одержували солі свинцю з питною водою, відо-

бражає достовірно нижчу працездатність, ніж контрольних, інтактних тварин. Як видно з кривих, зниження тетанічного напруження м'язів дослідних тварин зберігається у всі періоди працездатності – і в період впрацювання, і в період стійкої працездатності нервово-м'язового апарату, тобто спостерігається рівномірний спад працездатності затравлених солями плумбуму м'язів.

Обговорення результатів

Великою проблемою в гострих експериментах на тваринах завжди була уніфікація дослідних процедур і їх повторюваність. Повна автоматизація дослідів за допомогою аналого-цифрового перетворювача і відповідної комп'ютерної програми допомогла вирішити цю проблему. Після початку 10-хвилинного тесту послідовність реєстрації тензограми реалізується автоматично через певні запрограмовані проміжки часу. В одному експерименті за 10 хвилин стимуляції обробляється $56 \cdot 200 = 11\,200$ цифр. Така вагома матриця дає детальну й об'єктивну інформацію про працездатність нервово-м'язового апарату, а статистична обробка великого числового матеріалу є достовірною.

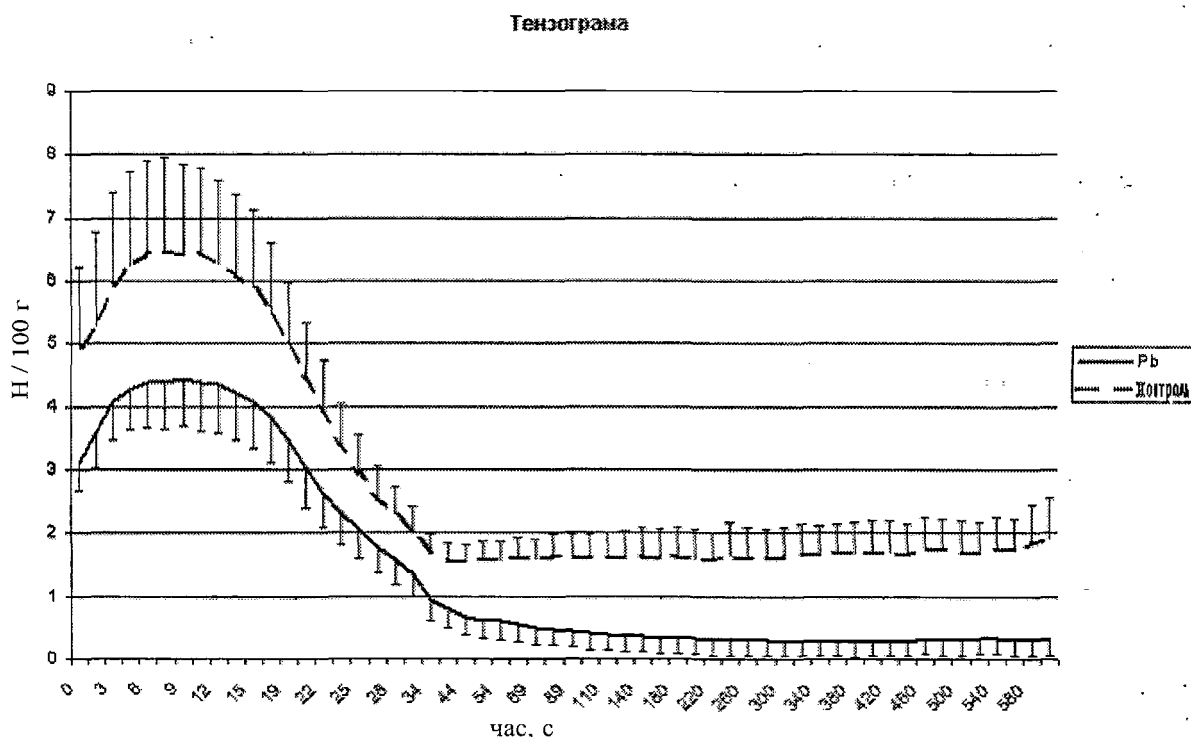


Рис. 4. Середні значення максимального тетанічного напруження м'язів контрольних і дослідних тварин після їх затравки ацетатом плумбуму. На осі ординат – сила в ньютонках, розрахована на 100 г маси. Шкала часу нерівномірна

У дослідях із опроміненням показано, що опромінені щури проявляють більшу працездатність принаймні в перші секунди стимуляції, коли йде процес впрацювання. Це може бути пов'язано зі зміною чутливості РО, коли вони з розряду високопорогових переходять в низькопорогові, і тоді легше відбувається втягування їх у скорочувальний процес. Слід зауважити, що більше максимальне тетанічне напруження не має розцінюватись як позитивний фактор, навпаки, воно свідчить про неекономне витрачання скорочувального потенціалу. Аналіз періоду стійкої працездатності, коли переважно працюють оксигенозалежні РО, свідчить, що у опромінених тварин є тенденція до зниження працездатності в порівнянні з інтактними тваринами.

У процесі реєстрації тензограми за 10 хвилин відбувалося 56 записів із частотою, що поступово знижувалась після перших хвилин від початку стимуляції. Крива на графіку є середньою з 15 дослідних та 15 контрольних експериментів. Завдяки реалізації програми комп'ютер дає можливість зробити статистичний аналіз за критерієм Стюдента по 56 вибірок дослідної та контрольної серій, як видно з графіка, де відображено тензограми контрольних і дослідних тварин. На етапі впрацювання опромінені тварини проявляли більш високу працездатність, що видно з динаміки максимальної тетанічної сили м'яза. Через 40–50 с, коли вже наставав період стійкої працездатності, можна помітити деяку тенденцію до меншої сили м'язів опромінених тварин. І нехай ця відмінність ще не є статистично значимою, але те, що всі без винятку точки тензограми опромінених тварин в періоді стійкої працездатності знаходяться нижче від відповідних точок на тензограмах контрольних тварин, дає підстави стверджувати, що достовірні відмінності є, але для такого формального твердження є недостатньою величина вибірки ($n = 15$).

У серії дослідів із затравкою ацетатом плюмбу спостерігається закономірне й рівномірне зниження працездатності на обох основних етапах працездатності – в періоді впрацювання і в періоді стійкої працездатності. Власне кажучи, зниження сили м'яза або стомлення є результатом виключення (виходу з ладу) РО, чи то в результаті виснаження енергетичних ресурсів, чи гальмування збудливих систем в умовах синаптичної передачі сигналів.

Таким чином, у представлених дослідях маємо 2 типи реакції на дії факторів навколишнього середовища: фізичного фактора – іонізуючого випромінювання й хімічного фактора – відносно

малих доз ацетату плюмбу. При дії іонізуючого випромінювання на стадії впрацювання м'язи опромінених тварин демонструють достовірно більше максимальне тетанічне напруження, коли енергопостачання в основному залежить від процесів анаеробного гліколізу, а на стадії стійкої працездатності, коли енергопостачання переважно залежить від процесів окислювального фосфорилування, опромінені тварини проявляють в умовах непрямой стимуляції менше тетанічне напруження в порівнянні з контрольними тваринами. При дії хімічного фактора, ацетату плюмбу, на стадії впрацювання м'язи дослідних тварин демонструють достовірно менше в порівнянні з контрольними тваринами максимальне тетанічне напруження, коли енергопостачання в основному залежить від процесів анаеробного гліколізу. А на стадії стійкої працездатності, коли енергопостачання переважно залежить від процесів окислювального фосфорилування, затравлені тварини проявляють в умовах непрямой стимуляції також менше тетанічне напруження в порівнянні з контрольними тваринами.

Представлені дані свідчать, що з допомогою запропонованої нами методики 10-хвилинного тесту можливо одержати своєрідні «енграми» стомлення нервово-м'язового апарату при дії фізичних і хімічних факторів навколишнього природного середовища й робити висновки про участь функціонально різних РО, шляхів їх енергозабезпечення. Слід підкреслити, що доцільне подальше удосконалення описаного тесту й розширення функціональних показників нервово-м'язового апарату, наприклад паралельний аналіз динаміки сумарного біоелектричного потенціалу.

Висновки

1. Запропоновано уніфіковану методику оцінки впливу факторів довкілля на нервово-м'язовий апарат експериментальних тварин – 10-хвилинний тест.

2. Разова дія іонізуючого випромінювання в дозі 1 Гр на все тіло через 3 міс. призводить до змін в організмі, які полягають у зміні працездатності нервово-м'язового апарату.

3. Зміни в працездатності нервово-м'язового апарату через 3 міс. після опромінення полягають у тому, що м'яз розвиває достовірно більше максимальне тетанічне напруження на стадії впрацювання й менше тетанічне напруження

на стада стійкої працездатності в порівнянні з контрольними інтактними тваринами.

4. Плюмбум ацетат достовірно знижує максимальне тетанічне напруження триголового м'яза стегна в умовах непрямой електростимуляції (10 порогів) та елітного тетанусу (40 Гц).

5. Падіння максимального тетанічного напруження в затравлених ацетатом плюмбуму щурів становить 10-20 % в порівнянні з контроль-

ними в тензограмі протягом 10-хвилинного тесту у всі періоди працездатності (впрацювання, стійкий період працездатності).

6. Для подальшого аналізу отриманих результатів необхідно продовжити вивчення механізмів порушення скорочувальної здатності нервово-м'язового апарату в усіх ланках забезпечення його працездатності.

1. Замостьян В. П. Об условиях неустойчивости скелетных мышц // Физиологический журнал СССР им. И. М. Сеченова.-Л.: Наука, 1976.-Том LXII.-№ 1.-С. 97-104.
2. Замостьян В. П., Зотов С. В. Взаимодействие мышечных волокон в обеспечении неустойчивости. Физиологический журнал СССР им. И. М. Сеченова.- Л.: Наука.-Том LXII.-№ 10.- 1976.-С. 1452-1460.
3. Хмелевский Ю. М. Параметризация и статистический анализ стохастических сигналов в биологических исследованиях. Автореферат кандидатской диссертации.- К., 1992.- 17 с.
4. Хмелевский Ю. М., Янина А. Н., Замостьян В. П. Автоматизированное управление электрофизиологическим экспериментом в радиобиологических исследованиях // Тезисы Международной научной конференции студентов, молодых ученых и специалистов. Укрывузполиграф, 1989,-С. 158.
5. Barclay C. J. Mechanical efficiency and fatigue of fast and slow muscles of the mouse // The journal of Physiology.- Vol. 497.- Issue 3.- P. 781-794.
6. Carp J. S., Herchenroder P. A., ChenX. Y. and WolpawJ. R. Sag During Unfused Tetanic Contractions in Rat Triceps Surae Motor Units. Soc. Neurosci.- 26: 2647-2661, 1999.
7. LowrieM. B., Vrbova G. Different pattern of recovery of fast and slow muscles following nerve injury in the rat // The Journal of Physiology.- Vol. 349.- Issue 1.- P. 397-410.
8. WesterbladH., Allen D. G. The contribution of $[Ca^{2+}]_i$ to the slowing of relaxation in fatigued single fibers from mouse skeletal muscle // The Journal of Physiology- Vol. 468.- Issue 1.-P. 729-740.

V. Zamostyan, V. Fedirko

NERVE-MUSCULAR APPARATUS IN SITU AS INDICATOR OF ENVIRONMENTAL FACTORS INFLUENCE ON AN ORGANISM

It is proposed to use nerve-muscular apparatus of experimental animals as sensitive indicator of chemical and physical environmental factors influence on an organism. The method is based on non-direct stimulation of nerve-muscular apparatus in situ within uniform computer program. Test duration — 10 minutes. Computer conducting experiment allows to uniform investigation and run correct statistical processing of obtained results. Examples of muscle work capacity after influence of ionizing radiation and after acetate plumbum effect are given in the article.