

Експериментальна фізіологія та біохімія

УДК 616.379-008.64:612.73/.74:612.81-073.7-092.9

О.Г. РОДИНСЬКИЙ, О.Г. ЗІНОВ'ЄВА, О.В. МОЗГУНОВ
ДЗ "Дніпропетровська медична академія МОЗ України"

Електрофізіологічний аналіз збудливості нервово-м'язового комплексу за умов експериментального цукрового діабету

Цукровий діабет (ЦД) та його ускладнення — одна з найпоширеніших патологій, що призводить до інвалідизації та смертності, які за офіційними даними сягають від одного до трьох мільйонів людей щорічно. Кількість хворих на діабет зростає до 5 мільйонів на рік [6].

Серед ускладнень ЦД одне з перших місць посідає діабетична нейропатія (ДН). Її розвиток визначає прогноз перебігу захворювання (больова форма нейропатії, нейротрофічні виразки, синдром діабетичної стопи) та смертність (автономну полінейропатію вважають однією з основних причин підвищення смертності від серцево-судинних захворювань на тлі ЦД [3]). Поширеність ДН, за даними авторів, коливається від 12 до 94% [1]. Такі коливання даних пояснюють тим, що перші клінічні симптоми нейропатії з'являються через кілька років від початку захворювання [11]. Саме тому використання електрофізіологічних методів дослідження може сприяти виявленню прихованої нейропатії на доклінічній стадії. Поширення нейропатії зростає зі збільшенням віку хворих та тривалості захворювання, а частота її розвитку серед хворих на ЦД 1-го і 2-го типу є приблизно однаковою [7].

ДН уражує усі відділи нервової системи, як центральні, так і периферичні. Найпершими до процесу залучаються дистальні відділи периферичної нервової системи [4]. На початкових етапах нейропатія має сенсорний характер, до процесу залучаються волокна типу A_{Δ} і C [3], згодом починають залучатися й товсті чутливі волокна, а за ними й рухові нервові волокна [10, 12, 18].

Мета нашого дослідження — вивчити електрофізіологічну активність нервово-м'язової системи за умов модельованого ЦД.

Матеріали і методи дослідження. Дослідження було проведено на 30 статевозрілих самцях лінії Вістар масою 180...250 г, яких було поділено на дві групи: I група — інтактні тварини ($n = 16$), II — тварини з експериментальним ЦД ($n = 14$).

Експериментальний ЦД моделювали за допомогою одноразового інтраперитонеального введення алоксану з розрахунку 155 мг/кг маси тіла щура після голодування протягом доби при збереженому доступі до води. Контрольну групу утримували у стандартних умовах віварію ($t^{\circ} 22 \pm 2^{\circ} \text{C}$, світлий/темний цикл — 12/12 год). Тварин 10 діб утримували на стандартній дієті, після чого вимірювали рівень глюкози крові за допомогою глюкометра *One Touch Ultra*. Для подальших досліджень відбирали тварин з рівнем глюкози крові > 15 ммоль/л [2]. На 30-у добу після відтворення ЦД тварин залучали до гострого екс-

перименту. Для наркозу вводили тіопентал натрію дозою 50 мг/кг маси. Відпрепарований сідничний нерв розміщували на біполярних подразнювальних електродах. Відведення потенціалу дії (ПД) від литкового м'яза здійснювали за допомогою двох голчастих електродів. Для прямої стимуляції литкового м'яза використовували голчасті електроди, які вводили безпосередньо в м'яз [9]

Аналізували показники збудливості нервово-м'язової системи, такі, як амплітуда, латентний період (ЛП), тривалість ПД, поріг (П) та хронаксія литкового м'яза. Також вивчали амплітуду ПД литкового м'яза шляхом непрямого подразнення стимулами зростаючої інтенсивності (від 1,1 до 2П). Явище рефрактерності аналізували шляхом непрямого подразнення парними стимулами з інтервалом від 1 до 20 мс, тривалістю 0,3 мс, інтенсивністю 2П. Для повноти відображення картини змін збудливості в нервово-м'язовому комплексі використовували частотну стимуляцію сідничного нерва серією імпульсів (10 імпульсів у пачці з частотою від 50 до 500 Гц).

Дослідження проводили за допомогою стандартної електрофізіологічної апаратури: електростимулятора ЕСУ-2, підсилювача УБП 2-03, осцилографа С-1-83, аналого-цифрового пристрою з реєстрацією на комп'ютер. Отримані результати оброблені за допомогою статистичних методів з визначенням середнього (M), помилки середнього (m), середньоквадратичного відхилення (σ) для подальшого аналізу за критерієм Стьюдента з визначенням рівня достовірності (p).

Результати досліджень та їх обговорення. Амплітуда ПД інтактної групи литкового м'яза при його непрямій стимуляції становила $36,11 \pm 2,61$ мВ ($n = 12$). У групі тварин з експериментальним ЦД було виявлено достовірне ($p < 0,05$) зниження цього показника, який дорівнював 80,08% ($29,18 \pm 2,54$ мВ, $n = 10$). Показники в контрольній групі приймали за 100%.

Тривалість ЛП литкового м'яза інтактної групи при його непрямому подразненні становила $0,637 \pm 0,027$ мс ($n = 13$), тоді як у тварин з експериментальним ЦД тривалість цього показника достовірно ($p < 0,001$) збільшувалася до 156,82% ($0,999 \pm 0,057$ мс, $n = 11$).

Аналіз загальної тривалості ПД свідчить, що у контрольній групі він становив $5,24 \pm 0,15$ мс ($n = 15$), та порівняно з тваринами з експериментальним ЦД цей показник достовірно ($p < 0,001$) збільшувався на 154,58% ($8,1 \pm 0,57$, $n = 11$) (рис. 1).

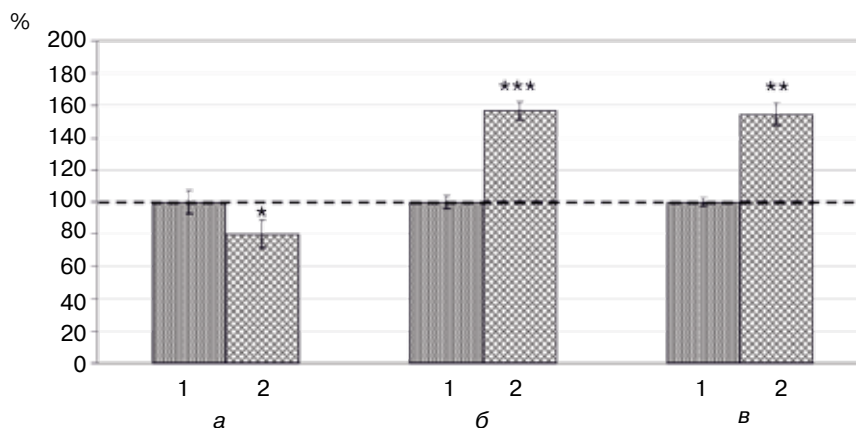


Рис 1. Характер зміни параметрів потенціалу дії литкових м'язів білих щурів за умов експериментального ЦД (середні показники амплітуди (а); латентного періоду (б); тривалості зумовлених відповідей литкових м'язів білих щурів при їх непрямому подразненні (в)): 1 — інтактна група тварин; 2 — тварини з експериментальним цукровим діабетом. За 100% прийняті значення в інтактній групі тварин. Рівень значущості * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$.

Значення порогу збудження литкового м'яза при непрямій стимуляції становило $15,125 \pm 1,09$ мВ ($n = 16$), у тварин з експериментальним ЦД достовірно ($p < 0,01$) збільшувалося до $136,85\%$ ($20,7 \pm 1,39$, $n = 10$).

Для оцінки часової динаміки збудження використовували метод хронаксиметрії. Значення хронаксії литкового м'яза при непрямому подразненні становило $46,15 \pm 2,8$ мкс ($n = 13$) порівняно з тваринами з експериментальним ЦД цей показник змінювався недостовірно ($p > 0,05$) і дорівнював $98,6\%$ ($45,53 \pm 3,45$, $n = 13$) (рис. 2).

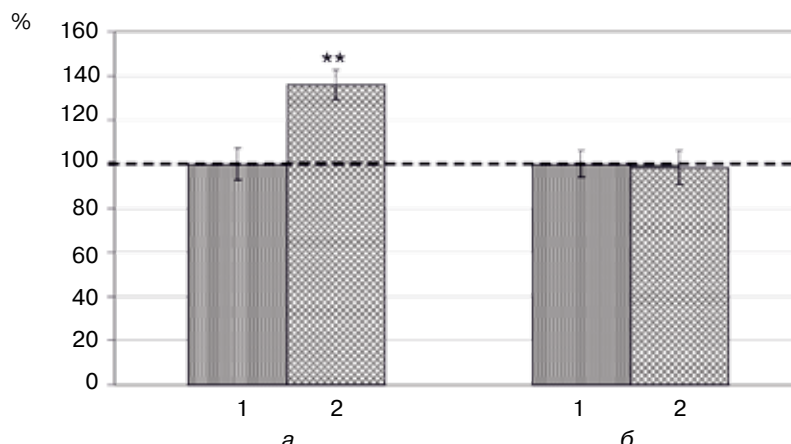


Рис 2. Характер зміни параметрів потенціалу дії литкових м'язів білих щурів за умов експериментального ЦД (середні показники: порогу (а); хронаксії зумовлених відповідей литкових м'язів білих щурів при їх непрямому подразненні (б)). Інші позначення ті ж, що й на рис. 1.

За умов прямого подразнення литкового м'яза вивчали такі параметри, як поріг та хронаксія. При дослідженні порогу було виявлено, що цей показник у інтактної групи дорівнював $29,38 \pm 2,36$ ($n = 13$), а у групі тварин з експериментальним ЦД достовірно підвищувався ($p < 0,01$) до $184,1\%$ ($54,08 \pm 5,55$ мВ, $n = 12$). Показник хронаксії становив $44 \pm 2,35$ мкс в інтактній групі та достовірно зменшувався ($p < 0,05$) у групі тварин з експериментальним ЦД і дорівнював $85,6\%$ ($37,7 \pm 1,72$ мкс, $n = 10$) (рис. 3).

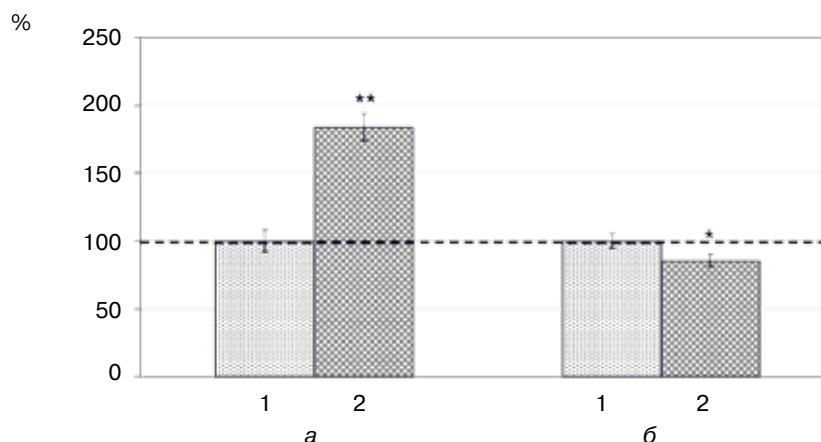


Рис 3. Характер зміни параметрів потенціалу дії литкових м'язів білих щурів за умов експериментального ЦД (середні показники: порогу (а); хронаксії зумовлених відповідей литкових м'язів білих щурів при їх прямому подразненні (б)). Інші позначення ті ж, що і на рис. 1.

При стимуляції сідничного нерва парними стимулами із заданими часовими інтервалами (від 1 до 20 мс) реєстрували зміни в динаміці фаз рефрактерності відповідей литкового м'яза. Від 6 і до 10 мс між стимулами було виявлено достовірне ($p < 0,05$) зниження амплітуди ПД у відповідь на другий стимул у групі тварин з експериментальним ЦД ($n = 10$) порівняно з інтактною групою ($n = 16$). На інших часових інтервалах достовірних змін амплітуди ПД не було виявлено.

При нанесенні частотної стимуляції на сідничний нерв серією імпульсів не було виявлено достовірних змін амплітуди ПД литкового м'яза при частоті від 50 до 500 Гц.

Усі вищезазначені зміни свідчать про те, що ЦД спричинює суттєві зміни у функціонуванні нервово-м'язового комплексу вже на ранніх етапах розвитку захворювання. Результатом цього є зниження збудливості даного апарату, про що свідчить підвищення порогу збудження литкового м'яза як при його прямому, так і непрямому подразненні. Це, насамперед, може бути пов'язане з процесами демієлінізації при ЦД, що призводить до зниження збудливості нервово-м'язового апарату вже на ранніх стадіях захворювання та пов'язаних з дисметаболічними та дизімунними порушеннями [8]. Відомо, що за умов ЦД знижується мембранний потенціал спокою та провідність по мембрані м'язового волокна, виникають зміни параметрів потенціалу кінцевої пластинки, що за даними деяких авторів є результатом зміни входження Ca^{2+} через потенціалзалежні Ca^{2+} -канали в термінальну мембрану [13]. Цим можна пояснити зниження порогу збудження при прямому подразненні литкового м'яза. Водночас у наших дослідженнях показники хронаксії давали різні результати: при непрямому подразненні литкового м'яза хронаксія суттєво не змінювалася ($p > 0,05$) (рис. 2), а при прямому подразненні достовірно зменшувалася ($p < 0,05$) (рис. 3).

Про порушення стану периферичної нервової системи свідчать також збільшення ЛП та загальної тривалості ПД у тварин з експериментальним ЦД, що було продемонстровано у наших дослідженнях. Зміну цих показників можна розцінювати як наслідок зниження швидкості проведення збудження, основою чого може бути мієлінопатія [17], невральні ішемії та порушення синтезу оксиду азоту, що призводить до порушення кровопостачання нервових стовбурів. Слід зазначити, що в основі цих процесів лежать оксидантний стрес, зниження запасів міоїнозиту, а як наслідок — накопичення у нервових клітинах сорбітолу та фруктози (продуктів альтернативного обміну глюкози в умовах хронічної гіперглікемії) [15]. Це, в свою чергу, призводить до їх пошкодження за рахунок внутрішньоклітинних змін як наслідок конкурування сорбітолу та фруктози з глюкозою в синтезі міоїнозиту [19]. За умов його нестачі не відбувається на достатньому рівні транспортування Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , що врешті призводить до порушення передачі нервових імпульсів; процес також посилюється кінцевими продуктами глікування [5].

За умов ЦД виявляють хронічну аксональну дегенерацію, вона корелює зі зниженням сумарного ПД (у зв'язку з денервацією м'язових волокон) [14, 21], цим може пояснюватися знайдене нами зниження амплітуди ПД (див. рис. 1). Інші автори зазначають зниження Na^+ через потенціалзалежні Na^+ -канали [16].

Слід також додати, що при ЦД може зростати асинхронність зумовлених відповідей, яка виникає за умов подразнення різних типів волокон, що входять до складу сідничного нерва — спочатку до процесу залучаються сенсорні, а згодом і моторні нервові волокна [3, 12].

Зниження збудливості нервових волокон при непрямій стимуляції литкового м'яза проявляється підвищенням порогу, але разом з тим час досягнення критичного рівня деполяризації практично не змінювався, про що свідчило незначне зниження хронаксії (рис. 2). Можна при-

пустити, що при подразненні сідничного нерва стимулами зростаючої інтенсивності достовірно підвищення амплітуди ПД зафіксоване лише при силі подразника 1,1П, а подальше збільшення сили подразника несуттєво змінювало активність швидких Na^+ -каналів, про що свідчить недостовірність характеру змін.

Зміни функціонування нервово-м'язового комплексу за умов експериментального ЦД призводять до модифікації фаз його рефрактерності. Це підтверджують достовірні зміни у часових інтервалах від 6 до 10 мс між подвоєними подразненнями. Причиною цього може бути зниження активності Na^+/K^+ -АТФази, яке впливає на нормальну реполяризацію мембрани після фази деполяризації, що спостерігається вже на ранніх етапах захворювання [22].

Відсутність достовірних змін при частотній стимуляції сідничного нерва серією імпульсів підтверджують дані, що діабетичний нерв відносно резистентний до високочастотної стимуляції, а це, в свою чергу, може бути обґрунтоване зниженням рушійної сили Na^+ і кількістю Na^+ -каналів, що перебувають в інактивованому стані, а також не виключається роль накопичення K^+ [20].

Висновки. За умов експериментального ЦД спостерігаються зміни у функціонуванні нервово-м'язового комплексу, що проявляється в збільшенні порогу збудження як при прямому, так і непрямому подразненні литкового м'яза, ЛП і загальної тривалості ПД, зменшенні амплітуди ПД. Хронаксія при непрямому подразненні достовірно не змінювалася, тоді як при прямій стимуляції було виявлено її достовірне зменшення. ЦД призводить до змін фаз рефрактерності, відбувається достовірне зниження амплітуди ПД у відповідь на другий стимул. Виявлена також резистентність діабетичного нерва до частотної стимуляції. В умовах модельованого ЦД визначаються достовірні зміни зумовленої біоелектричної активності литкового м'яза, що виявляється у зменшенні ступеня синхронізації відповіді досліджуваного м'яза та в уповільненні його відповіді на непряме подразнення.

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Воробьева А.А. Диабетическая нейропатия: некоторые вопросы распространенности, патогенеза и лечения / А.А. Воробьева // Рус. мед. журн. — 2009. — № 11. — С. 748–750.
2. Жиллюк В.И. Влияние средств с ноотропными и нейропротекторными свойствами на процессы энергетического метаболизма и проявления митохондриальной дисфункции в нейронах головного мозга крыс с аллоксановым диабетом / В.И. Жиллюк, В.И. Мамчур, С.В. Павлов, Н.В. Бухтиярова // Пробл. эндокрин. патол. — 2010. — № 3. — С. 69–74.
3. Жулев С.Н. Комплексная нейрофизиологическая диагностика полиневропатического синдрома / Вестн. рос. воен.-мед. акад. — 2009. — № 2(26). — С. 110–117.
4. Зиновьева О.Е. К оценке функционального состояния периферического нейромоторного аппарата у больных сахарным диабетом / О.Е. Зиновьева, Ф.Е. Горбачева, В.А. Парфенов // Журн. невропатол. и психиатр. — 1991. — Т. 91, № 4. — С. 18–22.
5. Калинин А.П. Диабетическая нейропатия / А.П. Калинин, И.Г. Рудакова, С.В. Котов // Альманах клин. мед. — 2001. — № 4. — С. 95–107.
6. Каминский Ю.Г. Активность антиокислительных ферментов в печени и мозге снижается в ранние сроки диабета, и это снижение зависит от функционирования NMDA-рецепторов / Ю.Г. Каминский, А.Ю. Каминский, Е.А. Косенко // Вопр. мед. химии. — 1999. — № 4. — С. 304–308.
7. Маньковский Б.Н. Поражение нервной системы при сахарном диабете — клинические проявления и лечение / Б.Н. Маньковский // Журн. практ. лікаря. — 2003. — № 1. — С. 27–32.
8. Неретин В.Я. Клинико-электрофизиологическое изучение состояния нервно-мышечной системы у больных сахарным диабетом 1 и 2 типов / В.Я. Неретин, С.В. Котов, Л.В. Петина // Журн. неврол. и психиатрии им. Корсакова. — 1997. — № 2. — С. 34–38.
9. Неруш П.О. Вікові особливості функціонування нервово-м'язової системи щурів за умов гіпертиреозу / П.О. Неруш, Є.А. Макий, О.Г. Родинський // Фізіол. журн. — 2001. — Т. 47, № 5. — С. 12–17.
10. Пирадов М.А. Поражение периферической нервной системы при сахарном диабете / М.А. Пирадов, Н.А. Супонева // Рус. мед. журн. — 2006. — Т. 14, № 23. — С. 1649–1652.
11. Ривилис И.С. Распространенность и факторы риска развития диабетической нейропатии / И.С. Ривилис, Б.Н. Маньковский // Лік. справа. — 2000. — № 7–8. — С. 69–71.
12. Сивоус Г. Клиническая характеристика диабетической периферической полиневропатии

у детей и подростков / Г.Сивоус // Врач. — 2004. — № 2. — С. 43–45. 13. *Fahim M.* Early morphological remodeling of neuromuscular junction in a murine model of diabetes / M. Fahim, M. Hasan, W. Alshuaib // J. Appl. Physiol. — 2000. — Vol. 89. — P. 2235–2240. 14. *Ferreira L.-B.* Sciatic nerve lipoprotein lipase is reduced in streptozotocin-induced diabetes and corrected by insulin / L.-B. Ferreira, P. Huey, B. Pulford, D. Ishii, R. Eckel // Endocrinol. — 2002. — Vol. 143(4). — P. 1213–1217. 15. *Goh S.* The role of advanced glycation and products in progression and complications of diabetes. / S. Goh, M. Cooper // J. Clin. Endocrin. Metab. — 2008. — Vol. 93(4). — P. 1143–1152. 16. *Hong S.* Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in tetrodotoxin-sensitive and -resistant sodium channels in dorsal root ganglion neurons in the rat / S. Hong, T. Morrow, P. Paulson, L. Isom, J. Wiley // Issue. — 2004. — Vol. 279, № 28. — P. 29341–29350. 17. *Huang T.* Insulin prevents depolarization of the mitochondrial inner membrane in sensory neurons of type 1 diabetic rats in the presence of sustained hyperglycemia / T. Huang, S. Price, L. Chilton et al. // Diabetes. — 2003. — Vol. 52. — P. 2129–2136. 18. *Obrosova I.* Different roles of 12/15-lipoxygenase in diabetic large and small fiber peripheral and autonomic neuropathies / I. Obrosova, R. Stavniichuk, V. Drel et al. // The Amer. Journ. of Pathology. — 2010. — Vol. 177, № 3. — P. 1436–1447. 19. *Obrosova I.* Role of poly(ADP-Ribose)polymerase activation in diabetic neuropathy / I. Obrosova, F. Li, O. Abatan et al. // Diabetes. — 2004. — Vol. 53. — P. 711–720. 20. *Schiller Y.* Neuromuscular Transmission in Diabetes: Response to High-Frequency Activation / Y. Schiller, R. Rahamimoff // The Journ. of Neuroscience. — 1989. — Vol. 9(11). — P. 3709–3719. 21. *Souayah N.* Motor unit number estimate as a predictor of motor dysfunction in an animal model of type 1 diabetes / N. Souayah, J. Potian, C. Garcia, N. Krivitskaya, C. Boone, V. Rout, J. McArdle // Am. J. Physiol. Endocrin. Metab. — 2009. — Vol. 297. — P. 602–608. 22. *Vague P.* C-peptide, Na⁺, K⁺ -ATPase, and diabetes / P. Vague, T. Coste, M. Jannot et al. // Experimental Diab. Res. — 2004. — № 5. — P. 37–50.

Стаття надійшла до редколегії 1.06.12

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОЗБУДИМОСТИ НЕРВНО-МЫШЕЧНОГО КОМПЛЕКСА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

А.Г. РОДИНСКИЙ, Е.Г. ЗИНОВЬЕВА, А.В. МОЗГУНОВ

Исследовали параметры биоэлектрической активности нервно-мышечного комплекса в условиях экспериментального сахарного диабета. Зафиксировано повышение порога возбуждения икроножной мышцы при прямой и непрямой ее стимуляции, уменьшение амплитуды потенциала действия, увеличение латентного периода и общей продолжительности потенциала действия у животных с сахарным диабетом. Были сделаны выводы, что в условиях экспериментального сахарного диабета выявлены изменения, которые приводят к снижению возбудимости нервно-мышечного аппарата и влияют на фазы рефрактерности, а также достоверные изменения, которые проявляются в уменьшении степени синхронизации ответа испытуемой мышцы и в замедлении ее ответа на непрямое раздражение.

Ключевые слова: экспериментальный сахарный диабет, электрофизиологические исследования, потенциал действия.

ELECTROPHYSIOLOGICAL ANALYSIS OF THE NEUROMUSCULAR COMPLEX EXCITABILITY IN EXPERIMENTAL DIABETES

A. RODINSKY, E. ZINOVIEVA, A. MOZGUNOV

Parameters of bioelectrical activity of the neuromuscular complex in condition of experimental diabetes have been investigated. Increase of excitation threshold of the calf muscles under direct and indirect stimulation, as well as decrease of action potential amplitude, increase of latent period, and total duration of action potential in animals with diabetes mellitus have been found. In sciatic nerve stimulation with paired stimuli changes in dynamics of phase refractoriness of the neuromuscular complex have been studied. It has been concluded that experimental diabetes was accompanied by essential changes in activity of the neuromuscular complex, which in turn led to decrease of its excitability and changes of phases of refractoriness. Also significant changes of the gastrocnemius muscle activity, which resulted in decrease of the synchronization degree of the studied muscle response, and in slowing its response to indirect stimulation.

Key words: experimental diabetes, electrophysiological studies, action potential.