

О. А. Мельничук, зав. лаб. електроміографії

С. Є. Швайко, к. б. н., доцент

Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки, кафедра фізіології людини і тварин, вул. Потапова, 9, Луцьк, 43025, Україна. e-mail: olexi-ymelnichuk@gmail.com.

ФАКТОРНА СТРУКТУРА ПАРАМЕТРІВ ІЗОМЕТРИЧНОГО СКОРОЧЕННЯ *EX VIVO* М'ЯЗУ *GASTROCNEMIUS MEDIALIS* У ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ З ГОСТРОЮ ІШЕМІЄЮ ТАЗОВИХ КІНЦІВОК

Застосуванням методів аналізу головних компонент і обертання факторів у двовимірному просторі Варімакс та критерію кам'янистого осипу було знайдено два фактори, що впливають на власну скоротливу здатність ішемізованого м'язу, яку реєстрували тензометричним методом. З'ясовано, що вона більше залежить від змінних, які навантажують перший фактор і характеризують біомеханічні властивості м'язового скорочення, тоді як другий, що пов'язаний з індексом втоми, є другорядним.

Ключові слова: гостра ішемія; м'язи; ізометричне скорочення; *gastrocnemius medialis*.

Фундаментальні дослідження м'язового скорочення, які були виконані у 1930–50 роках Хіллом [8] і Хакслі [9] стали підґрунтям для з'ясування біомеханічних властивостей скелетних м'язів [18], їх структурної організації [10] та особливостей функції [14]. Сучасні дослідження власної скоротливої здатності м'язів пов'язані з потребою впровадження нових методів і технологій у реабілітаційній інженерії та підходах до диференціації м'язової дисфункції [7]. Для вирішення цих практичних завдань широко застосовують метод біомеханічного аналізу м'язового скорочення *ex vivo* [16], який характеризується високою інформативністю [12].

Сьогодні залишається актуальною проблема виявлення ранніх ознак гострої ішемії [11], яка може завдати м'язам більших пошкоджень аніж хронічна [17] та є однією з найпоширеніших і часто смертельних міопатологій, що може відбуватися в будь-якому регіоні кінцівки або в дистальних відділах стопи [1]. Частота її діагностування становить 13–17 випадків на 100000 осіб щороку, а рівень смертності досягає 18 % [7], перевищуючи в деяких випадках 25 % [5].

Водночас повідомляється про недостатню ефективність методів фармакологічної та ендоваскулярної корекції гострої ішемії [13]. Згідно з клінічними спостереженнями її домінуючі симптоми пов'язані з болем (зазвичай це перший прояв), який часто недостатньо чітко локалізований, або втратою рухової функції чи сенсорної чутливості кінцівки [4], які є важливою ідентифікаційною

ознакою для визначення терміновості виконання ревазуляризації [15]. Поряд з цим біомеханічний аналіз власної скоротливої здатності ішемізованого м'язу може дати важливу інформацію щодо оптимізації фармакологічної корекції цього синдрому, адже ізольовані м'язові препарати широко застосовуються для вирішення інших подібних завдань [16].

Метою дослідження було з'ясувати факторну структуру параметрів скоротливої здатності *ex vivo* м'язу *gastrocnemius medialis* у лабораторних щурів з гострою ішемією м'язів гомілки.

Матеріали та методи досліджень

Експерименти виконувались на 60-х здорових 5-місячних щурах-самцях інбредної лінії Вістар масою $160,37 \pm 13,81$ г відповідно до біоетичного регламенту [6]. Тварини були вирощені й утримувались у віварії лабораторії біофізики СНУ імені Лесі Українки відповідно до правил зоогієни.

Щурі були розділені випадковим чином на 4 групи: контрольну і 3 дослідні (тварини, в яких відтворювали 1, 3 й 6-годинну ішемію). Для відтворення білатеральної ішемії в анестезованих щурів (тіопентал натрію («ARTERIUM», Україна) – 50 мг/кг, підтримуюча доза – 30 мг/кг, швидкість введення – 5–10 мл/хв після попередньої премедикації 0,1 % атропіном («ДЗ ГНЦЛС», Україна) нейлоновими лігатурами (відріз нейлонової нитки типу «А» d – 0,152 мм й L – 5 см «Gudebrod Nylon Thread», США) перев'язувалась артерія *femoralis* у ділянці *femoris*.

Ізометричне скорочення *ex vivo* м'язу *gastrocnemius medialis* реєструвалось тензометричним методом в омиваючому розчині Тіроде під час безпосередньої електричної стимуляції м'язового препарату через паралельні платинові електроди стимулятора прямокутними імпульсами (напруга 2 В, тривалість 0,2 мс, частота 50 Гц), які були сформовані у 12 циклічних стимуляційних патернів тривалістю 3 с й міжстимульним інтервалом 5 хв. Осцилограми скорочення м'язу відображались на моніторі персонального комп'ютера у вікні осцилографа «Iris USB-Oscilloscope», ТТОВ «Відео-Інтернет Технології», Україна), який був з'єднаний з комп'ютером через відповідне програмне забезпечення й аналізувались у комп'ютерній програмі Origin 7.0. («Origin Lab Corporation», США).

Тетанічна сила (F_{tet}) розраховувалась у % як різниця між ізоелектричною лінією і тетанічним піком. Різниця величин сили м'язу при кожній стимуляції розраховувалась як відношення амплітуди послідовних тетанусів (y^{T_n}) до амплітуди першого тетанусу (y^{T_1} , рис. 1а), яку вважали за 100 %:

$$F_{tet} = y^{T_n} / y^{T_1}$$

Індекс втоми (FI) – розраховувався в частках від 1 як відношення (F_{tet}) м'язу в кожному наступному тетану $FI = \bar{F}_{tet}^{T_n} / F_{tet}^{T_p}$ передньому ($F_{tet}^{T_p}$):

Час розвитку тетанічної сили (ТР) – розраховувався в секундах (с) як різниця між точками (p) ізоелектричної лінії, що відображують $F_{tet}(p_2)$ і перше скорочення в тетанусі (p_1 ; рис. 1а):

$$ТР = p_2 - p_1$$

Індекс злиття (FuI) – розраховувався в частках від 1 в середині першої, другої і третьої третини осцилограми тетанусу як відношення амплітуди максимального розслаблення попереднього м'язового скорочення (x) до максимальної амплітуди наступного (y ; рис. 1б):

$$FuI = x/y$$

Час скорочення (CT_{tet}) – розраховувався у мс в останньому м'язовому скороченні кожного тетанусу як різниця тривалості знайденого часового відрізка ізолінії між точками максимальної амплітуди цього скорочення (t_1) і максимальної амплітуди (t_0) передостаннього скорочення (рис. 1б):

$$CT_{tet} = t_1 - t_0$$

Час напіврозслаблення (HRT_{tet}) – розраховувався у мс в останньому скороченні кожного тетанусу як різниця тривалості знайденого часового відрізка ізолінії між точками максимальної амплітуди цього скорочення (t_1) і часу її зменшення на половину (t_2 ; рис. 1б):

$$HRT_{tet} = t_1 - t_2$$

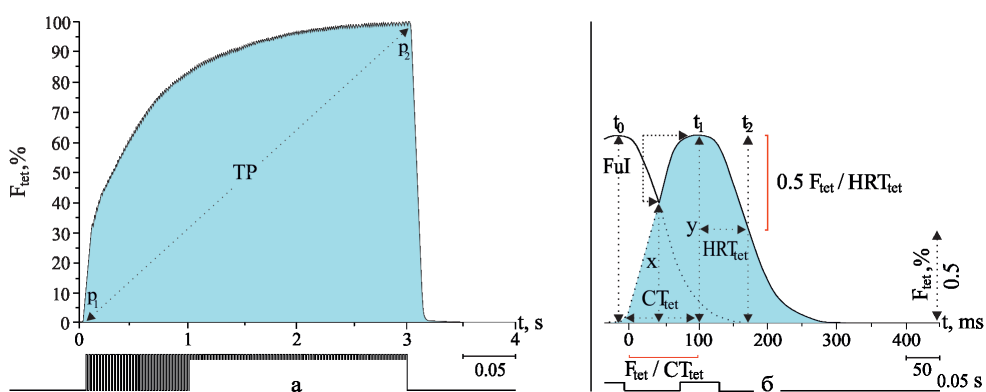


Рис. 1. Параметри ізометричного скорочення м'язу *gastrocnemius medialis*:
а – тетанічне скорочення, б – останнє скорочення в тетанусі
(знизу представлений стимуляційний патерн і його часовий фрагмент)

Темп зростання сили (F_{tet}/CT_{tet}) – розраховувався у кожному тетанусі як відношення показників (F_{tet}) до (CT_{tet}) і відображувався у %/мс (рис. 1б).

Темп спадання сили (F_{tet}/HRT_{tet}) – розраховувався у кожному тетанусі як відношення показників (F_{tet}) до (HRT_{tet}) і відображувався у %/мс (рис. 1б).

Для відображення факторної структури параметрів скорочення м'язу були застосовані методи аналізу головних компонент і ортогонального обертання факторів у двовимірному просторі Варімакс. Максимальну кількість факторів визначали за критерієм Кеттеля (Statistica 6.0. «Statsoft Inc», США).

Результати досліджень та їх обговорення

За критерієм кам'янистого осипу було виділено 2 фактори, власні значення яких пояснюють 87,22 % загальної дисперсії. Отже здійснена факторизація достатньо повна, а інші фактори можливо вважати незначимими.

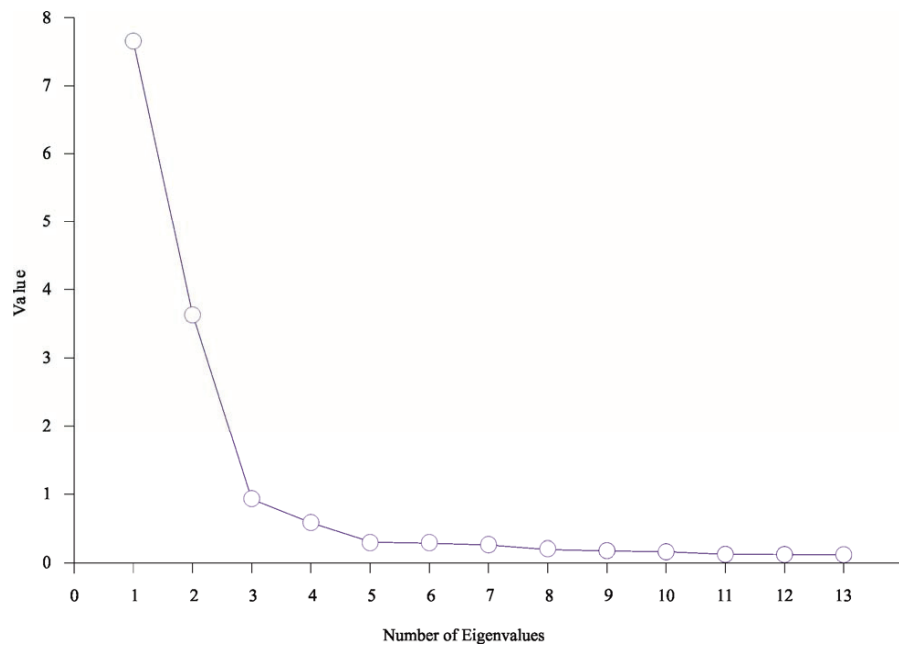


Рис. 2. Діаграма критерію кам'янистого осипу

Як видно з рис. 3 (а-г) перший фактор характеризується високими факторними навантаженнями через такі ознаки, як F_{tet} , TP , FuI , CT_{tet} , HRT_{tet} , F_{tet}/CT_{tet} і F_{tet}/HRT_{tet} . До другого фактора ввійшла змінна, яка пов'язана із низькочастотною м'язовою втомою (FI). Тому перший фактор можливо інтерпретувати, як фактор найбільшого впливу на власну скоротливу здатність м'язу, оскільки він охоплює 73,70 % загальної дисперсії, а другий – слабкого, на який припадає 13,82 % цієї дисперсії.

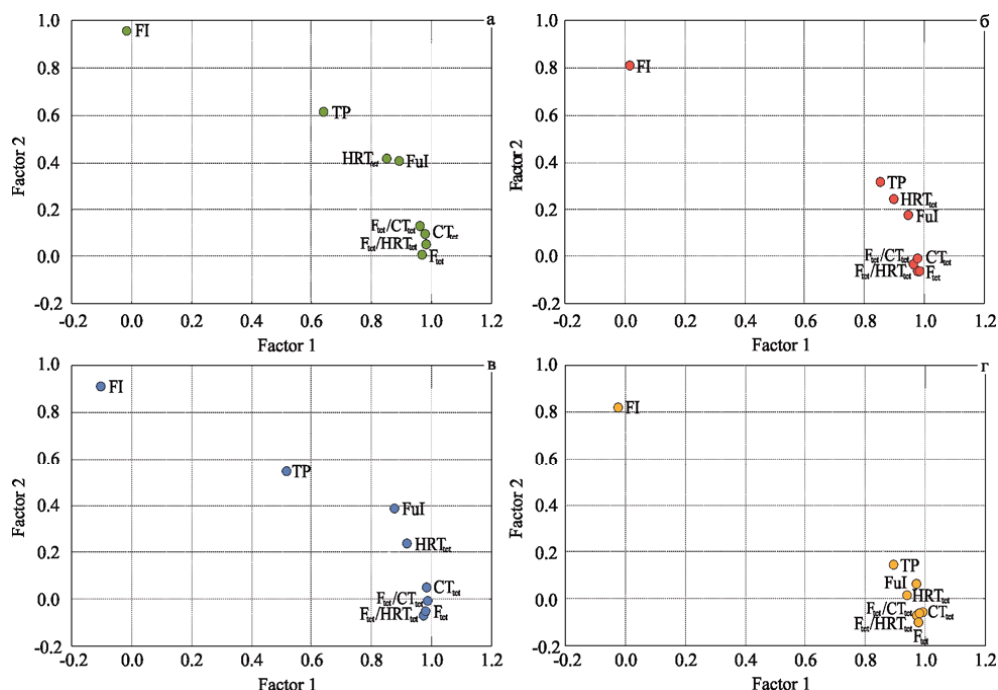


Рис. 3. Графік факторних навантажень в інтактних щурів (а) і в тварин із 1 (б), 3 (в) й 6-годинною (г) ішемією тазових кінцівок

Отримані результати показали, що зміст кожного фактора в інтактних щурів і в дослідних групах тварин подібний (рис. 3 а-г). В контролі перший фактор пояснює 77,41 % загальної дисперсії, а другий – 15,35 % (рис. 3а). Загалом вони охоплюють 92 % загальної дисперсії. Водночас у щурів із 1-годинною ішемією внесок першого фактора в загальну дисперсію становить 79,82 %, а другого – 14,43 % відповідно (рис. 3б). Обидва пояснюють 94,25 % цієї дисперсії. Аналогічно у тварин із 3-годинною ішемією перший фактор охоплює 73,22 %, а другий – 15,54 % загальної дисперсії (рис. 3в). Загалом – 88,76 % сумарної дисперсії. У щурів із 6-годинною ішемією перший фактор становить 80,23 %, а другий – 13,20 % від загальної дисперсії (рис. 3г). Обидва фактори пояснюють 93,43 % сумарної дисперсії. Варто зауважити, що в інтактних тварин і в щурів із 3-годинною ішемією зв'язок TP з першим фактором слабкий (рис. 3а, в), тоді як у тварин із 1- й 6-годинною ішемією факторні навантаження цієї змінної більші за модулем значення 0,7 (рис. 3 б, г).

Отже, отримана факторна структура параметрів ізометричного скорочення м'язу в щурів з гострою ішемією тазових кінцівок свідчить, що його власна скоротлива здатність більше залежить від змінних, які навантажують перший фактор і менше – від індексу втоми, який навантажує другий фактор (рис. 3б-г). Водночас ці результати показують, що біомеханічні характеристики м'язового

скорочення не пов'язані з низькочастотною втомою. Це означає, що вона розвивається незалежно від їх зміни.

Отримані результати узгоджуються зі спостереженням щодо незалежності зміни характеристик м'язового скорочення від зміни ізометричної сили [3], адже індекс втоми *інтерпретується, як відсоток від початкової сили* [2]. Це пояснює відсутність його зв'язку з іншими параметрами скорочення м'язу і показує, що обидва чинники впливають на його власну скоротливу здатність незалежно один від одного. Тому втома може розглядатись як другорядний фактор зміни власної скоротливої здатності ішемізованого м'язу, яка більше залежить від зміни біомеханічних характеристик скорочення.

Висновки

Факторний аналіз дав можливість виокремити два фактори, які впливають на власну скоротливу здатність м'язу в щурів із гострою ішемією м'язів гомілки.

1) Перший фактор навантажують змінні, які характеризують біомеханічні властивості скорочення м'язу (F_{tet} , TP, FuI, CT_{tet} , HRT_{tet} , F_{tet} / CT_{tet} і F_{tet} / HRT_{tet}), що найбільше впливають на його власну скоротливу здатність у тварин з гострою ішемією тазових кінцівок.

2) Другий фактор пов'язаний із низькочастотною м'язовою втомою (FI) і може розглядатись другорядним. Тому подальші наукові пошуки будуть зосереджені саме на аналізі змін біомеханічних характеристик скорочення *ex vivo* ішемізованого м'язу.

Список використаної літератури

1. Baril D. T. Outcomes of lower extremity bypass performed for acute limb ischemia / D. T. Baril, V. I. Patel, D. R. Judelson [et al] // J. Vasc. Surg. – 2013. – Vol. 58, № 4. – P. 949–956.
2. Cairns S. P. Changes of surface and t-tubular membrane excitability during fatigue with repeated tetani in isolated mouse fast- and slow-twitch muscle / S. P. Cairns, A. J. Taberner, D. S. Loiselle // Journal of Applied Physiology. – 2009. – Vol. 106, № 1. – P. 101–112.
3. Cheng A. J. Fatigue-induced reductions of torque and shortening velocity are muscle dependent / A. J. Cheng, C. L. Rice // Med. Sci. Sports Exerc. – 2010. – Vol. 42, № 9. – P. 1651–1659.
4. Creager M. A. Acute limb ischemia / M. A. Creager, J. A. Kaufman, M. S. Conte // N. J. Med. – 2012. – Vol. 366, № 23. – P. 2198–2206.
5. Earnshaw J. Acute ischaemia: Evaluation and decision making / J. Cronenwett, K. Wayne eds. – Rutherford's Vascular Surgery. – 7th ed. – Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2010. – P. 2389–2398.
6. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe: Strasbourg. – 1986. – № 123. – 52 p.
7. Hakim C. H. Evaluation of muscle function of the extensor digitorum longus muscle *ex vivo* and tibialis anterior muscle *in situ* in mice / C. H. Hakim, N. B. Wasala, D. Duan // J. Vis. Exp. – 2013. – Vol. 72. – e 50183.
8. Hill A.V. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle / A. V. Hill // Proc. R. Soc. Lond. B. – 1938. – Vol. 126. – P. 136–195.
9. Huxley H. E. Structural changes in muscle during contraction / H. E. Huxley, J. Hanson // Nature. – 1954. – Vol. 173. – P. 971–973.
10. Huxley H. E. Changes in the cross-striations of muscle during contractions and stretch and their structural interpretation / H. E. Huxley, J. Hanson // Nature. – 1954. – Vol. 173. – P. 973–976.
11. Kashyap V. S. Endo-vascular therapy for acute limb ischemia / V. S. Kashyap, R. Gilani, J. F. Bena [et al] // Journal of vascular surgery. – 2011. – Vol. 53, № 2. – P. 340–346.

12. Koren K. Differences between skeletal muscle contractile parameters estimated from transversal tensiomyographic and longitudinal torque twitch response / K. Koren, B. Šimunič, E. Rejc [et al] // *Kinesiology*. – 2015. – Vol. 47, № 1. – P. 19–26.
13. Lyden S. P. Endovascular treatment of acute limb ischemia: review of current plasminogen activators and mechanical thrombectomy devices / S. P. Lyden // *Perspectives I vascular surgery and endovascular therapy*. – 2010. – Vol. 22, № 4. – P. 219–222.
14. Macintosh B. R. Skeletal muscle fatigue regulation of excitation-contraction coupling to avoid metabolic catastrophe / B. R. Macintosh, R. J. Holash, J. M. Renaud // *J. Cell Sci*. – 2012. – Vol. 125, Pt 9. – P. 2105–2114.
15. Naidoo N. G. Acute lower extremity ischaemia / N. G. Naidoo, P. S. Rautenbach, D. Kahn // *CME*. – 2013. – Vol. 31, № 6. – P. 201–205.
16. Park K. H. Ex vivo assessment of contractility, fatigability and alternans in isolated skeletal muscles / K. H. Park, L. Brotto, O. Lehoang [et al] // *J. Vis. Exp*. – 2012. – Vol. 69. – e 4198.
17. Tang G. L. The effect of gradual or acute arterial occlusion on skeletal muscle blood flow, arteriogenesis, and inflammation in rat hind limb ischemia / G. L. Tang, D. S. Chang, R. Sarkar [et al] // *J. Vasc. Surg*. – 2005. – Vol. 41, № 2. – P. 312–320.
18. Yue Hong Y. Studies on biomechanics of skeletal muscle based on the working mechanism of myosin motors: An overview / Y. Yue Hong, G. Zhao, C. Xing [et al] // *Chinese science bulletin*. – 2012. – Vol. 57, № 35. – P. 4533–4544.

Стаття надійшла до редакції 29.03.2016

А. А. Мельничук, С. Е. Швайко,

Восточноевропейский национальный университет имени Леси Украинки,
кафедра физиологии человека и животных,
ул. Потапова, 9, Луцк, 43025, Украина, e-mail: olexiy melnychuk@gmail.com.

ФАКТОРНАЯ СТРУКТУРА ПАРАМЕТРОВ ИЗОМЕТРИЧЕСКОГО СОКРАЩЕНИЯ *EX VIVO* МЫШЦЫ *GASTROCNEMIUS MEDIALIS* У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС С ОСТРОЙ ИШЕМИЕЙ ТАЗОВЫХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Резюме

Применением методов анализа главных компонент, ортогонального вращения факторов в двухмерном пространстве варимакс и критерия каменистой осыпи было выявлено два фактора, которые влияют на собственную сократительную способность мышцы в изометрическом режиме у крыс с острой ишемией голени (1, 3 и 6 ч), воспроизводимой методом компрессионной окклюзии артерии *femoralis*. Тетаническое сокращение мышцы регистрировалось тензометрическим методом в течение 60 мин при ее раздражении через параллельные электроды стимулятора прямоугольными импульсами (напряжение – 2 В, длительность – 0.2 мс, частота – 50 Гц), которые были сформированы в 12 циклических стимулирующих паттернов длительностью 3 с и периодом 5 мин. Выяснено, что первый фактор нагружают переменные, которые характеризуют биомеханические свойства мышечного сокращения, а второй – индекс мышечной усталости. Сделан вывод о зависимости собственной сократительной способности ишемизированной мышцы от переменных первого фактора и влияния усталости, как второстепенной.

Ключевые слова: острая ишемия; мышцы; изометрическое сокращение; *gastrocnemius medialis*.

O. A. Melnychuk, S. Ye. Shvaiko,

Lessia Ukrainka Eastern European National University, Department of Human and Animal Physiology

9, Potapov str, Lutsk, 43025, Ukraine. e-mail: olexiymelnynchuk@gmail.com.

FACTOR STRUCTURE OF PARAMETERS OF *EX VIVO* MUSCLE *GASTROCNEMIUS MEDIALIS* ISOMETRIC CONTRACTION IN LABORATORY RATS WITH ACUTE PELVIC LIMB ISCHEMIA

Abstract

Two factors that affect the own muscle contractile ability in isometric mode in rats with acute limb ischemia (1, 3 and 6 h), reproduced by compression of artery *femoralis* occlusion, were found by the application of method of analysis of the principal components, method of orthogonal rotation of factors in two-dimensional space varimax and scree plot criterion. Tetanic contraction of the muscle was recorded by the strain gauge method for 60 minutes. The muscle was irritated through rectangular pulses (voltage 2 V, 0.2 ms duration, frequency 50 Hz), which were formed in 12 cyclical stimulus patterns 3 sec duration and 5 min period. It was found that the first factor was loaded by variables that characterize the biomechanical muscle contraction properties: muscle strength, the time to peak tension, fusion index, muscle contraction and half-relaxation time, muscle strength increase during tetanic contraction and its reduction during tetanic half-relaxation, and the second factor – muscle fatigue index. The conclusion about the dependence of own ischemic muscle contractile ability in rats on variables of the first factor and influence of fatigue as a secondary factor was made.

Key words: acute ischemia; isometric muscle contraction; muscle contraction parameters; muscle *gastrocnemius medialis*

References

1. Baril DT, Patel VI, Judelson DR, Goodney PP, McPhee JT, Hevelone ND, Cronenwett JL, Schanzer A (2013) Outcomes of lower extremity bypass performed for acute limb ischemia, *J Vasc Surg*, 58 (4), pp 949-956.
2. Cairns SP, Taberner AJ, Loiselle DS. (2009). Changes of surface and t-tubular membrane excitability during fatigue with repeated tetani in isolated mouse fast- and slow-twitch muscle, *Journal of Applied Physiology*, 106 (1), pp. 101-112.
3. Cheng AJ, Rice CL (2010) Fatigue-induced reductions of torque and shortening velocity are muscle dependent, *Med Sci Sports Exerc*, 42 (9). pp 1651-1659.
4. Creager MA, Kaufman JA, Conte MS (2012) Acute limb ischemia, *NJ Med*, 366, pp. 2198-2206.
5. Earnshaw J (2010) Acute ischaemia: Evaluation and decision making. In: Cronenwett J, Wayne K Rutherford's *Vascular Surgery*. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier pp 2389-2398.
6. Council of Europe (1986) European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes. Available: <http://m.likumi.lv/doc.php?id=212329>. Last accessed 29 March 2016.
7. Hakim CH, Wasala NB, Duan D (2013) Evaluation of muscle function of the extensor digitorum longus muscle *ex vivo* and tibialis anterior muscle *in situ* in mice, *J Vis Exp*, 72, e 50183.
8. Hill AV (1938) The heat of shortening and the dynamic constants of muscle, *Proc R Soc Lond B*, 126, pp 136-195.
9. Huxley HE, Hanson J (1954) Structural changes in muscle during contraction. *Nature*, 173, pp 971-973.
10. Huxley HE, Hanson J (1954) Changes in the cross-striations of muscle during contractions and stretch and their structural interpretation, *Nature*, 173, pp 973-976.
11. Kashyap VS, Gilani R, Bena JF, Bannazadeh M, Sarac TP (2011) Endo-vascular therapy for acute limb ischemia. *Journal of vascular surgery*, 53 (2), pp 340-346.

12. Koren K, Šimunič B, Rejc E, Lazzer S, Pišot R (2015) Differences between skeletal muscle contractile parameters estimated from transversal tensiomyographic and longitudinal torque twitch response, *Kinesiology*, 47 (1), pp 19-26.
13. Lyden SP (2010) Endovascular treatment of acute limb ischemia: review of current plasminogen activators and mechanical thrombectomy devices, *Perspectives I vascular surgery and endovascular therapy*, 22 (4), pp 219-222.
14. Macintosh BR, Holash RJ, Renaud JM (2012) Skeletal muscle fatigue regulation of excitation-contraction coupling to avoid metabolic catastrophe. *J Cell Sci*, 125 (Pt 9), pp 2105-2114.
15. Naidoo NG, Rautenbach PS, Kahn D (2013) Acute lower extremity ischaemia. *CME*, 31(6), pp 201-205.
16. Park KH, Brotto L, Lehoang O, Brotto M, Ma J, Zhao X (2012) Ex vivo assessment of contractility, fatigability and alternans in isolated skeletal muscles, *J Vis Exp*, 69, e 4198.
17. Tang GL, Chang DS, Sarkar R, Wang R, Messina LM (2005) The effect of gradual or acute arterial occlusion on skeletal muscle blood flow, arteriogenesis, and inflammation in rat hindlimb ischemia, *J Vasc Surg*, 41 (2), pp 312 – 320.
18. Yue Hong Y, Zhao G, Xing C, Yuan Jine F (2012) Studies on biomechanics of skeletal muscle based on the working mechanism of myosin motors: An overview, *Chinese science bulletin*, 57 (35), pp 4533-4544.