

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.832:612.833.92

ВОЗБУДИМОСТЬ ДВИГАТЕЛЬНЫХ ЦЕНТРОВ ИКРОНОЖНОЙ МЫШЦЫ У КРЫС С ТРАВМОЙ СПИННОГО МОЗГА

Т.В. Балтина, Л.М. Нуреева, Г.Г. Яфарова, А.А. Еремеев

Аннотация

В статье представлены результаты исследования рефлекторной возбудимости двигательных центров икроножной мышцы крысы в течение 35 дней после травмы спинного мозга. Анализировали изменение амплитуды рефлекторного ответа икроножной мышцы при стимуляции седалищного нерва (Н-рефлекс), а также отношение максимальных амплитуд рефлекторного и моторного ответов. Травма спинного мозга привела к увеличению рефлекторной возбудимости двигательных центров. Для выяснения механизмов такого повышения использовали ритмическую стимуляцию седалищного нерва с различным межстимульным интервалом и различной интенсивности. Было показано, что увеличение амплитуды Н-рефлекса происходит при электрической стимуляции нерва с интервалом ≤ 3 с. Такое увеличение, как предполагается, связано с генерацией плато-потенциала в мотонейронах и/или интернейронах спинного мозга.

Ключевые слова: возбудимость двигательных центров, плато-потенциал, травма спинного мозга.

Введение

Согласно нейрональной теории генеза повреждения вещества спинного мозга при травме [1], основными повреждающими факторами являются множественные патобиохимические процессы, причина возникновения которых – изменение функций нейронов, обусловленное повреждением клеточных мембран.

Существует ряд электрофизиологических методов оценки нарушений функций спинного мозга и степени их восстановления. В нашей лаборатории используется метод тестирования рефлекторных ответов, определяется состояние нисходящих и восходящих спинномозговых путей, а также влияние этих путей на нейронный аппарат спинного мозга. Модели на животных широко используются для изучения патофизиологии, а также для выбора стратегии лечения повреждений центральной нервной системы. В литературе [2, 3] описаны данные, подтверждающие то, что крыса может быть использована как адекватная модель для исследования функциональных и морфофизиологических преобразований, происходящих в спинном мозге после травмы.

После восстановления от спинального шока раздражение различных афферентов нижних конечностей (неболевых, болевых кожных окончаний или/и

мышечных афферентов) может вызывать длительный координированный паттерн сокращения стопы и голени, подобный сгибательному рефлексу отдергивания [4]. Так, в экспериментах, выполненных на децеребрированных кошках, показано, что повышенная возбудимость интернейронов спинного мозга после полной или частичной его перерезки приводит к переходу от ригидности к облегчению сгибательного рефлекса [5, 6]. Формирование плато-потенциала в спинальных нейронах – один из возможных механизмов увеличения возбудимости интернейронов после травмы спинного мозга. Так, исследования на хронически спинализованной взрослой крысе показали, что плато-потенциал может возникать в мотонейронах без экзогенных модуляторов [7] и оказывать влияние на формирование двигательной спастичности [8]. Через месяц после спинализации наблюдается гиперрефлексивное состояние хвоста, характеризующееся периодами гипертонуса, разгибательными и сгибательными спазмами, подергиванием при любом раздражении кожных афферентов или растяжении мышцы [9]. Регистрация активности двигательных единиц (ДЕ) при длительном спазме у пациентов с травмой спинного мозга показала изменения в импульсации ДЕ, возможно связанные с формированием плато-потенциала [10]. В настоящей статье приведены результаты исследования роли плато-потенциала в повышении возбудимости спинальных центров мышц задней конечности у крыс с хронической травмой спинного мозга.

1. Материалы и методы исследования

В ходе эксперимента было обследовано 47 лабораторных крыс массой тела 160–240 г. Цель работы позволяла использовать нелинейных животных, свободно предоставленных вивариумом Научно-исследовательского центра Татарстана «Восстановительная травматология и ортопедия».

Под эфирным наркозом осуществляли перерезку спинного мозга на уровне Th2–Th3. Техника оперативного вмешательства описана нами в статье [11].

С помощью игольчатых электродов регистрировали электрические ответы икроножной мышцы, вызванные раздражением седалищного нерва одиночными прямоугольными импульсами длительностью 0.5 мс с частотой 0.5 имп/мин. В качестве раздражающих также использовали игольчатые электроды, которые вкалывали в область проекции седалищного нерва. Для нанесения стимула, усиления и регистрации ответов применялась экспериментальная установка на базе электромиографа MG-42 фирмы «Медикор». Определяли пороги и максимальные амплитуды рефлекторных (Н-) и моторных (М-) ответов, а также отношение максимальных амплитуд этих ответов (H_{max}/M_{max}). Регистрацию электромиографических показателей проводили через 2 ч и на 7-е, 14-е, 21-е, 35-е сутки после оперативного вмешательства.

На 21-е сутки исследовали изменение амплитуды Н-ответа, при этом использовали интенсивность стимула порядка 0.5, 1, и 1.5 порога возникновения Н-ответа с повтором 5–10 раз с межстимульными интервалами в 0.5, 1, 2, 3, 5 и 20 с.

В контрольной группе (интактные животные) под эфирным наркозом оценивали функциональное состояние двигательных центров спинного мозга аналогичными электромиографическими методами.

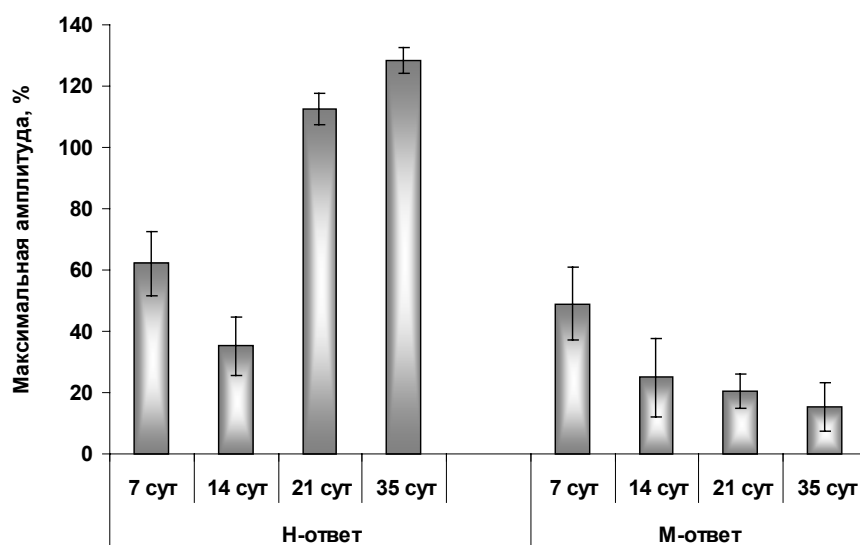


Рис. 1. Изменение амплитуды рефлекторных (Н-) и моторных (М-) ответов икроножной мышцы крысы на различных сроках после спинализации. По оси абсцисс обозначено количество суток после спинализации; по оси ординат – максимальная амплитуда ответов в % по отношению к контролю (интактные животные)

Полученные результаты были обработаны с помощью пакета прикладных программ Origin 5.0 с использованием критерия Стьюдента.

Все процедуры проводились в соответствии с Хельсинской Декларацией 1975 г. и были одобрены комиссией по биоэтике Казанского (Приволжского) федерального университета.

2. Результаты исследования

У всех интактных крыс при стимуляции седалищного нерва регистрировались М- и Н-ответы икроножной мышцы. Порог возникновения М-ответов составил в среднем 1.2 ± 0.1 В, Н-ответов – 1.1 ± 0.1 В; M_{max} и H_{max} – в среднем 9.6 ± 0.2 и 1.5 ± 0.3 мВ соответственно; соотношение H_{max}/M_{max} составило в среднем $15.1 \pm 1.4\%$.

Изменения M_{max} и H_{max} икроножной мышцы крысы после травмы спинного мозга представлены на рис. 1. Как видно из рисунка (колонки справа), M_{max} снижалась. К 35-м суткам амплитуда М-ответа уменьшилась в 5 раз по сравнению с контролем ($p < 0.01$).

H_{max} икроножной мышцы крысы на 7-е сутки после операции уменьшилась на 30% по сравнению с контрольными значениями (рис. 1, колонки слева). На 14-е сутки после оперативного вмешательства наблюдали дальнейшее снижение амплитуды Н-ответа. На 21-е и 35-е сутки было отмечено увеличение амплитуды.

Наблюдаемое снижение амплитуды Н-ответа на 7-е сутки после операции свидетельствует о торможении в рефлекторной дуге моносинаптического рефлекса. В хроническом периоде после спинализации происходит восстановление амплитуды Н-рефлекса, что указывает на облегчение рефлекторной функции.

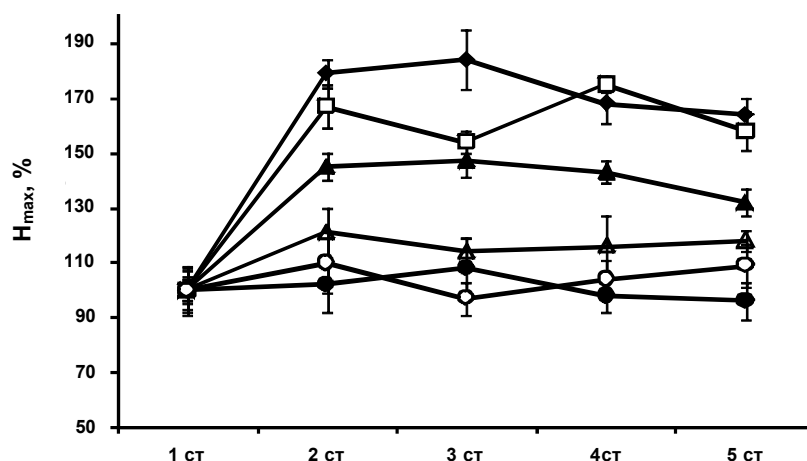


Рис. 2. Изменение амплитуды Н-ответов икроножной мышцы крысы при стимуляции с различными интервалами силой 1.5 порога возникновения Н-ответа на 21-е сутки после спинализации. По оси абсцисс обозначен порядковый номер наносимого стимула; по оси ординат отобразена H_{max} в % по отношению к первому стимулу: заштрихованными квадратами – при межстимульном интервале 0.5 с, светлыми – при 1 с, заштрихованными треугольниками – 2 с, светлыми – 3 с, заштрихованными кругами – 5 с, светлыми – 20 с

Полученные данные коррелируют и с увеличением отношения H_{max}/M_{max} . Так, на всех этапах исследования регистрировали увеличение значения H_{max}/M_{max} , что также свидетельствует об увеличении рефлекторной возбудимости мотонейронов спинальных центров моносинаптического Н-рефлекса.

Регистрировали изменение амплитуды Н-ответа при различных межстимульных интервалах при величине стимула в 1.5 порога (рис. 2). Как видно из рисунка, существенное увеличение амплитуды Н-ответа наблюдалось при межстимульном интервале 0.5 и 1 с, особенно при втором и третьем стимуле. Так, при повторном стимуле амплитуда Н-ответа увеличилась на 79% и 68% по сравнению с одиночной стимуляцией. При стимуляции с более длительными интервалами (от 2 до 3 с) увеличение амплитуды Н-ответа было не столь значительным, как при интервале ≤ 1 с. При интервале 2 и 3 с амплитуда Н-ответа увеличивалась при повторной стимуляции, но при интервале 3–20 с увеличение было недостоверным (рис. 2).

Достоверное увеличение амплитуды Н-ответа (облегчение) было также отмечено при использовании стимулов равных по величине порогу возникновения ответа и меньших. Облегчение рефлекса при равной пороговой величине стимуляции было более выраженным, чем при стимуляции порядка 1.5 порога. Достоверное увеличение амплитуды Н-ответа было также получено для интервалов ≤ 3 с. Ответы на первый стимул обычно отсутствовали при стимуляции величиной ниже пороговой с интервалами более 1 с, но они появлялись как реакция на последующие стимулы. В одном случае регистрировался облегчающий эффект при интервале ≤ 3 с. Однако мы считаем, что для поведения популяции нейронов это является скорее исключением, чем правилом.

3. Обсуждение результатов

Полученные результаты показали, что в остром периоде после травмы спинного мозга наблюдается угнетение рефлекторных ответов. Так, амплитуда Н-ответа через сутки после травмы спинного мозга уменьшилась в 5 раз по сравнению с контролем ($p < 0.05$). В хроническом периоде после травмы спинного мозга происходило увеличение рефлекторной возбудимости спинальных мотонейронов (увеличение амплитуды Н-ответа на рис. 1).

Мышечная атрофия должна была проявиться после травмы спинного мозга снижением амплитуды М-ответов, что, как правило, наблюдается в неиспользуемых мышцах [12]. Уменьшение M_{\max} в наших экспериментах (рис. 1) обусловлено тем, что при тяжелых повреждениях спинного мозга развивается атония, приводящих к параличу конечностей, из-за устранения опорной афферентации [13]. Другим способствующим возникновению паралича фактором является снижение тонуса гамма-волокон за счет уменьшения проприоцептивной активности [14].

Значительное увеличение амплитуды Н-ответа после травмы спинного мозга показывает, что гипоактивность, вызванная травмой, инициирует изменения синаптической эффективности в двигательных центрах. Такое увеличение эффективности передачи сигнала в пресинаптической области Ia-волокон показано у человека после длительного постельного режима [15] или космического полета [16].

Одним из механизмов увеличения эффективности синаптической передачи нейронов двигательных центров может быть формирование плато-потенциала в спинальных нейронах [17, 18]. Настоящее исследование показало формирование облегчения Н-ответов при ритмической стимуляции, что согласуется с результатами, полученными на редуцированных препаратах, где плато-потенциал был непосредственно измерен и оценен. Например, исследования на изолированном спинном мозге крысы показали облегчение Н-ответов у 30% нейронов дорзальных рогов при внутриклеточной стимуляции задних корешков с частотой 0.4–1.0 Гц [19]. Облегчение в этих межстимульных интервалах было аналогичным и для нейронов черепахи [20], и для мотонейронов кошки [21] и не изменялось при блокаде NMDA-рецепторов [22]. При исследовании сгибательного рефлекса на интактных 3-недельных крысах [23] было установлено, что введение нифедипина приводит к снижению облегчения на 90% без изменения 1-го ответа. В этой работе отмечена ведущая роль нифедипинзависимого плато-потенциала в формировании облегчения ответов мышц при повторной стимуляции с интервалом в 3 с, что продемонстрировано и в нашем исследовании.

Таким образом, наши результаты показали, что в хроническом периоде после травмы спинного мозга увеличивается рефлекторная возбудимость двигательных спинальных центров. При электрической стимуляции седалищного нерва с интервалом ≤ 3 с происходит изменение эффективности синаптической передачи в нейронах спинного мозга. Наблюдаемое увеличение рефлекторной возбудимости и эффективности синаптической передачи предположительно связано с формированием плато-потенциала в мотонейронах и/или интернейронах спинного мозга.

Исследование поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 07-04-00795).

Summary

T.V. Baltina, L.M. Nureeva, G.G. Yafarova, A.A. Ereemeev. Excitability of the Spinal Centers of Gastrocnemius Muscle of Rats after Spinal Cord Injury.

The research presented was aimed at determining the reflex excitability of motor centers of the rat gastrocnemius muscle during 35 days after spinal cord injury. We analyzed changes in the amplitude of the reflex response of gastrocnemius muscle during stimulation of the sciatic nerve (H-reflex), as well as the ratio of maximum amplitudes of the reflex and motor responses. Injury of the spinal cord led to an increase in reflex excitability of motor centers. To clarify the mechanisms of this increase we applied the repetitive stimulation of the sciatic nerve with various interstimulation intervals and intensity. It was shown that an increase of the H-reflex's amplitude occurred when the interval of electrical stimulation was about 3 seconds. This increase is believed to be linked with the generation of plateau potential in the motor neurons and/or interneurons of the spinal cord.

Key words: excitability of the motor centers, plateau potential, spinal cord injury.

Литература

1. *Kobrine A.I.* The neuronal theory of experimental traumatic spinal cord disfunction // *Surg. Neurol.* – 1975. – V. 3, No 5. – P. 261–264.
2. *Metz G.A., Curt A., Van de Munt H., Klusman I., Schwab M.E., Dietz V.* Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury // *J. Neurotrauma.* – 2000. – V. 17. – P. 1–17.
3. *Onifer S.M., Rabchevsky A.G., Scheff S.W.* Rat Models of Traumatic Spinal Cord Injury to Assess Motor Recovery // *ILAR J.* – 2007. – V. 48. – P. 385–395.
4. *Schmit B.D., McKenna-Cole A., Rymer W.Z.* Flexor reflexes in chronic spinal cord injury triggered by imposed ankle rotation // *Muscle Nerve.* – 2000. – V. 23. – P. 793–803.
5. *Burke D., Knowles L., Andrews C., Ashby P.* Spasticity, decerebrate rigidity and the clasp-knife phenomenon: a experimental study in the cat // *Brain.* – 1972. – V. 95. – P. 31–48.
6. *Rymer W.Z., Houk J.C., Crago P.E.* Mechanisms of the clasp-knife reflex studied in an animal model // *Exp. Brain. Res.* – 1979. – V. 37. – P. 93–113.
7. *Bennett D.J., Li Y., Siu M.* Plateau potentials in sacrocaudal motoneurons of chronic spinal rats, recorded in vitro // *J. Neurophysiol.* – 2001. – V. 86. – P. 1955–1971.
8. *Bennett D.J., Li Y., Harvey P.J., Gorassini M.* Evidence for plateau potentials in tail motoneurons of awake chronic spinal rats with spasticity // *J. Neurophysiol.* – 2001. – V. 86, No 4. – P. 1972–1982.
9. *Engberg I., Lundberg A., Ryall R.W.* Reticulospinal inhibition of transmission in reflex pathways // *J. Physiol.* – 1968. – V. 194. – P. 201–223.
10. *Heckman C.J.* Alterations in synaptic input to motoneurons during partial spinal cord injury // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 1994. – V. 26. – P. 1480–1490.
11. *Нуреева Л.М., Яфарова Г.Г., Балтина Т.В.* Возбудимость спинальных мотонейронов после травмы позвоночника и спинного мозга // *Невролог. вестн.* – 2009. – Т. XLI, Вып. 2. – С. 38–43.
12. *Duchateau J., Hainaut K.* Effects of immobilization on contractile properties recruitment and firing rates of human motor units // *J. Physiol.* – 1990. – V. 422. – P. 55–65.
13. *Kozlovskaya I., Dmitrieva I., Grigorieva L., Kirenskaya A., Kreydich Yu.* Gravitational mechanisms in the motor sistem. Studies in real and simulated weightlessness // *Stance and Motion. Facts and Concepts / Eds. V.S. Gurfinkel, M.Ye. Ioffe, J. Massion.* – N. Y.: Plenum, 1988. – P. 37–48.

14. Григорьев А.И., Козловская И.Б., Шенкман Б.С. Роль опорной афферентации в организации тонической мышечной системы // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2004. – Т. 90, № 5. – С. 508–521.
15. Duchateau J. Bed-rest induces neural and contractile adaptations in triceps surae // Med. Sci. Sports Exerc. – 1995. – V. 27. – P. 1581–1589.
16. Ruegg D.G., Kakebeeke T.H., Studer L.M. Activation of muscles and microgravity // Int. J. Sports Med. – 1997. – V. 18. – P. 329–331.
17. Bennett D.J., Gorassini M.A., Fouad K., Sanelli L., Han Y., Cheng J. Spasticity in rats with sacral spinal cord injury // J. Neurotrauma. – 1999. – V. 16. – P. 69–84.
18. Gorassini M., Yang J.F., Siu M., Bennett D.J. Intrinsic activation of human motoneurons: possible contribution to motor unit excitation // J. Neurophysiol. – 2002. – V. 87, No 4. – P. 1850–1858.
19. Morisset V., Nagy F. Nociceptive integration in the rat spinal cord: role of non-linear membrane properties of deep dorsal horn neurons // Eur. J. Neurosci. – 1998. – V. 10. – P. 3642–3652.
20. Svirskis G., Hounsgaard J. Depolarization-induced facilitation of a plateau-generating current in ventral horn neurons in the turtle spinal cord // J. Neurophysiol. – 1997. – V. 78. – P. 1740–1742.
21. Bennett D.J., Hultborn H., Fedirchuk B., Gorassini M.A. Short-term plasticity in hind-limb motoneurons of decerebrate cats // J. Neurophysiol. – 1998. – V. 80. – P. 2038–2045.
22. Morisset V., Nagy F. Plateau potential-dependent windup of the response to primary afferent stimuli in rat dorsal horn neurons // Eur. J. Neurosci. – 2000. – V. 12. – P. 3087–3095.
23. Hornby T.G., Rymer W.Z., Benz E.N., Schmit B.D. Windup of Flexion reflexes in Chronic Human Spinal Cord Injury: A Marker for Neuronal Plateau Potentials? // J. Neurophysiol. – 2003. – V. 89. – P. 416–426.

Поступила в редакцию
06.07.09

Балтина Татьяна Валерьевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: Tanusha.Baltina@mail.ru

Нуреева Луиза Махмудовна – студент кафедры физиологии человека и животных Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: Luika87@rambler.ru

Яфарова Гузель Гулюсовна – кандидат биологических наук, ассистент кафедры физиологии человека и животных Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: Gusadila@mail.ru

Еремеев Антон Александрович – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: 2anton.eremeev@mail.ru