



Удлинение голени экспериментальных животных методом дистракционного остеосинтеза как модель развития тонического защитного рефлекса

М.С. Сайфутдинов

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава РФ, Курган

Контактная информация: д.б.н. Сайфутдинов Марат Саматович, maratsaif@yandex.ru

Современные технологии восстановительной медицины не учитывают наличие и интенсивность защитного тонического рефлекса, возникающего в ответ на травму. В качестве модели механизмов его взаимодействия может использоваться дистракционный остеосинтез. Цель работы – анализ динамики биоэлектрической активности покоя мышц удлиняемой методом дистракционного остеосинтеза голени экспериментальных животных как электрофизиологического маркера тонического защитного рефлекса. Удлинение голени собак вызывает появление в электромиограмме покоя мышц спонтанных фибрилляторных и фасцикуляторных потенциалов, интенсивность которых меняется с течением времени в зависимости от стадии дистракционного остеосинтеза и отражает интенсивность процессов перестройки структуры двигательных единиц и их вовлечение в тонический защитный рефлекс.

Ключевые слова: электромиография, двигательные единицы, защитный тонический рефлекс, дистракционный остеосинтез.

Введение

Тонический защитный рефлекс, возникающий как реакция сенсомоторной системы на травму и хирургическую агрессию, безусловно, должен учитываться при проведении реабилитационных мероприятий. Однако данный феномен не учитывается лечащими врачами. Его наличие и влияние на процесс лечения не обсуждается в специальной литературе. Необходимо исследовать взаимодействие защитных рефлексов с факторами патогенеза и лечебными воздействиями на организм. Наиболее перспективной

базовой моделью для этого может служить удлинение голени экспериментальных животных методом дистракционного остеосинтеза, поскольку после оперативного вмешательства сохраняется пролонгированный очаг повышенной активности тканевых рецепторов, поддерживающий тонический защитный рефлекс длительное время. При этом интенсивностью проприоцептивного афферентного потока можно управлять, меняя заданным образом интенсивность растяжения тканей с помощью дистракционного аппарата.

Опубликованные ранее результаты совместного электрофизиологического и морфологического исследования мышц удлиняемой конечности экспериментальных животных показали, что интенсивные реактивные изменения в мышечных веретёнах под влиянием длительного дозированного растяжения ограничивают их возможное участие в генерации повышенного уровня спонтанной активности α -мотонейронов [8], наблюдаемой в период дистракции и фиксации. Остаётся неясным механизм развития повышенной тонической активности медленных двигательных единиц: сводится ли он к одному физиологическому процессу – тоническому защитному рефлексу, либо имеется множество разных, скрытых от внешнего наблюдателя, феноменов.

В связи с вышесказанным, **целью** настоящей работы является анализ динамики биоэлектрической активности покоя мышц удлиняемой методом дистракционного остеосинтеза голени экспериментальных животных как электрофизиологического маркера тонического защитного рефлекса.

Материалы и методы

Исследование проведено на 26-ти взрослых (1-3 года) беспородных собаках, которым на голень накладывали аппарат Илизарова. Контралатеральная голень оставалась контрольной. У всех животных осуществлялась закрытая флекссионная остеоклазия берцовых костей в средней трети диафиза (26 оперативных вмешательств), и через 5 дней после операции производилась дистракция костных фрагментов с темпом 1 мм в сутки за 4 приёма в течение 28-35 суток. После чего осуществлялась фиксация

костных фрагментов в течение 1-3 мес. Животных оперировал д.м.н. С.А. Ерофеев. Электромиографические (ЭМГ) обследования экспериментальных животных проводились в предоперационном периоде, в конце периода дистракции (на 14-е, 28-е, 35-е сутки), раз в 30 дней в течение фиксации и через 30 дней после снятия дистракционного аппарата. С помощью цифровой ЭМГ-системы «DISA-1500» (DANTEC, Дания) регистрировали биоэлектрическую активность *m. tibialis anterior* и *m. gastrocnemius* оперированной и контралатеральной голени в покое по общепринятой методике [5] при биполярном игольчатом отведении (стандартный электрод 13K13). Всего проведено 97 ЭМГ-обследований.

Оценивали наличие в ЭМГ покоя различных видов спонтанной активности, интенсивность (единичные, множественные потенциалы) и устойчивость (скорость затухания) их проявления. Если зафиксированный вид спонтанной активности сохранял постоянную интенсивность в течение десяти сек, то он считался незатухающим. Постепенное его угасание квалифицировалось как медленное затухание, а полное исчезновение после введения игольчатого электрода – как быстрое затухание. Рассчитывали частоту встречаемости (n/N) каждого из выявленных типов активности как отношение числа наблюдений данного паттерна (n) к объёму выборки в очередной контрольный срок эксперимента (N). Частота встречаемости является фактически его долей (p), для которой рассчитывали ошибку (s_p) и дисперсию (D_p):

$$s_p = \sqrt{D_p}; \quad D_p = \frac{p(1-p)}{N}$$

Значимость разности долей между разными сроками тестирования оценивали с помощью z-критерия разности долей. Математическая обработка полученных данных проводилась с помощью программного комплекса Microsoft Excel 2010 и интегрированного с ним пакета анализа данных Attestat [2].

ЭМГ-обследования проводились под внутривенным барбитуровым наркозом с соблюдением принятых в подобных случаях правил и норм. Содержание животных и оперативные вмешательства осуществляли в соответствии с Федеральным законом «О защите животных от жестокого обращения», принятым Государственной Думой РФ 01.12.1999 г. и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей [4].

Результаты тестирования мышц в предоперационном обследовании и контралатеральной голени рассматривались как контрольные, для учёта возможного влияния наркоза на фоновую биоэлектрическую активность.

Результаты исследований

В предоперационном обследовании проявлений спонтанной ЭМГ-активности в мышцах голени справа и слева не зарегистрировано, что соответствует норме. После наложения дистракционного аппарата и 14-ти дней дистракции во всех наблюдениях регистрировались одно-, двухфазные биопотенциалы короткой длительности (1-3 мс), сопровождающиеся при звуковой индикации характерным шумовым эффектом в виде серии высокочастотных щелчков, напоминающих

«тонкий хруст целлофана» или «стук дождя по железной крыше» – потенциалы фибрилляции (ПФ). А также повторяющиеся на электрограммах двух-, трёх- и полифазные биопотенциалы с длительностью, варьирующей в пределах широкого диапазона, соответствующего потенциалам действия (ПД) двигательных единиц (ДЕ). Они сопровождалась характерным ритмичным постукиванием и идентифицировались нами как потенциалы фасцикуляции (ПФК). Спонтанная биоэлектрическая активность тестируемых мышц удлиняемой голени состояла из обоих видов потенциалов высокой интенсивности. Регистрировались множественные медленно затухающие и незатухающие ПФ в сочетании с преимущественно быстро затухающими ПФК. Незатухающие и медленно затухающие ПФК были представлены значительно меньше (табл. 1, 2). Степень выраженности отдельных составляющих биоэлектрического фона была крайне неравномерной и широко варьировала у разных животных.

На 28-й день дистракции спонтанная биоэлектрическая активность мышц удлиняемой голени имела высокую интенсивность. Регистрировались множественные незатухающие ПФ в сочетании с незатухающими или медленно затухающими ПФК (рис. А). Незатухающие ПФ преобладали над медленно затухающими на фоне сокращения частоты встречаемости быстро затухающих ПФК, доля которых снижалась статистически значимо ($p < 0,05$) за счёт увеличения преимущественно доли медленно затухающих фасцикуляций ($p > 0,05$).

Таблица 1

Частота встречаемости (n/N) потенциалов фибрилляции в мышцах голени экспериментальных животных в процессе её удлинения методом distractionного остеосинтеза

Срок (дни)	Типы активности												
	Быстро затухающие				Медленно затухающие				Незатухающие				
	n	n/N	s	D	n	n/N	s	D	n	n/N	s	D	
<i>m. tibialis anterior</i>													
И	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Д	14	0	0	0	0	3	0,50	0,20	0,04	3	0,50	0,20	0,04
	28	0	0	0	0	8	0,31	0,09	0,01	18	0,69	0,09	0,01
	35	2	0,25	0,15	0,02	4	0,50	0,18	0,03	2	0,25	0,15	0,02
Ф	30	12	0,46	0,10	0,01	9	0,35	0,09	0,01	5	0,19	0,08	0,01
	60	4	0,50	0,18	0,03	3	0,38	0,17	0,03	1	0,13	0,12	0,01
	90	2	0,67	0,27	0,07	1	0,33	0,27	0,07	0	0	0	0
П	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>m. gastrocnemius</i>													
И	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Д	14	0	0	0	0	3	0,50	0,20	0,04	3	0,50	0,20	0,04
	28	0	0	0	0	7	0,27	0,09	0,01	19	0,73	0,09	0,01
	35	2	0,25	0,15	0,02	4	0,50	0,18	0,03	2	0,25	0,15	0,02
Ф	30	12	0,46	0,10	0,01	8	0,31	0,09	0,01	6	0,23	0,08	0,01
	60	4	0,50	0,18	0,03	3	0,38	0,17	0,03	1	0,13	0,12	0,01
	90	2	0,67	0,27	0,07	1	0,33	0,27	0,07	0	0	0	0
П	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Примечание: сроки тестирования (крайний левый столбик): И – исходно, Д – distractionция, Ф – фиксация, П – после снятия аппарата; n – количество наблюдений, s – ошибка доли, D – дисперсия доли. Серым фоном выделены значения частоты встречаемости, статистически значимо (p<0,05) отличающиеся от предыдущего срока тестирования (критерий разности долей).

Таблица 2

Частота встречаемости (n/N) потенциалов фасцикуляции в мышцах голени экспериментальных животных в процессе её удлинения методом distractionного остеосинтеза

Срок (дни)	Типы активности												
	Быстро затухающие				Медленно затухающие				Незатухающие				
	n	n/N	s	D	n	n/N	s	D	n	n/N	s	D	
<i>m. tibialis anterior</i>													
И	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Д	14	4	0,67	0,19	0,04	1	0,17	0,15	0,02	1	0,17	0,15	0,02
	28	6	0,23	0,08	0,01	12	0,46	0,10	0,01	8	0,31	0,09	0,01
	35	1	0,13	0,12	0,01	6	0,75	0,15	0,02	1	0,13	0,12	0,01
Ф	30	3	0,12	0,06	0,01	12	0,46	0,10	0,01	11	0,42	0,10	0,01
	60	4	0,50	0,18	0,03	3	0,38	0,17	0,03	1	0,13	0,12	0,01
	90	2	0,67	0,27	0,07	1	0,33	0,27	0,07	0	0	0	0
П	30	6	0,30	0,10	0,01	2	0,10	0,07	0,01	0	0	0	0
<i>m. gastrocnemius</i>													
И	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Д	14	4	0,67	0,19	0,04	1	0,17	0,15	0,02	1	0,17	0,15	0,02
	28	3	0,12	0,06	0,01	14	0,54	0,10	0,01	9	0,35	0,09	0,01
	35	1	0,13	0,12	0,01	6	0,75	0,15	0,02	1	0,13	0,12	0,01
Ф	30	3	0,11	0,06	0,01	13	0,50	0,10	0,01	10	0,38	0,10	0,01
	60	3	0,27	0,13	0,01	2	0,25	0,15	0,02	3	0,27	0,13	0,01
	90	2	0,67	0,27	0,07	1	0,33	0,27	0,07	0	0	0	0
П	30	6	0,3	0,10	0,01	2	0,1	0,06	0,01	0	0	0	0

Примечание: все обозначения – как под табл. 1.

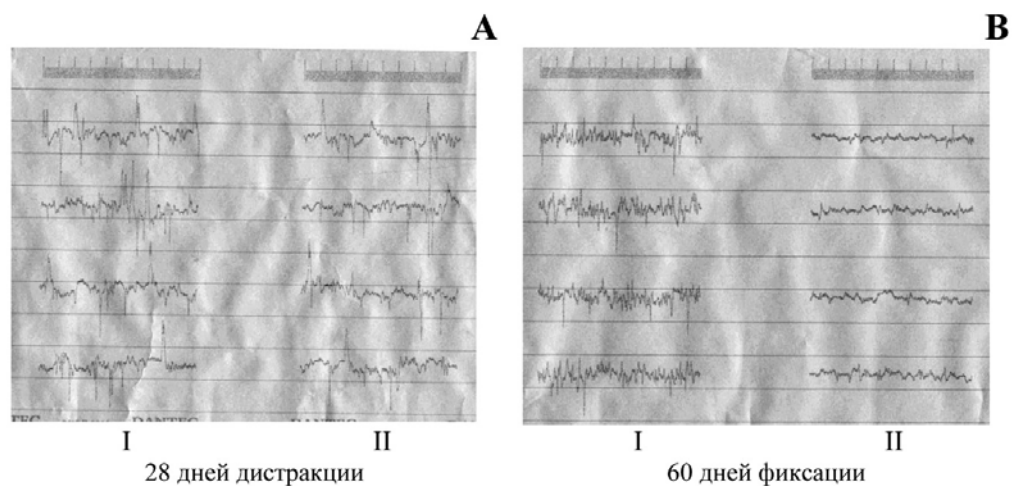


Рис. Изменение интенсивности ЭМГ покоя в момент введения электрода (I) и спустя 10 сек (II). Большое вертикальное деление соответствует 50 мкВ; большое деление на горизонтальной шкале сверху соответствует 10 мс.

На 35-й день distraction появились быстро затухающие ПФ, но по-прежнему преобладали медленно затухающие фибрилляции при сокращении ($p > 0,05$) частоты встречаемости незатухающих ПФ. Среди ПФК также наиболее часто встречались медленно затухающие ПФК. Изменения доли быстро затухающих и незатухающих фасцикуляций по сравнению с предыдущими сроками тестирования статистически не значимы ($p < 0,05$).

В период фиксации наблюдалось постепенное снижение интенсивности ПФ. Это больше заметно на примере незатухающей активности, которая равномерно убывала, и у животных с пролонгированной фиксацией к моменту её окончания полностью исчезала. В то время как частота встречаемости медленно и быстро затухающих ПФ вначале менялась разнонаправлено, и к концу фиксации быстро затухающие ПФ (рис. В) встречались даже чаще, чем в период distraction.

Перед демонтажом distractionного аппарата ПФ и ПФК наблюдались в виде единичных всплесков спонтанной активности.

Высокая интенсивность фибрилляторной составляющей ЭМГ покоя чаще всего сочеталась с наличием множественных незатухающих ПФК. Уменьшение количества ПФ и увеличение скорости их затухания сопровождалось снижением интенсивности ПФК. Однако в этом случае взаимосвязь прослеживалась менее жёстко. При незначительной выраженности денервационной активности могли наблюдаться ПФК разной интенсивности, но при выраженных ПФ на электрограммах всегда присутствовали множественные незатухающие или медленно затухающие ПФК. Данное обстоятельство позволяет предположить, что возникновение ПФК при удлинении конечностей может иметь несколько причин.

Через 30 дней после демонтажа distractionного аппарата ПФ не были зарегистрированы ни в одном наблюдении. В небольшом количестве наблюдений отмечалось появление ПФК при введении игольчатого электрода, но они быстро затухали. Очень редко имела место медленно затухающая активность. Однако во всех случаях при длительном наблюдении её исчезновение было полным, т.е. фактором, активирующим генерацию ПФК, являлось воздействие на мышцу при введении игольчатого электрода.

На протяжении всего эксперимента в мышцах контралатеральной голени не было зарегистрировано никаких проявлений спонтанной биоэлектрической активности.

Обсуждение результатов

Отсутствие ПФК в тестируемых мышцах в предоперационных обследованиях и на контралатеральной конечности исключало возникновение фасцикуляций под влиянием наркоза ни при первом его применении, ни вследствие кумулятивного эффекта.

Процессы, порождающие ПФ, хорошо описаны в литературе, в т.ч. при distractionции [9], в работах, выполненных совместно физиологами и морфологами [8]. Можно выделить два источника данного вида спонтанной активности: мышечные волокна, потерявшие контакт с иннервировавшим их α -мотонейроном, и новообразованные мышечные волокна [10], не успевшие такой контакт установить. Наличие ПФ и динамика их интенсивности отражает структурную перестройку периферической части ДЕ под влиянием длительного дозированного растяжения.

Относительно происхождения ПФК в мышцах на фоне удлинения конечности

имеется ряд предположений, которые анализировались нами в предыдущей работе [8]. Интенсивное вовлечение мышечных веретён [8], толстых миелинизированных волокон [1] и сенсорных нейронов [7] в реактивно-репаративные процессы под воздействием длительного дозированного растяжения минимизирует их участие в механизмах генерации ПФК. Нам представляется наиболее вероятным рассматривать данный вид спонтанной активности в условиях удлинения конечности как результат проявления тонического защитного рефлекса [3]. Его спинальный генератор активируется вследствие одновременной интенсификации активности тканевых рецепторов в зоне наложения distractionного аппарата и снижения проприоцептивной импульсации в лемнисковой подсистеме соматосенсорного анализатора, на что косвенно указывают изменения параметров соматосенсорных вызванных потенциалов [6].

Защитный тонический рефлекс, наряду с активацией небольшого количества медленных ДЕ, включает торможение значительной части быстрых α -мотонейронов спинальных моторных центров соответствующих мышц в области вмешательства. Амплитуда ЭМГ покоя подвергнутых растяжению мышц в эти сроки является результатом суммации асинхронных разрядов небольшой части медленных ДЕ.

В период фиксации между интенсивностью ПФ и ПФК имеет место обратное взаимоотношение. Наблюдаемое постепенное снижение интенсивности ПФ у экспериментальных животных и частичное их замещение множественными ПФК связано с восстановлением значительной части нервно-мышечных контактов.

Полное исчезновение ПФК после снятия дистракционного аппарата свидетельствует в пользу их рефлекторного происхождения, поскольку в это время снижается интенсивность воздействия альтерирующих факторов на ткани удлинённого сегмента конечности. В связи с этим исчезает повышенная интероцептивная афферентация и прекращается действие тонического защитного рефлекса.

Динамика изменений спонтанной биоэлектрической активности, наблюдаемая у экспериментальных животных, совпадает с картиной ЭМГ покоя у больных при удлинении конечностей в клинике.

Выводы

1. Под воздействием длительного дозированного растяжения в мышцах удлиняемого сегмента конечности экспериментальных животных повышается интенсивность спонтанной биоэлектрической активности.

2. Электромиограмма покоя мышц удлиняемой голени экспериментальных животных содержит биопотенциалы различного генеза, интенсивность генерации которых изменяется в зависимости от стадии дистракционного остеосинтеза.

3. Компоненты спонтанной активности, имеющие периферическое происхождение, отражают процесс перестройки структуры периферической части двигательных единиц под воздействием длительного дозированного растяжения. Биопотенциалы, отражающие фоновую активность α -мотонейронов, связаны с механизмами тонического защитного рефлекса.

Список литературы

1. *Варсегова Т.Н., Щудло Н.А., Щудло М.М., Еманов А.А.* Изменения поверхностного малоберцового нерва в зависимости от частоты высокодетальной автодистракции при ортопедическом удлинении голени у собак с суточным темпом 3 мм // Морфология. 2015. Т. 148. № 5. С. 43-47.
2. *Гайдышев И.П.* Анализ и обработка данных: специальный справочник. - СПб: Питер. 2001. С. 752.
3. *Ерохин А.Н., Сайфутдинов М.С.* Профилактика гипертракционных нейропатий у больных при дистракционном остеосинтезе // Журнал неврологии и психиатрии им С.С. Корсакова. 2013. № 7. С. 52-54.
4. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. 2003. № 4(7). С. 34-36.
5. *Касаткина Л.Ф., Гильванова О.В.* Электромиографические методы исследования в диагностике нервно-мышечных заболеваний. Игольчатая электромиография. - М.: Медика. 2010. 416 с.
6. *Сайфутдинов М.С., Шейн А.П., Криворучко Г.А.* Соматосенсорная афферентация в условиях дистракционного остеосинтеза // Сенсорные системы. 2013. Т. 27. № 1. С. 68-79.
7. *Сафонова Г.Д.* Структурные изменения нейронов чувствительных узлов спинномозговых нервов при удлинении голени взрослых собак // Морфология. 2011. Т. 139. № 3. С. 35-40.
8. *Шевцов В.И., Сайфутдинов М.С., Чикорина Н.К.* Мышечные веретёна при удлинении конечности: проприорецептивный конфликт или дефицит активности? // Бюлл. экспер. биол. 2008. Т. 146. № 7. С. 114-116.
9. *Шейн А.П., Сайфутдинов М.С., Криворучко Г.А.* Локальные и системные реакции сенсомоторных структур на удлинение и ишемию конечностей. – Курган. 2006. 284 с.
10. *Williams P., Kyberd P., Kenwright J.* The morphological basis of increased stiffness of rabbit tibialis anterior muscles during surgical limb-lengthening // J. of Anatomy. 1998. Vol. 193. No. 1. P. 131-138.

Lengthening of the shin of experimental animals by the method of distraction osteosynthesis as a model of the progress of the tonic protective reflex

M.S. Saifutdinov

Modern technologies of regenerative medicine do not take into account the presence and intensity of the tonic protective reflex that occurs in response to injury. The distraction osteosynthesis can be used as a model of its interaction mechanisms. Objective of research is analysis of the dynamics of spontaneous electrical activity of muscles of the shin of experimental animals, lengthen by the method of distraction osteosynthesis, as the electrophysiological marker of the tonic protective reflex. The dogs shin lengthening causes the appearance of spontaneous fibrillation and fasciculation potentials in the electromyogram of muscles at rest, which intensity changes with time depending on a stage of distraction osteosynthesis and reflects the intensity of motion units restructuring processes and their involvement in the protective tonic reflex.

Key words: electromyography, motion units, protective tonic reflex, distraction osteosynthesis.