



УДК 577.3

© 2007

Д. М. Ноздренко, Ю. І. Прилуцький

Динаміка змін генерації сили та довжини м'язових волокон під впливом рутину

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Д. М. Говоруном)

The changes of dynamic parameters of the contraction of skeletal muscle fibers of m. tibialis Rana temporaria frog in the isotonic condition during the modulated stimulation under the rutin solution action in the concentration range (10^{-5} – 10^{-3}) mol/l are studied in detail.

Флавоноїди відіграють надзвичайно важливе значення у життєдіяльності тваринних організмів: проявляють Р-вітамінну активність, зменшуючи проникність і ламкість капілярів та підвищуючи їх резистентність, володіють антиоксидантними, протипухлинними та антизапальними властивостями [1, 2]. Відомо також, що флавоноїди здатні впливати на функціонування скоротливих систем різних біологічних об'єктів. Зокрема, було показано, що флавоноїдні сполуки можуть брати участь у регуляції діяльності всіх типів м'язів, включаючи гладенькі, скелетні та міокард [3, 4]. Однак участь цих речовин у механізмах регуляції роботи скелетних м'язів дотепер практично не з'ясовано. Серед досліджених на сьогодні флавоноїдних сполук вираженою дією на скоротливий апарат володіє рутин [5, 6]. За хімічною будовою рутин є глікозидом флавонолу — кверцетину (приєднання цукру відбувається у положення 3 гетероциклічного кільця С кверцетину [7]).

У нашій попередній роботі [8] було досліджено динаміку скорочення скелетно-м'язових волокон жаби *Rana temporaria* в умовах використання електростимуляції та розчинів кверцетину. Показано, що кверцетин викликає зменшення силових та рухових відповідей м'язових препаратів концентраційнозалежним способом. Це слугувало підґрунтям для дослідження на тканинному рівні впливу розчинів його глікозиду — рутину на динамічні параметри скорочення під впливом модульованої стимуляції.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на пучках волокон м'язу *m. tibialis anterior* жаби *Rana temporaria*. Нативні волокна виділяли механічним шляхом після декапітації піддослідних тварин. Ізольовані м'язові волокна інкубували протягом 2 год в інтервалі $+(3 \pm 1)$ °С для адаптації до подальших умов експерименту. Фіксацію м'язового препарату здійснювали за допомогою алюмінієвих затискачів, зміцнених нейлоновими лігатурами. Досліджуваний об'єкт розміщали в плексигласовій камері з постійно циркулюючим фізіологічним розчином Рінгера (NaCl 115,5 мМ/л, KCl 2 мМ/л, CaCl₂ 1,8 мМ/л,

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 2 мМ/л, рН 7,0). Один кінець волокна приєднували до ємнісного датчика сили, чутливість якого дорівнює 0,1 г на 1000 мВ. Датчик сили був жорстко зафіксований на мікроманіпуляторі з кроком 0,8 мкм, що дозволяло прикладати зовнішнє навантаження шляхом натягу волокна. Другий кінець препарату жорстко фіксували до датчика довжини. Стимуляцію здійснювали за допомогою двох платинових електродів, розміщених у дослідницькій камері на відстані 4 мм по обидва боки м'язових волокон. Стимуляцію проводили прямокутними імпульсами частотою 30 Гц та тривалістю 3000 мс. Період релаксації становив 2 хв. Стимуляцію задавали з комп'ютера за допомогою генератора імпульсів. Усі досліджувані процеси контролювали візуально через осцилограф і фіксували на комп'ютері. Циркулюючий фізіологічний розчин Рінгера подавали в камеру через систему трубок. За отриманими даними будували криві залежності сили скорочення та зміни довжини м'язового скорочення у результаті дії різних концентрацій хлориду алюмінію.

Результати досліджень. Для зручності опису отриманих результатів та їх адекватного трактування нами був проведений аналіз розподілу динамічної відповіді активного м'язу на окремі часові фази (тривалістю по 500 мс), які відповідають різним функціональним станам процесу скорочення. Силу відповідь м'язу було розділено на три функціональні фази. Фаза F1 — початок силової відповіді м'язу (ця ділянка виникає безпосередньо після дії стимулювального сигналу); фаза F2 — відповідає виходу силової продуктивності м'язу на стаціонарний рівень (без помітного тренду в той або інший бік); фаза F3 — закінчення скорочення м'язу (відповідає завершенню стимулювального подразнення). Слід відзначити, що у більшості випадків між фазами F1 та F2 мала місце тривала часова затримка. Зміну амплітуди довжини м'язових волокон також було розбито на три фази: фаза L1 — початок зміни довжини м'язу (перші 500 мс стимулювального сигналу); фаза L2 — відповідає часовій ділянці виходу довжини на стаціонарний рівень скорочення.

Щоб встановити концентрації рутину, під впливом яких відбувались зміни динамічних параметрів скорочення, було досліджено дію рутину на м'язове скорочення у діапазоні концентрацій (10^{-8} – 10^{-3}) моль/л. У результаті досліджень було виявлено, що розчини рутину в концентраціях нижче 10^{-5} моль/л не впливали на роботу скелетно-м'язових препаратів. Виходячи з цього для оцінки інтенсивності впливу рутину на динамічні параметри скорочення використовували розчини флавоноїду в діапазоні концентрацій (10^{-5} – 10^{-3}) моль/л (рис. 1).

У результаті проведених досліджень встановлено, що концентрація рутину 10^{-5} моль/л істотно не впливала на силові параметри та зміну довжини досліджуваних об'єктів. На другій хвилині дії розчину зазначеної концентрації сила м'язового скорочення упродовж фаз F1 і F2 становила ($99,2 \pm 0,7$)% та ($99 \pm 0,9$)% відповідно, та упродовж фази F3 — ($99,5 \pm 0,6$)% від контрольних значень. За цих умов спостерігалось зниження довжини м'язових препаратів упродовж фази L1 до ($99,4 \pm 0,7$)%, а фази L2 до ($99,5 \pm 0,8$)% на шостій хвилині спостереження, яке залишалось на такому рівні до кінця стимуляції.

У результаті досліджень розчину рутину в концентрації 10^{-4} моль/л було встановлено, що інгібіторна дія флавоноїду на динамічні параметри скорочення зростала (рис. 2). Максимальне зниження сили м'язового скорочення відбувалось упродовж фази F2 і становило ($95,3 \pm 1,2$)% від контролю. Максимальне зниження довжини м'язових волокон відбувалось упродовж фази L2 і становило ($95,2 \pm 2,1$)% від контрольних значень. Проте ці зміни були статистично невірними.

Скорочення досягало стаціонарного рівня протягом описаних фаз після дванадцятої хвилини експерименту. За цих даних умовна максимальна сила скорочення у фазі F1 практично

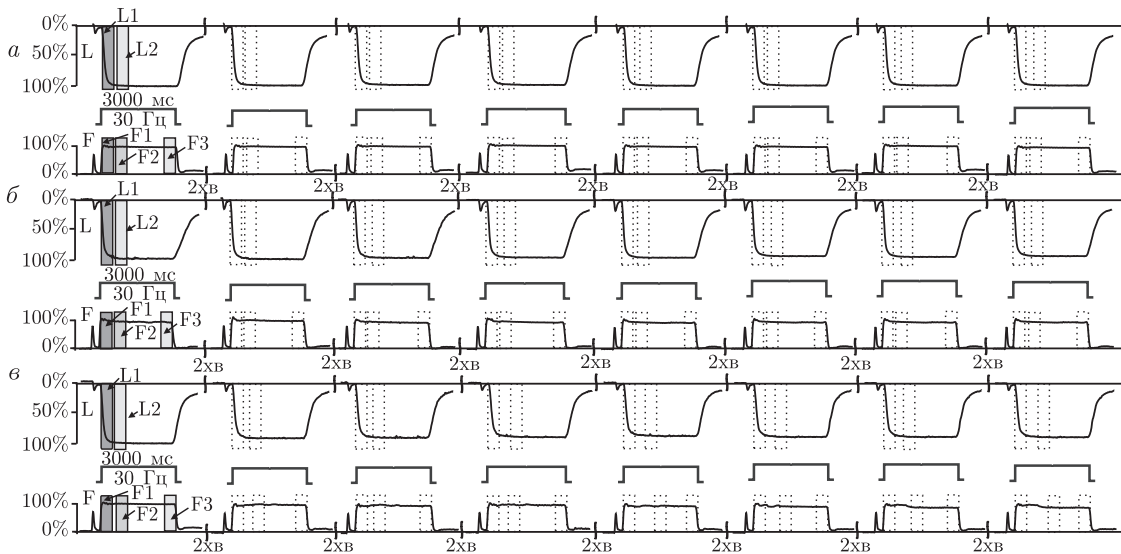


Рис. 1. Вплив розчинів рутину в концентраціях, моль/л: 10^{-5} (а), 10^{-4} (б) та 10^{-3} (в) на динамічні параметри скорочення, викликані стимуляцією з частотою 30 Гц і тривалістю 3 с: жирними лініями позначено тривалість та форму стимуляційного сигналу. По осі абсцис відображено тривалість скорочення, по осі ординат зміну параметрів скорочення у відсотках від початкового рівня. Заштриховані області відповідають межах досліджуваних фаз (F1, F2, F3, L1, L2). Початок силової відповіді м'язу, який виникає безпосередньо після дії стимуляційного сигналу (фази F1, L1); вихід силової відповіді м'язу на стаціонарний режим (F2, L2); фаза закінчення м'язового скорочення, яка відповідає завершенню стимуляційного подразнення (F3). Тривалість виділених фаз 500 мс. Час релаксації 2 хв

не змінювалась і становила $(98 \pm 0,8)\%$ на шостій хвилині дії рутину (рис. 2, а). Упродовж фази F3 найбільше зменшення силових параметрів відбувалось на десятій хвилині і становило $(96 \pm 1,3)\%$ від контролю. Максимальне зменшення скорочення м'язових волокон при використанні розчину рутину цієї концентрації спостерігалось на десятій хвилині і становило $(94,1 \pm 1,6)\%$ упродовж фази L1 та $(95,2 \pm 2,1)\%$ упродовж фази L2 (рис. 2, г, д).

У результаті досліджень впливу розчинів рутину концентрацією 10^{-3} моль/л було встановлено поступове зменшення динамічних параметрів м'язового скорочення. Зміни у динаміці м'язового скорочення відбувалися після четвертої хвилини дії розчину рутину упродовж усіх фаз скорочення, за винятком фази F1. Найменше зниження сили м'язового скорочення відбувалось упродовж фази F1 і становило $(97 \pm 1,4)\%$ від контролю. Досягнення стаціонарного стану скорочення відбувалось після четвертої хвилини дії стимулюючого подразника. Максимальне зниження сили скорочення упродовж фаз F2 та F3 відбувалось після чотирнадцятої хвилини спостереження і становило $(92 \pm 1,6)\%$ та $(89,4 \pm 2)\%$ ($p > 0,05$) відповідно (рис. 2, б, в). Максимальне зниження довжини м'язового скорочення спостерігалось на дванадцятій хвилині експерименту упродовж фази L1 та фази L2 і становило $(87,8 \pm 1,2)\%$ та $(87,6 \pm 2,4)\%$ ($p > 0,05$) від контрольного рівня відповідно. При використанні 10^{-3} моль/л розчину рутину зменшення довжини м'язового скорочення носило дещо нерівномірний характер упродовж фаз L1 та L2. Відмивання м'язових препаратів розчином Рінгера супроводжувалося відновленням динамічних параметрів скорочення до вихідних значень.

Описання впливу певних біологічно активних речовин на таку динамічну структуру як скелетно-м'язове волокно є неповним без розуміння часового процесу взаємодії реагенту зі

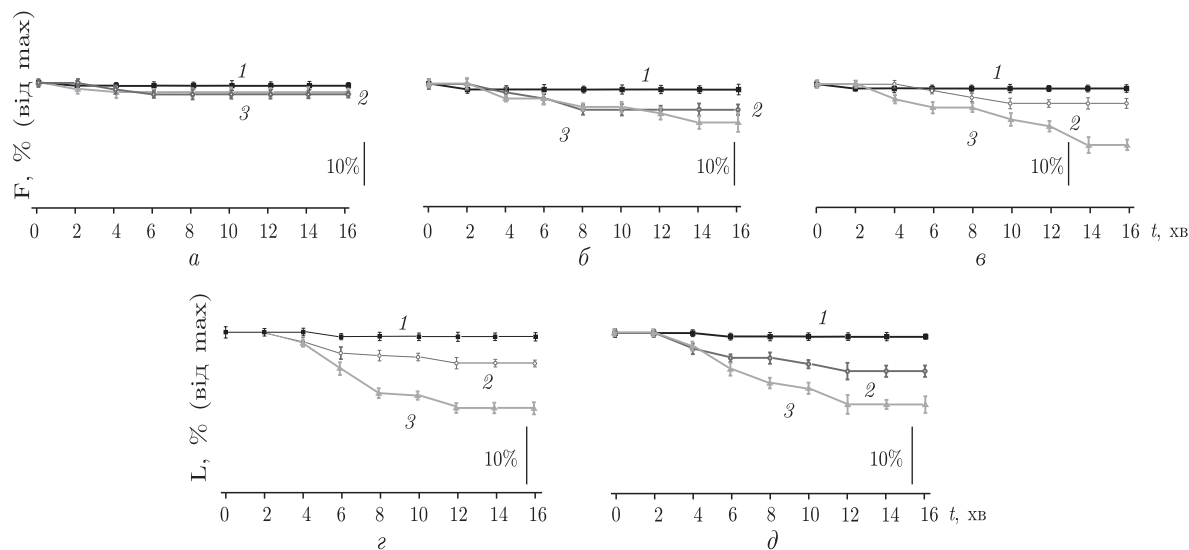


Рис. 2. Вплив розчинів рутину на динамічні параметри скорочення, викликані електростимуляцією з частотою 30 Гц та тривалістю 3000 мс, залежно від тривалості дії реагенту: 1 — розчин рутину 10^{-5} моль/л; 2 — 10^{-4} моль/л; 3 — 10^{-3} моль/л. а — Фаза F1; б — F2; в — F3; г — L1; д — L2. Тривалість виділених фаз 500 мс. Час релаксації 2 хв. Інші позначення такі самі, як на рис. 1

скоротливим апаратом. Скорочення м'язового волокна не можна уявити як однорідний та лінійний біохімічний процес. Часові ділянки поодинокого скорочення є синхронною взаємодією множинних високомолекулярних, фібрилярних та хімічних компонентів, які взаємодіють в строго визначеній часовій послідовності. Вплив одного й того ж хімічного реагенту на різні часові ділянки скоротливого акту може призводити не лише до прояву або відсутності ефекту, а й залежно від часу дії пригнічувати або посилювати процес скорочення.

Результатами проведених досліджень доведено, що рутин у концентраціях 10^{-5} й 10^{-4} моль/л істотно не впливає на роботу скелетно-м'язових препаратів. Поряд з цим підвищення концентрацій рутину до 10^{-3} моль/л викликало зниження досліджуваних параметрів скорочення без помітних флуктуаційних коливань, проте таке зменшення не було статистично вірогідним. Слід відзначити, що ці зміни насамперед стосувалися загального зниження досліджуваних динамічних параметрів скорочення м'язових волокон. Нами було встановлено, що зміни сили скорочення під впливом флавоноїду різнилися упродовж досліджуваних фаз скорочення. Найменшому впливу генерація силової відповіді м'язових волокон піддавалися впродовж фаз дотетанічного скорочення (F1). Розбіжності змін амплітуди довжини м'язових волокон упродовж різних фаз були незначними. Зміна амплітуди довжини скорочення була значно чутливішою до підвищення концентрацій досліджуваних речовин у порівнянні зі змінами генерації сили.

На нашу думку, інгібуючий ефект рутину виявляється як на молекулярному, так і на клітинному рівні. В основі механізму дії флавоноїдів лежить їх здатність впливати на функціонування ферментних систем м'язів та активність транспортних систем.

1. Formica J. V., Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids // Food Chem. Toxicol. – 1995. – **33**. – P. 1061–80.
2. Nijveldt R. J., Nood E., Hoorn D. E. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications // Amer. J. Clin. Nutr. – 2001. – **74**. – P. 418–425.

3. *Middleton E., Kandaswami J. C., Theoharides T. C.* The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer // *Pharmacol. Rev.* – 2000. – **52**. – P. 673–751.
4. *Sosa T., Chaves N., Alias J. C. et al.* Inhibition of mouth skeletal muscle relaxation by flavonoids of *Citrus ladanifer* L.: a plant defense mechanism against herbivores // *J. Chem. Ecol.* – 2004. – **30**. – P. 1087–101.
5. *Zyba V. L., Miroshnichenko N. S., Danilova V. M., Gin E. E.* Interaction of flavonoids compounds with contractile proteins of skeletal muscle // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1988. – **7**. – P. 165–175.
6. *Hidalgo C., Gonzalez M. E., Garcia A. M.* Calcium transport in transverse tubules isolated from rabbit skeletal muscle // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1986. – **29**. – P. 279–86.
7. *Георгиевский В. П., Рыбаченко А. И., Казаков А. Л.* Физико-химические и аналитические характеристики флавоноидных соединений. – Ростов на Дону: Изд-во Ростов. ун-та, 1988. – 143 с.
8. *Мельничук О. М., Ноздренко Д. М., Мірошніченко М. С.* Вплив різних концентрацій кверцетину на динамічні параметри скорочення м'язових волокон жаби в ізотонічному режимі // *Фізика живого.* – 2004. – **2**. – С. 83–91.

*Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка*

Надійшло до редакції 23.11.2006