

Т.І. Станішевська, В.І.Соболев

Характеристика латентних періодів збудження і скорочення скелетного м'яза білих щурів залежно від вмісту циркулюючого трийодтироніну

В умовах in situ показано, що між латентними періодами збудження і скорочення великогомілкового м'яза білих щурів і вмістом циркулюючого вільного трийодтироніну існує виражений негативний зв'язок; відмінності в абсолютних значеннях латентних періодів на початку і кінці шкали фізіологічних коливань вмісту трийодтироніну сягають 15,5 та 37 % відповідно. Разом з подовженням латентного періоду збудження м'язових волокон великогомілкового м'яза спостерігається подовження латентного періоду його скорочення. Ключові слова: скорочення м'яза, трийодтиронін.

ВСТУП

Важливе значення в регуляції функціонального стану нервово-м'язової системи належить тиреоїдним гормонам. Експериментально доведено, що гормони щитоподібної залози впливають на щільність і мобільні характеристики натрієвих каналів [7], активність $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ плазматичної мембрани [7, 9, 12] і міозинової АТФази скоротливого апарату, ступінь спорідненості актинових ниток до Ca^{2+} [8, 13], щільність і функціональний стан калієвих каналів мембрани саркоплазматичного ретикулума [2, 10] і активність його кальцієвої помпи [11, 13], швидкість ізометричного скорочення м'яза [5, 6] тощо. Встановлено, що при експериментальному гіпертиреозі спостерігається скорочення латентного періоду, тривалості моносинаптичної відповіді [1], латентного періоду потенціалу дії та збільшення його амплітуди при непрямому подразненні м'яза [3].

Отже, збільшені дози тиреоїдних гормонів викликають численні зміни з боку нервово-м'язового апарату, що є виявом їх патофізіологічного ефекту. Проте залишається

© Т.І. Станішевська, В.І.Соболев

ся відкритим питання про вплив фізіологічних концентрацій гормонів.

Метою роботи було з'ясування в умовах in situ характеру зв'язку між тривалістю латентних періодів збудження та скорочення (ЛПЗ і ЛПС) переднього великогомілкового м'яза білих щурів з одного боку і вмістом циркулюючого вільного трийодтироніну (T_3) – з іншого.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на 50 дорослих безпородних білих щурах-самцях масою $281 \text{ г} \pm 1,3 \text{ г}$. У всіх тварин в умовах in situ вимірювали тривалість ЛПЗ і ЛПС переднього великогомілкового м'яза, після чого тваринну забивали, і в плазмі крові визначали концентрацію вільної форми T_3 .

Хід досліду був таким. Тварину наркотизували (етамінал натрію в дозі 75 мг/кг) і фіксували у верстаті установки. Далі препарували малогомілковий нерв, який поміщали на електроди. Цей нерв іннервує передній великогомілковий м'яз, скорочення якого викликає згинання стопи задньої лапки. До неї прив'язували вантаж масою

20 г. Потім у передній великогомілковий м'яз вводили два металеві голчасті сталеві електроди з міжелектродною відстанню 1 мм, які підключали до біопідсилювача. Це дало змогу реєструвати викликану електроміографічну відповідь (М-відповідь) у вигляді сумарного біоелектричного потенціалу моторної одиниці м'яза під час подразнення нерва поодинокими електричними стимулами (рис.1) і надалі вимірювати ЛПЗ м'яза. Для підсилення його біопотенціалів застосовували диференціальний підсилювач з режекторним гіраторним фільтром (50 Гц), цифровий осцилограф TDS2004C з пам'яттю та комп'ютер.

Паралельно з електроміограмою реєстрували ергограму ізотонічного скорочення м'яза, що дало можливість розрахувати його латентний період.

У першій серії дослідів вимірювали ЛПЗ м'язового волокна за допомогою реєстрації М-відповіді під час поодиноких короткочасних ізотонічних скорочень м'яза. В період проведення досліду малоогомілковий нерв подразнювали електричними імпульсами тривалістю 0,15 мс, частотою 4 Гц. Амплітуду імпульсів електростимулятора під час нанесення подразнення поступово збільшували поки не з'являлася М-відповідь, після чого протягом 4 с проводили комп'ютерний запис викликаних електричних потенціалів м'яза. Аналізуючи отримані результати (рис. 1), вираховували ЛПЗ м'яза (час від початку подразнення нерва до появи М-потенціалу у вигляді електричного сумарного потенціалу м'яза; мілісекунди).

У другій серії дослідів вимірювали ЛПС м'яза при тривалому ізотонічному скороченні. Для цього малоогомілковий нерв подразнювали імпульсами стимулятора тривалістю 0,5 мс протягом 7 с з частотою 60 Гц. Для визначення ЛПС вимірювали час від початку нанесення подразнення до першого прояву метричного скорочення м'яза (рис. 2). У кінці досліду тварин

декапітували, після чого для подальшого визначення концентрації T_3 проводили відбір крові.

Концентрацію гормону визначали за допомогою методу імуноферментного аналізу з використанням системи фірми "ThermoLabsystems" (Фінляндія) та стандартного набору реагентів ТироїдІФА-триодтиронін вільний (Росія).

Для обробки цифрових значень варіаційної статистики використовували аналіз підсумкової статистики, відмінності між двома множинами оцінювали за допомогою двовибіркового F-тесту для дисперсій; характер залежності між досліджуваними показниками визначали на основі аналізу рівнянь регресії, їх коефіцієнтів і кластерного аналізу (Statistica, 7.0, метод k-середніх); достовірність різниці середніх встановлювали з використанням критерію t Стьюдента та вважали достовірними при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Варто відмітити, що середня концентрація T_3 становила $4,46 \text{ пмоль/л} \pm 0,172 \text{ пмоль/л}$, що відповідає нормі, встановленої для людини ($3,95\text{--}6,8 \text{ пмоль/л}$). Коефіцієнт варіації значень T_3 (27,4 %) був високим.

На подальшому етапі аналізу викликають інтерес результати вимірювання ЛПЗ великогомілкового м'яза. Середні його значення для усіх щурів становили $2,86 \text{ мс} \pm 0,064 \text{ мс}$ при коефіцієнті варіації 14,7 % і дисперсії вибірки 0,422. На фрагменті запису електроміограми при подразненні нерва електричними імпульсами тривалістю 0,15 мс (див. рис. 1) видно, що на тлі слабких шумів біопідсилювача реєструється типова М-відповідь у вигляді двофазного потенціалу з амплітудою близько 3,4 мВ. Слід зазначити, що у наших експериментах не передбачалося вимірювання абсолютних значень М-потенціалів, оскільки їх амплітуда залежить від багатьох чинників, зок-

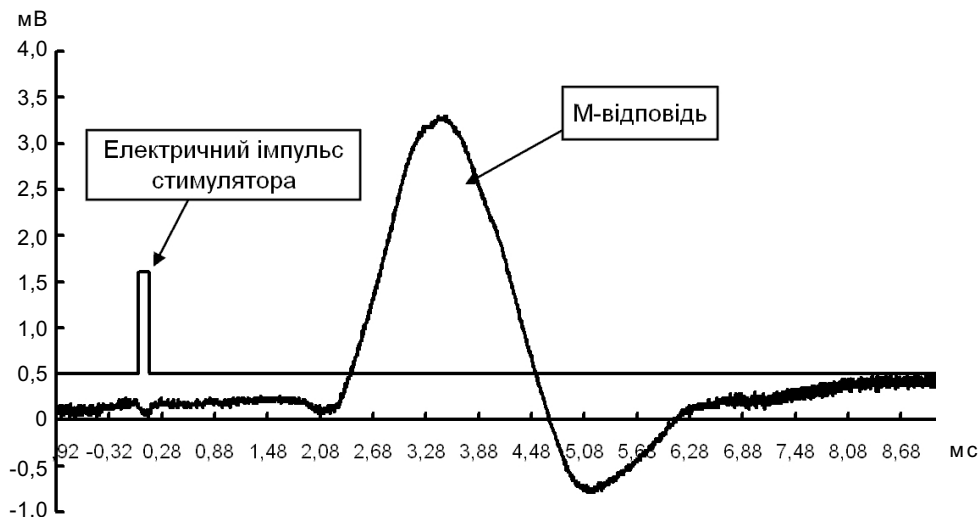


Рис. 1. Визначення часу латентного періоду збудження великогомілкового м'яза білого щура. Наведено запис М-відповіді на поодинокий імпульс стимулятора; обчислений латентний період становить 2,34 мс; крива побудована на основі 2500 точок цифрового сигналу з квантуванням 4 мкс імпортованого до програми Excel; М-потенціал реєструвався за допомогою біполярних голчастих електродів

рема від метричної площі електрода, його розташування в м'язі, міжелектродної відстані тощо.

За детального аналізу вмісту T_3 слід відмітити високу варіабельність цифрового ряду. У зв'язку з цим було проведено кількісний аналіз характеру залежності між вмістом T_3 і заздалегідь виміряними значеннями часу ЛПЗ м'яза із виділенням максимально можливого числа кластерів (за методом k-середніх). З табл.1 видно, що зі збільшенням вмісту T_3 (від $3,05 \pm 0,14$

у 1-му кластері до $7,09$ пмоль/л $\pm 0,15$ пмоль/л в останньому) ЛПЗ м'яза зменшувався, сягаючи на кінці шкали концентрацій T_3 значення $2,02$ мс $\pm 0,15$ мс, що було на 36,7 % нижче, ніж на початку шкали ($P < 0,05$). На графіку розсіювання (рис. 3,а), а також у табл. 2 показано, що характер такої залежності у цілому описується рівнянням параболи загального вигляду за високого рівня вірогідності коефіцієнта апроксимації кривої (коефіцієнт детермінації $R^2 = 0,79$, $P = 3,04 \cdot 10^{-14}$).

Таблиця 1. Залежність між концентрацією вільної форми трийодтироніну крові і значеннями латентних періодів збудження і скорочення великогомілкового м'яза білих щурів ($M \pm m$)

Фізіологічний показник	Концентрація вільної форми трийодтироніну в плазмі крові, пмоль/л			
	Кластери			
	1	2	3	4
	$3,05 \pm 0,14$	$4,00 \pm 0,02$	$4,98 \pm 0,14$	$7,09 \pm 0,15$
Латентний період збудження м'яза (ЛПЗ), мс	$3,19 \pm 0,04$	$3,0 \pm 0,032$	$2,79 \pm 0,08$	$2,02 \pm 0,15$
Різниця відносно значення ЛПЗ у 1-му кластері	-	$-0,19 \pm 0,05$ $-5,9\%$ $P < 0,05$	$-0,4 \pm 0,09$ $-12,5\%$ $P < 0,05$	$-1,17 \pm 0,155$ $-36,7\%$ $P < 0,05$
Латентний період скорочення м'яза (ЛПС), мс	$29,6 \pm 0,33$	$29,8 \pm 0,32$	$28,3 \pm 0,44$	$25,0 \pm 1,28$
Різниця відносно значення ЛПС у 1-му кластері	-	$+0,2 \pm 0,45$ $+0,7\%$ $P > 0,05$	$-1,3 \pm 0,55$ $-4,4\%$ $P < 0,05$	$-4,6 \pm 1,32$ $-15,5\%$ $P < 0,05$

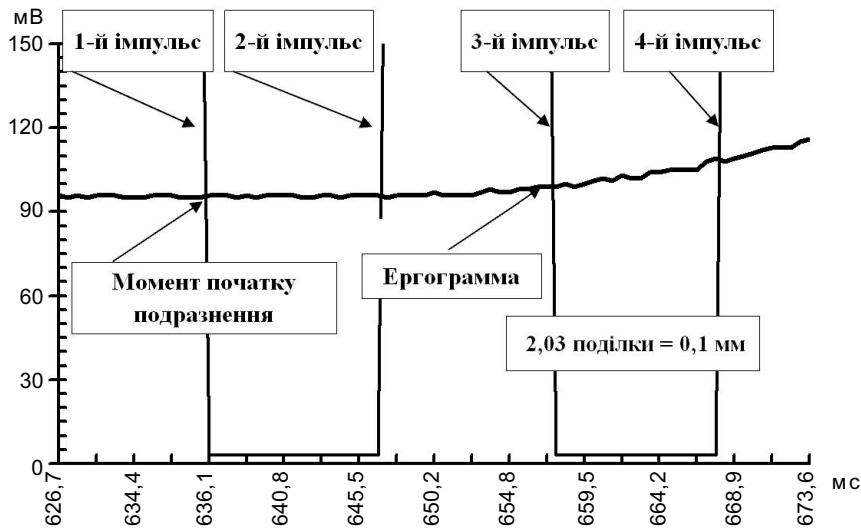


Рис. 2. Визначення часу латентного періоду скорочення великогомілкового м'яза білого щура. Виміряний час латентного періоду скорочення м'яза становить 21 мс

Слід зазначити, що показники варіабельності значення латентного періоду істотно підвищуються зі збільшенням концентрацій T_3 крові (особливо в кінці шкали концентрацій T_3). Це дає змогу припустити існування принаймні декількох окремих сукупностей у вибірці значень ЛПЗ м'яза. За допомогою кластерного аналізу методом к-середніх були виділені 2 діапазони концентрацій T_3 : 2,5–4,8 і 4,9–7,6 пмоль/л. Застосування двовибіркового F-тесту для дисперсії показало, що в правій частині шкали концентрацій T_3 (діапазон 4,9–7,6 пмоль/л, тобто на верхній межі норми) сукупність

значень ЛПЗ м'яза статистично вірогідно ($F=4,23$, $P=0,0008$) відрізняється від множини, що характеризує лівобічну частину сукупності (на шкалі концентрацій T_3 у діапазоні 2,5–4,8 пмоль/л). Отже, при наближенні значень концентрації T_3 до верхньої межі норми один з важливих показників функціонального стану нервово-м'язової передачі – ЛПЗ м'яза – не тільки зменшується, але і стає більш варіабельним.

Другим показником, що відображає стан нервово-м'язової передачі, є ЛПС м'яза. Результати показали, що в середньому його час у щурів досліджуваної групи становив

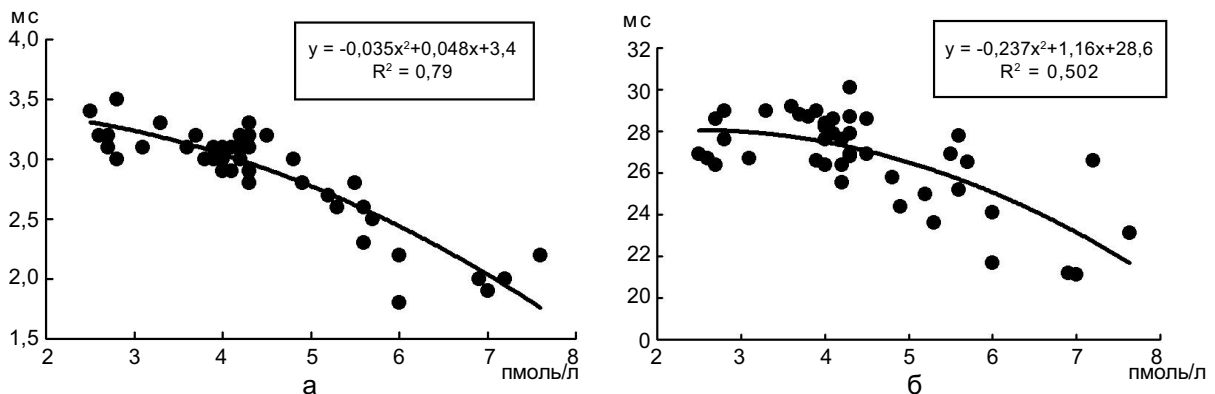


Рис. 3. Характер залежності між вмістом циркулюючого вільного трийодтироніну і значенням латентного періоду збудження (а) і скорочення (б) великогомілкового м'яза білих щурів

Таблиця 2. Характеристика залежності значень латентних періодів збудження м'яза (ЛПЗ) і його скорочення (ЛПС) від вмісту циркулюючого вільного трийодтироніну (T_3)

Вигляд поліноміальної залежності	Статистична характеристика коефіцієнтів у рівняннях		
	Перший коефіцієнт (вільний член)	Другий коефіцієнт	Третій коефіцієнт (квадратичний)
$ЛПЗ=3,4+0,0483[T_3]-0,0348[T_3]^2$	$3,4\pm 0,35$ $P=7,65 \text{ E-}12$	$0,0483\pm 0,15$ $P=0,75$	$0,035\pm 0,015$ $P=0,029$
$ЛПС=28,6+1,16[T_3]-0,237[T_3]^2$	$28,6\pm 2,8$ $P=1,25 \text{ E-}12$	$1,16\pm 1,19$ $P=0,34$	$-0,237\pm 0,10$ $P=0,048$

28,7 мс ± 0,33 мс при стандартному відхиленні 2,16, медіані і моді 2,88 і 28,9 відповідно. Зрозуміло, що значення ЛПС м'яза повинно бути істотно вище (у нашому випадку у 10 разів), ніж ЛПЗ, що ми і спостерігали.

Аналіз залежності часу ЛПС м'яза від вмісту T_3 показав, що в межах фізіологічних коливань його концентрації значення загалом були сталими, і лише в крайній правій межі норми (понад 5,0 пмоль/л) тривалість ЛПС м'яза різко знижувалася (див. табл.1). Так, за вмістом T_3 у 7,09 пмоль/л ± 0,15 пмоль/л (4-й кластер) її значення становило 25,0 мс ± 1,28 мс, що було на 15,5 % менше ($P<0,05$), ніж на початку фізіологічної шкали концентрацій T_3 , тобто у 1-му кластері.

Загалом залежність між вмістом циркулюючого T_3 і значенням ЛПС м'яза відносно точно описується рівнянням параболи загального виду (табл. 2, рис. 3,б) при достатньому рівні вірогідності апроксимації кривої (коефіцієнт детермінації $R^2=0,502$, $P=8,8 \text{ E-}0,7$).

Характер розподілу точок розсіювання (див. рис. 3,б) візуально свідчить про можливе існування декількох окремих множин з різною дисперсією на початку і в кінці діапазону концентрацій T_3 . Дійсно, після використання кластерного аналізу з заданою кількістю кластерів (два) виявилось, що цілісна сукупність T_3 -ЛПС легко розщеплюється на дві частини, два кластери, у діапазоні концентрації T_3 2,5-4,8 і 4,9-7,6 пмоль/л відповідно. Двовибірковий F-

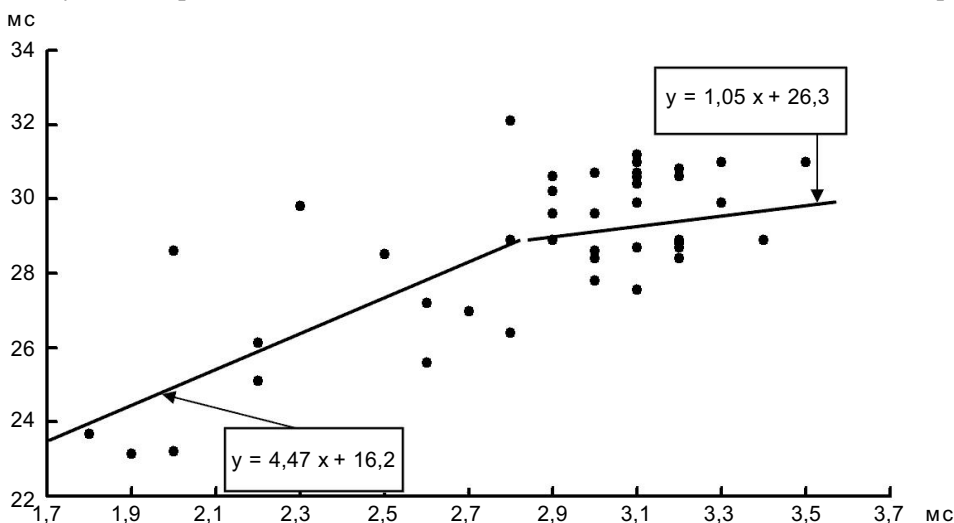


Рис. 4. Залежність часу латентного періоду скорочення м'яза від часу латентного періоду його збудження. За віссю абсцис - латентний період збудження, за віссю ординат - латентний період скорочення

тест для дисперсії показав, що між двома сукупностями існують статистично вірогідні відмінності ($F=3,25$, $P=0,005$).

Особливості використаної методики дають змогу провести аналіз взаємозв'язку ЛПЗ і ЛПС скелетного м'яза. Виявилося, що між згаданими двома показниками існує позитивний зв'язок (рис. 4, табл. 3). При цьому в цілісній вибірці виділяються як мінімум дві сукупності значень. Так, на початку шкали «Х» (діапазон ЛПЗ від 1,8 до 2,8 мс) разом з подовженням ЛПЗ м'яза спостерігалось і подовження ЛПС м'яза при значних статистично вірогідних коефіцієнтах регресії та кореляції. Надалі така залежність зникала. Це свідчить про те, що існують виражені індивідуальні відмінності збудливості м'язових волокон білих шурів, оскільки кожна точка на графіку (див. рис. 4) відображає поєднані показники ЛПЗ і ЛПС для кожного окремого м'яза (тобто тварини). Крім того, можливо виділити принаймні дві популяції скелетних м'язів (дві групи шурів). Якщо виходити зі значення коефіцієнтів регресії у рівняннях (див. табл. 3), то у першому випадку (діапазон 1,8–2,8 мс) він становив $4,47 \pm 1,66$, а у другому (діапазон 2,8–3,5 мс) $1,05 \pm 1,28$ відповідно, тобто був у 4,2 раза меншим ($P < 0,05$). Аналогічний результат, тобто доказ існування щонайменше двох множин у цілісній сукупності, можна одержати і

після використання двовибіркового F-тесту для дисперсій ($F=5,83$, $P=4,77 E-05$).

Пояснення цього, на наш погляд, може бути пов'язане з різним вмістом T_3 , який і є, з одного боку, модулятором провідності нервово-м'язового синапсу (позначається на латентному періоді збудження м'язового волокна), а з іншого боку – модулятором скорочувальної функції м'язового волокна (позначається на латентному періоді його скорочення). Це припущення не позбавлене підстав, оскільки у низці публікацій наведено факти змін практично всіх ланок нервово-м'язового апарату при стані гіпертиреозу [4, 5, 9, 14]. Отримані в нашій роботі результати можуть бути поширені і на фізіологічні ефекти тиреоїдних гормонів, які, отже, є безпосередніми значущими фізіологічними регуляторами основних показників скорочувального акту.

ВИСНОВКИ

1. Між латентними періодами збудження (ЛПЗ) і скорочення (ЛПС) великогомілкового м'яза білих шурів і вмістом T_3 існує виражений негативний зв'язок; відмінності в абсолютних значеннях латентних періодів на початку і кінці шкали фізіологічних коливань вмісту T_3 сягають 15,5 % для ЛПЗ і 37 % для ЛПС.

2. У варіаційних рядах значень ЛПЗ і

Таблиця 3. Характеристика залежності часу латентного періоду скорочення м'яза (ЛПС) від латентного періоду збудження м'яза (ЛПЗ)

Діапазони ЛПЗ	Рівняння залежності (регресії)	Статистична оцінка коефіцієнтів		
		Постійний член	Коефіцієнт регресії	Коефіцієнт кореляції між показниками
1,8–2,8 мс (лівобічна частина шкали «Х»)	$ЛПС=4,47 [ЛПЗ] + 16,2$	$16,2 \pm 4,05$ $P=0,0015$	$4,47 \pm 1,66$ $P=0,0197$	$0,61 \pm 0,16$ $P=0,019$
2,8–3,5 мс (правобічна частина шкали «Х»)	$ЛПС=1,05 [ЛПЗ] + 26,3$	$26,3 \pm 4,19$ $P=6,85 \cdot 10^{-7} E$	$1,05 \pm 1,28$ $P=0,82$	$0,15 \pm 0,17$ $P=0,54$

ЛПС великогомілкового м'яза на підставі різного ступеня варіабельності виділяються дві сукупності, співвіднесені до різних діапазонів фізіологічних коливань вмісту T_3 : менше ніж 6,0 пмоль/л (ліва частина шкали концентрацій T_3) і вище за 6,0 пмоль/л (права частина шкали).

3. Разом з подовженням ЛПЗ м'язових волокон великогомілкового м'яза спостерігається подовження ЛПС; при високих значеннях ЛПЗ така залежність зникає; відмінність у коефіцієнтах регресії в рівняннях для різних ділянок шкали значень латентного періоду збудження м'яза сягає 426 %.

Т.И. Станишевская, В.И.Соболев

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛАТЕНТНЫХ ПЕРИОДОВ ВОЗБУЖДЕНИЯ И УКОРОЧЕНИЯ МЫШЦЫ БЕЛЫХ КРЫС В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО ТРИЙОДТИРОНИНА

В условиях *in situ* показано, что между латентными периодами возбуждения и укорочения переднеберцовой мышцы белых крыс и концентрацией циркулирующего свободного трийодтиронина существует выраженная отрицательная связь; различия в абсолютных значениях латентных периодов в начале и конце шкалы физиологических колебаний концентрации трийодтиронина достигают 15,5 и 37% соответственно. Вместе с удлинением латентного периода возбуждения мышечных волокон переднеберцовой мышцы наблюдается удлинение латентного периода ее укорочения; при высоких значениях латентного периода возбуждения такая зависимость исчезает.

Ключевые слова: сокращение мышцы, концентрация, трийодтиронина.

T.I. Stanishevskaya, V.I.Sobolev

CHARACTERIZATION OF THE LATENT PERIODS OF EXCITATION AND SHORTENING OF ANTERIOR TIBIAL MUSCLE OF WHITE RATS DEPENDING ON THE BLOOD LEVEL OF TRIIODOTHYRONINE

In experiments *in situ* it was shown an expressed negative correlation between the duration of latent periods of excitation and contraction of the anterior tibial muscle of white rats and the blood level of free triiodothyronine. The difference in mean

values of latent periods at starting and final points of scale of physiological fluctuations of triiodothyronine level amounted 15,5% and 37,0% respectively. In parallel with lengthening of latent period of anterior tibial muscle excitation it was found an increase in latent period of this muscle contraction. Interestingly, at high values of the latent periods of excitation such dependence disappeared.

Key words: muscle contraction, level of triiodothyronine.

Donetsk National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гольбер Л.М., Гайдина Г.А., Игнатков В.Я., Алиев М.Н. Патогенез двигательных расстройств при тиреотоксикозе / Под ред. Гольбера Л.М. – М.: Медицина, 1980. – 208 с.
2. Марзоев А.И., Рубцов Б.В., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. Действие тироксина на функции саркоплазматического ретикулома скелетных мышц кролика // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1980. – №5. – С.541–542.
3. Неруш П.О., Макій Є.А., Родинський О.Г. Вікові особливості функціонування нервово-м'язової системи щурів за умов гіпертиреозу // Фізіол. журн. – 2001. – 47, №5. – С. 12–17.
4. Соболев В.И., Лапенко Н.Т. Фазы мышечного термогенеза при экспериментальном гипертиреозе // Физиол. журн. СССР. – 1986. – 72, №3. – С. 381–384.
5. Соболев В.И., Москалец Т.В. Влияние экспериментального тиреоза на энергетику изометричного сокращения м'яза білого щура (дослідження *in situ*) // Фізіол. журн. – 2007. – 53, №5. – С. 86–90.
6. Труш В.В., Соболев В.И. Изменение силовых характеристик скелетной мышцы белых крыс в процессе углубления экспериментального гипертиреоза // Архив клин. и эксперим. медицины. – 2003. – 12, №2. – С. 144–150.
7. Brodie C., Sampson S.R. Characterization of thyroid hormone effects on Na-K pump and membrane potential of cultured rat skeletal myotubes // Endocrinology. – 1988. – № 2. – P. 891–897.
8. Caroccia L., Williams D.A., Wrigth A. Effects of thyroid and parathyroid hormones on muscular activity // Proc. Austral. Physiol. and Pharmacol. Soc. – 1988. – P. 19–71.
9. Clausen T., Everts M.E. Regulation of the Na-K pump in skeletal muscle // Kidney Int. – 1989. – №1. – P. 1–13.
10. Connelly T.J., Hayek R., Sukhareva M. L-thyroxine activates the intracellular Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1994. – 32, № 3. – P. 441–448.
11. Davis P.J., Davis F.B., Lawrence W.D. Thyroid hormone regulation of membrane Ca^{2+} -ATPase activity // Endocrinol. Res. – 1989. – 15. – P. 651–682.
12. Everts M.E., Clausen T. Effects of thyroid hormone

- on Na⁺-K⁺ transport in resting and stimulated rat skeletal muscle // Amer. J. Physiol. – 1988. – 255, № 5. – P. 604–612.
13. Sampson S.R., Bannett R.R., Shainberg A. Effects of thyroxine on transmembrane resting potentials of skeletal muscle cells in culture // J. Neurosci. Res. – 1982. – 8, № 4. – P. 595–601.
14. Warnick P.R., Davis P.J., Davis F.B., Cody V, Galindo J.Jr., Blas S.D. Rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity: stimulation in vitro by thyroid hormone analogues and bipyridines // Biochem. and Biophys. Acta – 1993. – 1153. – P. 184–190.

Донецьк. нац. ун-т
E-mail: v.sobolev@mail.ru

Матеріал надійшов до
редакції 14.04.2011