УДК 612.741, 612.744

Л.А. Бугайченко

Зміни динамічного та статичного компонентів ексцентричного скорочення литкового м'яза наркотизованого кота при втомі

Изучались динамический (P_{dyn}) и статический (P_{st}) компоненты силовой реакции активной икроножной мышцы кошки на растяжение в широком диапазоне мышечной усталости. Для активации мышцы применялась распределенная стимуляция разделенного на филаменты вентрального корешка L7, с частотой 10 $с^{-1}$ для каждого филамента. Активную мышцу растягивали линейно на 5 мм со скоростью 1,25, 2,5 или 10 мм/с с фиксацией длины на 4 с. Временной интервал между тестами был 2 мин. При уменьшении начального изометрического тетануса (P_0) на 30% нормализованные значения P_{dyn} и P_{st} (относительно „неусталых" значений) составили 0,77±0,04 и 0,78±0,02, а при 60% – 0,27±0,04 и 0,55±0,02 соответственно. При уменьшении P_0 не более, чем на 30%, P_{dyn} и P_{st} имели примерно равные доли в силовой реакции на растяжение мышцы, с углублением усталости относительная доля P_{dyn} резко уменьшалась. Траектория спада P_{dyn} зависела от скорости предшествующего удлинения и от степени усталости. Высказано предположение о том, что P_{dyn} в большей мере, чем P_{st}, зависит от фракции актиномиозиновых мостиков, завершающих рабочий цикл; в то время как P_{st} отражает обусловленное растяжением повышение сродства миозиновых головок к актину, и поэтому подвержен усталости в меньшей степени.

ВСТУП

М'язова втома, що визначається як зменшення сили м'яза за умов незмінної активації, супроводжується зменшенням його жорсткості, максимальної швидкості скорочення (ізотонічний режим), сили тетанічного скорочення (ізометричний режим), потужності та зсуву вліво кривої швидкість – сила [2, 3, 4]. Проте сила м'яза, який працює в режимі уступаючої роботи (ексцентричне скорочення) – коли м'яз подовжується за умов зовнішнього навантаження, більшого за P_0 – менш уразлива до втоми, ніж сила концентричного або ізометричного, і для однієї й тієї самої швидкості подовження втомлений м'яз розвиває більшу силу (відносно P_0), ніж невтомлений. Це спостерігали при переході від ізокінетичного до ізометричного режиму на привідному м'язі великого пальця людини [4, 5], в ізотонічному – на препаратах м'язових волокон жаби [3] і на камбалоподібному м'язі та довгому м'язі-розгиначі пальців миші [2], але причини меншої вразливості ексцентричного скорочення невідомі.

Метою нашої роботи було дослідити силову реакцію активного м'яза при його подовженні й проаналізувати компонентний склад ексцентричного зусилля в динаміці формування м'язової втоми.

МЕТОДИКА

Дослідження було проведено на п'яти дорослих котах обох статей масою 2,8 – 4,0 кг. Спочатку тварин наркотизували внутрішньоочеревинно (пентобарбітал натрію, 50 мг/кг) з подальшим внутрішньовенним введенням наркозу у разі необхідності.

© Л.А. Бугайченко

Артеріальний тиск вимірювали через катетер, вставлений у загальну сонну артерію. Для підтримки постійного тиску до внутрішньої яремної вени вводили суміш фізіологічного розчину, реополіглюкіну та глюкози. Сухожилля камбалоподібного м'яза перерізали. Обидві головки литкового м'яза виділяли з навколишніх тканин, їх сухожилля з невеликим шматочком кістки з'єднували з механостимулятором. Усі нерви задньої кінцівки, окрім іннервуючого литковий м'яз, перерізали. Ламінектомію виконували на рівні сегментів L3–L7. Дорсальні й вентральні корінці сегментів L7 й S1 перерізали. Колінний суглоб жорстко фіксували. По закінченні досліду здійснювали евтаназію великою дозою пентобарбіталу натрію.

Пристрої введення – виведення фірми „National Instruments" (США) (PCI-6711, PCI-6023E) з пакетом програм LabView 6.0. використовували для реєстрації результатів і генерації командного сигналу для сервокерованого механостимулятора. Частота зчитування результатів була 2 кГц.

Для отримання скорочення, подібного до природного, за допомогою спеціального електронного пристрою здійснено розподілену стимуляцію вентрального корінця L7, розщепленого на п'ять приблизно рівних частин. Силу стимуляції для кожного з філаментів обирали такою, щоб викликати рівні за амплітудою одиничні ізометричні скорочення м'яза. Тривалість стимулів становила 0,2 мс. Початкову довжину м'яза встановлювали в середині її фізіологічного діапазону близько довжини спокою. Після досягнення м'язом максимуму ізометричного тетануса його розтягували лінійно на 5 мм із швидкістю 1,25, 2,5, 10 мм/с з наступною фіксацією довжини. Жорсткість механостимулятора була 0,06 Н/мм. Наприкінці тесту довжину м'яза зменшували до початкового рівня, і після цього стимуляцію виключали. Інтервали між тестами в серії становили 2 хв, середня кількість тестів на дослід була 60.

РЕЗУЛЬТАТИ

На рис.1 показано зміну силової реакції активного м'яза на трапецієподібну зміну її довжини зі швидкістю 1,25, 2,5 і 10 мм/с. У кожному тесті після того, як включалася розподілена стимуляція корінця, і м'яз розвивав постійне тетанічне зусилля (P_0), механостимулятор розтягував активний м'яз на 5 мм з постійною швидкістю. При розтягуванні м'яза сила швидко збільшувалася, після фіксації довжини вона поступово спадала від P_1 до деякого постійного рівня P_2. Значення P_0 зменшилося на 60% від свого початкового рівня після проведення 63 тестів у одному з експериментів (див. рис.1). Протягом експерименту разом зі зменшенням сили ізометричного тетанусу при початковій довжині спостерігалось уповільнення виходу сили тетанусу на плато і зменшення абсолютних значень P_1 і P_2. Аналіз ексцентричного скорочення проводився згідно з трьохкомпонентною моделлю [12]. Компонент 1 відображає збільшену генерацію сили активним елементом м'яза під час його розтягування і залежить від швидкості розтягування і, як вважають, є відображенням функціональної активності актиноміозинових містків. Компонент 2 зумовлює спад сили після зупинки розтягування м'яза. Він залежить від амплітуди розтягування м'яза на низхідному плечі кривої довжина – сила. Компонент 3 являв собою залишкове збільшення сили після розтягування активного м'яза. Вважається, що цей компонент також складається щонайменше з двох складових: пасивної – залежної від довжини м'яза і не залежної від рівня його активації та швидкості розтягування, і активної – яка залежить від рівня активації м'яза та від швидкості розтягування. Аналіз на основі даної моделі полягав у виділенні в ексцентричному скороченні P_{dyn} та P_{st}. P_{dyn} є сумою компонентів 1 і 2, $P_{dyn} = P_1 - P_2$; P_{st} тотожний компоненту 3: $P_{st} = P_2 - P_0$ [12].

Числові значення кожного з компонентів нормувалися щодо свого першого значення в даній серії тестів. Це було зроблено тому, що силові реакції, отримані на різних препаратах, відрізнялися. За рівень втоми (РВ) приймалося зменшення тетанічного зусилля поточного тесту до першого тетанічного зусилля в серії (невтомлений м'яз), виражене у відсотках: РВ = (1 – (P_0(i)/ P_0 (1))) · 100 %. Зміну амплітуди компонентів було проаналізовано за допомогою дисперсійного аналізу (Main effects ANOVA, Statistica 6.0, „StatSoft, Inc.", США). Для цього отримані значення згруповані відповідно до РВ. У групу «0» були внесені контрольні результати, отримані на невтомленому м'язі; в групи «10», «20», «30», «40», «50», «60» – значення компонентів, отриманих з тестів з РВ 1 – 10, 11–20, 21–30, 31–40, 41–50, 51–60 % відповідно.

Різниця у відносних значеннях компонентів, віднесених до тих або інших інтервалів відповідно до РВ, була достовірною ($F=48,5$, $P<0,05$ для P_{dyn}; $F=67,4$, $P<0,05$ для P_{st}). Крім того, був виконаний апостеріорний тест багаторазових порівнянь Bonferroni для визначення різниці між компонентами для конкретних інтервалів на рівні значущості $P<0,05$. P_{dyn} залишався практично незмінним при зниженні сили ізометричного тетануса на 20 % від початкового рівня. Після цього спостерігали прогресивне зменшення цього компонента (рис. 2, б). Достовірна різниця для значень P_{dyn} спостерігалася між РВ = 0 % і інтервалами від 30 до 60 % і далі. Значення P_{dyn} для РВ від 40 до 60 % з великою достовірністю відрізнялися один від одного та від значень компонента для інтервалів з РВ від 10 до 30 %.

P_{st} достовірно зменшувався вже при 10%-му РВ. Для значень цього компонента між РВ від 10 до 30 % та від 50 до 60 % достовірної різниці знайдено не було (рис. 2, а).

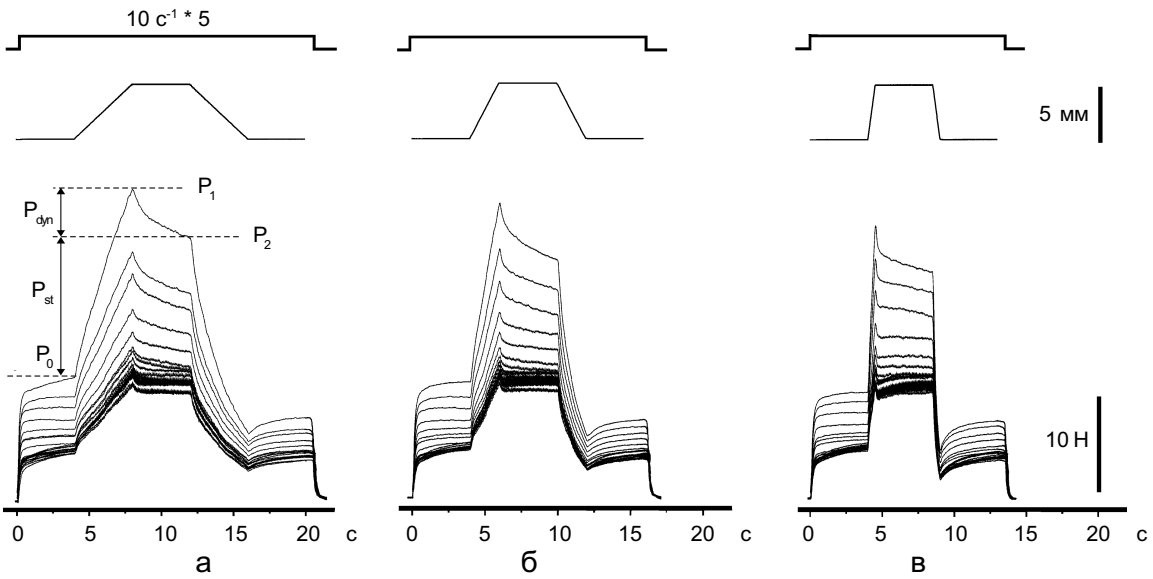

Рис. 1. Силова реакція активного м'яза на трапецієподібну зміну його довжини при формуванні м'язової втоми. Зверху – відмітка включення-виключення стимуляції, вказано частоту стимуляції по одному каналу та кількість каналів розподіленої стимуляції. Посередині – наведено траєкторію зміни довжини м'яза з різними швидкостями – 1,25 мм/с (а), 2,5 мм/с (б), 10 мм/с (в). Знизу – суперпозиція записів послідовних силових реакцій (n=21). P_0 – сила тетанічного скорочення через 4 с після включення стимуляції корінця L7, P_1 – значення сили в момент завершення розтягування м'яза, P_2 – сила тетанічного скорочення через 4 с після зупинки розтягування м'яза, P_{dyn} – динамічний компонент силової реакції м'яза, P_{st} – статичний компонент приросту сили тетанічного скорочення через 4 с після фіксації довжини м'яза

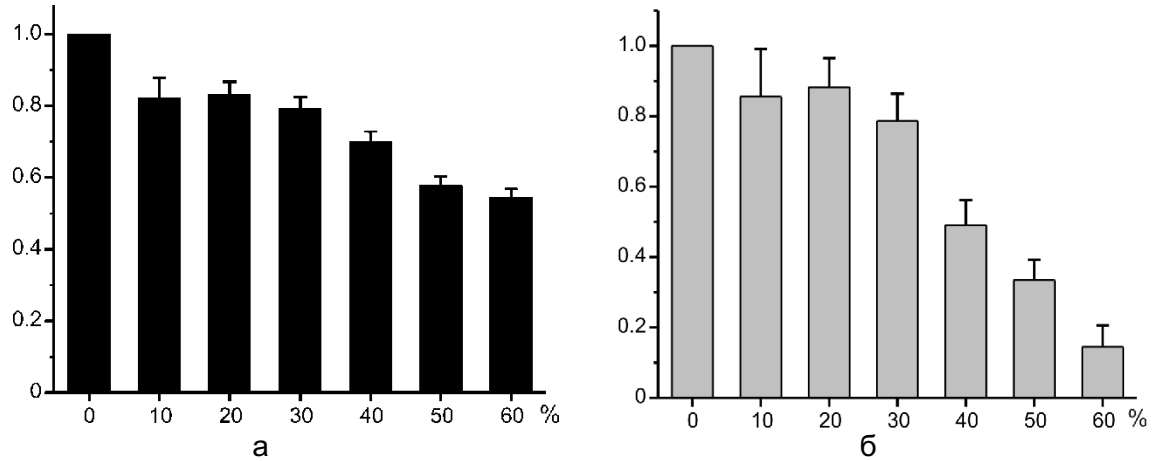

Рис. 2. Залежність нормованих значень статичного (а) і динамічного (б) компонентів (M ± m) від зменшення сили тетанічного скорочення. Результати групувалися згідно з відносним зменшенням початкового ізометричного тетануса (див. Результати)

Змінювалася також і форма P_{dyn} (рис. 3). З розвитком втомлення час, за який завершувався його спад, скорочувався. У невтомленому м'язі такий спад тривав декілька секунд. У стомленому м'язі, сила ізометричного скорочення якого становила 50% від початкового рівня, спад P_{dyn} завершувався вже за частки секунди. Форма траєкторії його спаду залежала також і від швидкості, з якою м'яз подовжувався. Після розтягування м'яза з відносно повільними швидкостями (1,25 і 2,5 мм/с) спад P_{dyn} тривав більший проміжок часу, ніж при більш швидкому розтяганні м'яза (10 мм/с) при тому ж РВ. При зменшенні P_0 до 50% від початкового рівня форма траєкторії спаду P_{dyn} набувала двофазного характеру з дуже швидким спадом (близько 0,2 с) і подальшим збільшенням сили за 3–3,5 с (рис. 3, в).

На рис. 4, а наведено накладення фрагментів записів ексцентричного скорочення м'яза при різних РВ, нормованих відносно P_0. З розвитком втоми при незмінній траєкторії подовження м'яза сила ексцентричного скорочення відносно P_0 збільшувалася. Відносні частки P_{dyn} і P_{st} у максимумі сили ексцентричного скорочення при формуванні втоми змінювалися від майже однакових при РВ 0–30% – до 0,2 для P_{dyn} і 0,8 для P_{st} при РВ 60 % (див.рис. 4, б). Відмінності для відносних часток між РВ від 0 до 30 % і від 40 до 60 % були достовірними. Відносні частки для інтервалів втоми 40 і 50 % достовірно відрізнялися від часток для інтервалу 60 %.

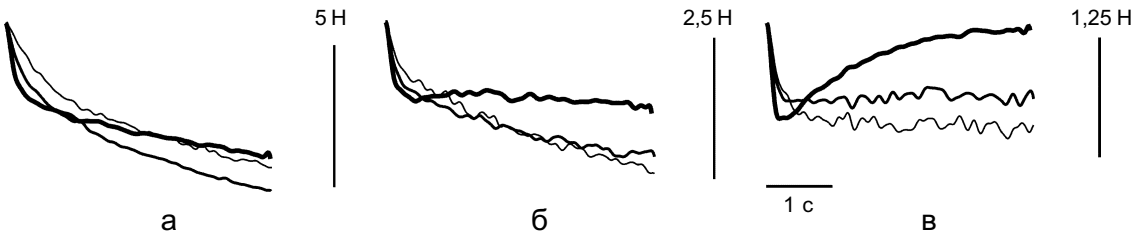

Рис. 3. Релаксація сили активного м'яза: невтомленого (а), помірно втомленого – 30 % (б), сильно втомленого – 50 % (в). Момент «0» на часовій шкалі відповідає закінченню фази розтягування м'яза. М'яз розтягувався зі швидкістю 1,25, 2,5 і 10 мм/с – тонка, напівжирна та жирна лінії відповідно

Слід зазначити, що при РВ, який перевищував 30 %, спостерігалося більш «швидке» зменшення компонент ексцентричного скорочення і співвідношення їх внеску в зусилля, що розвивається – частка P_{dyn} прогресивно зменшувалася, а частка P_{st} відповідно підвищувалася (див.рис. 4).

ОБГОВОРЕННЯ

Об'єктом дослідження було обрано швидкий литковий м'яз, для якого є звичним функціонування в ексцентричному режимі за реальних умов. Здатність м'яза генерувати більшу за ізометричний рівень силу при розтягуванні зумовлює певну стабільність кінцівки при пересуваннях по похилій площині. Ми проаналізували зміни P_{dyn} і P_{st} в ексцентричному скороченні м'яза при втомі. Розподілена стимуляція філаментів усувала можливість порушення синаптичного проведення імпульсу (залежні від втоми ефекти майже не відрізнялися при розподіленій і прямій стимуляції м'яза [8]). Імовірно, залежні від втоми зміни у роботі м'яза відбувалися через погіршення роботи скорочувального апарата, оскільки основні регулятори скорочувального процесу чутливі до метаболічних змін у внутрішньоклітинному середовищі, які спостерігаються при розвитку втоми [1].

Відносне „зберігання" сили ексцентричного скорочення при значній втомі (зменшення P_0 більше, ніж на 30 %) відбувається головним чином за рахунок P_{st} (рис. 4, а). Було виявлено, що P_{st} ексцентричного скорочення також змінюється при втомі, в той час як у роботі з вивчення компонентного складу ексцентричного скорочення, проведеному на привідному м'язі великого пальця людини [5], спостерігали незмінність P_{st} при 30 % втоми, і мале зменшення при втомі близько 50 %. Цей факт автори пояснили тим, що походження P_{st} не пов'язано зі скорочувальним механізмом. Однак нещодавно було показано, що збільшення сили м'яза внаслідок розтягування визначається не тільки пасивними його властивостями, але й збільшення кількості актиноміозинових містків, число яких після зупинки розтягання зменшується, проте залишається збільшеним порівняно з початковим рівнем [10]. Напевно, що менша залежність від втоми P_{st} зумовлена частково еластичною складовою й, головним чином, від формування додаткових містків внаслідок як підвищення ефективності зв'язування Ca^{2+} тропоніном С [1, 7], так і

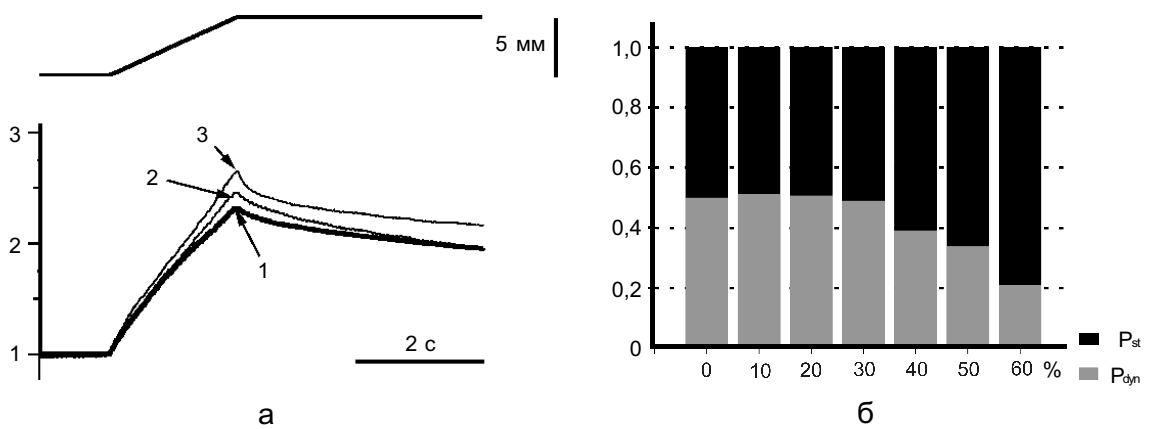

Рис. 4. Зміна відносної частки компонентів ексцентричного скорочення м'яза в динаміці формування м'язової втоми: а – фрагменти реальних записів розтягування м'яза – невтомлений м'яз (1, жирна лінія), м'яз, в якому сила тетанічного скорочення (P_0) зменшилася на 18 % (2) і 48 % (3). Траєкторії нормовано відносно P_0 (P_0 = 1). Зверху – зміна довжини м'яза, швидкість розтягування – 2,5 мм/с, б – відносний внесок статичного та динамічного компонентів у ексцентричне скороченні м'яза залежно від рівня м'язової втоми

відкриття додаткових місць приєднання міозинових голівок внаслідок більшої, ніж у тропоміозину, механічної жорсткості актину [9].

Спостережувану відносну незмінність внесків P_{st} і P_{dyn} при втомі, яка не перевищувала 30%-й рівень, можна пояснювати однаковою залежністю від уповільнення роботи актиноміозинових містків внаслідок зменшення концентрації доступного АТФ [13] і/або накопичення неорганічного фосфату [6].

При РВ, що перевищує 30 %, коли, як відомо, відбувається зменшення амплітуди і подовження в часі потоку іонів кальцію, що викликаний потенціалом дії [14] прогресивне зменшення P_{dyn} (див.рис. 2, а, 4, б) може відбуватися через зменшення кількості більш „потужних" саркомерів і збільшення фракції «слабких» розтягнутих саркомерів під час подовження м'яза (на основі теорії, наведеної в роботі Morgan [11]). Отже, зменшення кількості містків, які після закінчення розтягування м'яза завершать свій робочий цикл у звичайному режимі і від'єднаються, зумовлює зменшення P_{dyn}, а також скорочення часу його спаду як відображення уповільнення повторного приєднання тих містків, що від'єдналися.

ВИСНОВКИ

Зміна компонентного складу ексцентричного скорочення була досліджена в широкому діапазоні втоми. Зменшення P_{dyn} мало двофазний характер з критичним РВ 30 %. Відносна частка P_{dyn} в ексцентричному зусиллі, що розвивається, прогресивно зменшувалася після 30%-го РВ, а частка P_{st} відповідно збільшувалася. Така динаміка ймовірно зумовлена більшою залежністю динамічного, ніж статичного, компонента від наявної фракції актиноміозинових містків, здатних до завершення повного робочого циклу, в той час як P_{st} є відображенням збільшення спорідненості міозинових головок до актину, зумовленого розтяганням м'яза, і тому меншою мірою залежить від метаболічних зсувів, які спостерігаються при втомі.

Це дослідження було виконано за підтримки гранту INTAS 01-2130.

L.A. Bugaychenko

FATIGUE EFFECTS ON TRANSIENT AND STEADY FORCE COMPONENTS OF ECCENTRIC CONTRACTION OF THE CAT GASTROCNEMIUS

Effects of wide-range fatigue were studied on transient and steady force components of eccentric contraction of cat gastrocnemius. Muscle was activated by distributed stimulation of dissected ventral root L7 with rate of 10/s per filament. Active muscle was stretched through trapezoidal ramp with different velocities (1.25, 2.5, 10 mm/s). Fatiguing sessions consisted of standard test repetitions every 2 minutes. Normalized transient and steady components of extra force (fresh-state value = 1) were respectively 0.77±0.04 and 0.78±0.02 at 30% muscle tension drop, 0.27±0.04 and 0.55±0.02 at 60% muscle tension drop. Both transient and steady components have equal shares in extra force of eccentric contraction during moderate fatigue (up to 30% muscle tension drop); further pronouncing of fatigue entailed diminution of transient component share and corresponding augmentation of steady component one. Falling phase of transient component was subjected to fatigue and velocity of preceding lengthening in similar manner. We are speculated that steady component as reflection of actin -myosin affinity improvement during muscle stretching is less exposed to fatigue than cross-bridge rate. Acknowledgements: This study was supported by the INTAS grant 01-2130.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гурфинкель В. С., Левик Ю. С. Скелетная мышца: структура и функция. – М.: Наука, 1985. – 144 с.
2. Barclay C.J. Mechanical efficiency and fatigue of fast and slow muscle of the mouse // J. Physiol. – 1996. – **497**. – P. 781–794.
3. Curtin N.A., Edman K.A.P. Force – velocity relation for frog muscle fibres: effects moderate fatigue and intracellular acidification // Ibid. – 1994. – **475**. – P. 483–494.
4. De Ruiter C.J., De Haan A. Similar effects of cooling and fatigue on eccentric and concentric force-velocity relationships in human muscle // J. Appl. Physiol. – 2001. – **90**. – P. 2109–2116.

5. De Ruiter C.J., Didden W.J.M., Jones D.A., De Haan A. Force – velocity relationship human adductor pollicis muscle during stretch and effects fatigue // J. Physiol. – 2000. – **526**. – P. 671–681.
6. Fryer M.W., Owen V.J., Lamb G.D., Stephenson D.G. Effects creatine phosphate and Pi on Ca2+ movements and tension development in rat skinned skeletal muscle fibres // Ibid. – 1995. – **482**. – P. 123–140.
7. Gordon A.M., Ridgway E.B. Cross-bridges affect both TnC structure and calcium affinity in muscle fibers // Adv. Exp. Med. Biol. – 1993. – **332**. – P. 183–194.
8. Kostyukov A.I., Hellstrom F., Korchak O.E. et al. Fatigue effects in the cat gastrocnemius during frequency-modulated efferent stimulation // Neurosci. – 2000. – **97**. – P. 789–799.
9. Kostyukov A.I., Korchak O.E. Length changes cat soleus muscle under frequency-modulated distributed stimulation efferents in isotony // Ibid. – 1998. – **82**. – P. 943–955.
10. Linari M., Lucii L., Reconditi M. et al. A combined mechanical and X-ray diffraction study stretch potentiation in single frog muscle fibres // J. Physiol. – 2000. – **526**. – P. 589–596.
11. Morgan D.L. An explanation for residual increased tension in striated muscle after stretch during contraction // Exp. Physiol. – 1994. – **79**. – P. 831–838.
12. Noble M.I.M. Enhancement mechanical performance striated muscle stretch during contraction // Ibid. – 1992. – **77**. – P. 539–552.
13. Stephenson D.G., Lamb G.D., Stephenson G.M.M., Fryer M.W. Mechanisms of excitation-contraction coupling relevant to skeletal muscle fatigue. Neurobiology of Muscle Fatigue: Advances and Issues. In Fatigue. Neural and muscular mechanisms / Ed. Gandevia S.C., Enoka R.M., McComas A.J. et al. – New York: Plenum Press, 1995. – P. 45–56.
14. Westerblad H., Allen D.G. Changes in myoplasmic calcium concentration during fatigue in single mouse muscle fibres // J. Gen. Physiol. – 1991. – **98**. – P. 615–635.

Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 17.02.2004