

УДК 577.3

## ВПЛИВ ДІАЗИНОНУ НА СКОРОТЛИВУ АКТИВНІСТЬ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ

Левківська Л.В., Ноздренко Д.М., Мірошніченко М.С.

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Надійшла до редакції 28.02.2010

Проведені тензометричні дослідження динаміки скорочення скелетного м'язу *m.tibialis* жаби *Rana temporaria* в ізотонічному режимі під дією розчинів діазинону у діапазоні концентрацій від  $1 \cdot 10^{-6}$  до  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л. Інгібіторні властивості розчинів діазинону підсилювались як при підвищенні концентрацій даної речовини, так і при збільшенні тривалості її дії. Максимальне зменшення зміни довжини переважало порівняно з відповідними показниками сили скорочення м'язу. Сила, яка розвивається м'язом за таких умов є недостатньою для того, щоб подолати прикладене навантаження, що призводить до зміни режиму скорочення з ізотонічного в ізометричний.

**Ключові слова:** скелетні м'язи, діазенон.

### ВСТУП

Діазинон широко використовується в сільському господарстві і займає одне з провідних місць серед інсектицидних препаратів - генериків, ресинтез яких впродовж багатьох років ведеться в країнах, що розвиваються [1]. За своєю природою діазинон є фосфорорганічною сполукою. За параметрами гострої пероральної та шкірно - резорбтивної токсичності він відноситься до помірно-небезпечних сполук, 3 класу небезпечності [2, 3]. Токсичність даної речовини, як і більшості фосфорорганічних пестицидів, обумовлена здатністю інгібувати серинвімісні естерази, зокрема ацетилхолінстеразу [4 - 6]. Встановлено, що під дією органосфатів відбувається порушення роботи м'язової системи [7]. Вважається, що основною причиною таких порушень є інактивація ацетилхолінстерази. Пригнічення активності ферменту призводить до накопичення ацетилхоліну в нервово-м'язових з'єднаннях та надмірної стимуляції холінергічних рецепторів, що зумовлює в подальшому зниження їх чутливості. Результатом таких комбінованих пре- та постсинаптичних порушень є судомне скорочення, фасцикуляція та слабкість скелетних м'язів [8].

Встановлено, що токсична дія фосфорвімісних пестицидів може включати в себе цілий комплекс різних реакцій, зокрема вивільнення вільних радикалів [9, 10], активацію процесів перекисного окиснення ліпідів [11-13], що призводить до оксидативного пошкодження плазматичної мембрани, та пригнічення активності мітохондріальної АТФ синтази [14-16]. Незважаючи на те, що на сьогодні окрім інактивації естераз виявлено й інші механізми токсичного впливу фосфорорганічних інсектицидів, зниження силової продуктивності скелетних м'язів розглядається виключно як наслідок інгібування

ацетилхолінстерази [17, 18]. Але залишається незрозумілим чи відбувається зміна динамічних параметрів скорочення м'язів під дією органосфатів незалежно від їх холінергічних ефектів.

Оскільки, основними функціональними характеристиками за якими можна описати скоротливу здатність м'язів є їх сила та довжина, метою нашого дослідження було дослідити зміну наведених динамічних параметрів при безпосередній дії на м'яз різних концентрацій діазинону.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводили на пучках волокон м'язу *m.tibialis anterior*, виділених з задньої кінцівки жаби *Rana temporaria*. Препарат протягом 60 хвилин адаптували в постійно циркулюючому фізіологічному розчині наступного складу: 115,5 ммоль/л NaCl, 2 ммоль/л KCl, 1,8 ммоль/л CaCl<sub>2</sub> та 2 ммоль/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.0). Експеримент проводили в ізотонічному режимі та дискретній фіксації динамічних параметрів скорочення. В процесі проведення експерименту фіксували силу скорочення, зміну довжини, температуру омиваючого розчину та параметри стимулюючого сигналу при постійному контролі зовнішнього навантаження.

Для реєстрації сили скорочення пучків волокон скелетного м'язу використовували тензометричну установку, створену на кафедрі біофізики Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Даний пристрій являє собою комплекс, що складався: з камери з системою датчиків, в якій розміщувався досліджуваній препарат, системи насосів та дозаторів, датчиків сили, генератора синхронних імпульсів, системи термоконтролю, осцилографів, комплексу АЦП-ЦАП. Стимуляцію здійснювали

електричними імпульсами прямокутної форми тривалістю 2 мс, які формували за допомогою генератора імпульсів, керованим ЦАП, через платинові електроди. Тривалість стимуляційного сигналу становила 3000 мс.

Характеристики стимулюючого сигналу задавали програмно і передавали з комплексу АЦП-ЦАП на генератор з часом затримки не більше 0,3 мс. Згенеровані імпульси поступали через подразнюючі електроди до дослідницької камери з м'язовим препаратом. Час затримки при цьому становив не більш 0,2 мс. Загальний час затримки фіксували на вході комплексу АЦП-ЦАП, що дозволяло враховувати його при обробці результатів.

Для реєстрації зміни сили використовували п'єзодатчик з системою підсилювачів. Датчик сили розміщувався на трьохкоординатному столику що дозволяло орієнтувати положення датчика відносно камери та датчика довжини волокна.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили методами варіаційної статистики за допомогою програмного забезпечення Origin 7.0. При побудові графіків враховували відносну та абсолютну похибки експерименту. Отримані показники, трансформовані комплексом АЦП-ЦАП, піддавали згладжуванню за допомогою FFT (Fast Fourier Transform) - фільтра з коефіцієнтом згладжування  $k=5$ . Кожна з кривих, наведених на рисунках в даній роботі, є результатом узагальнення 10-12-ти аналогічних експериментів.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження показали, що достовірні зміни динамічних параметрів скорочення спостерігалися при дії діазинону у концентраціях, які перевищують  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л. Оскільки, інсектицид у концентраціях вищих від  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л викликав майже повне пригнічення скоротливої активності скелетного м'язу, дослідження впливу діазинону на процес скорочення проводили у діапазоні концентрацій від  $1 \cdot 10^{-6}$  до  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л.

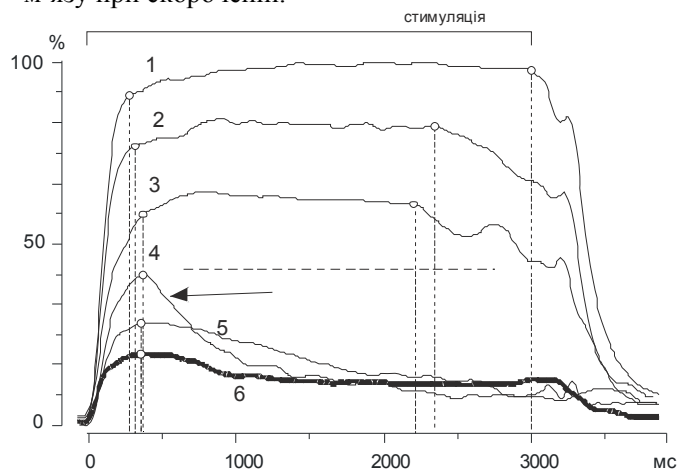
При дії діазинону у концентраціях  $1 \cdot 10^{-6}$  та  $2,5 \cdot 10^{-6}$  моль/л на фоні лінійного зниження сили відбувається зменшення швидкості її наростання. Тобто зниження потужності м'язу відбувається пропорційно до концентрації використаного інсектициду (рис.1).

При дії інсектициду у концентрації  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л максимальне зниження силової продуктивності м'язу спостерігалось на 63 хв. проведення експерименту. Максимальне зниження силової продуктивності м'язу під впливом інсектициду в концентрації  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л становило 15,9% порівняно з контрольними значеннями. Крім того, час утримання досягнутого рівноважного положення зменшився майже на 25%. Тобто, розвиток сили м'язом відбувається нелінійно протягом тривалості стимуляційного сигналу, що, можливо, пов'язано з асинхронною дією

використаного інсектициду на різних ділянках скорочення. Максимальна зміна довжини м'язу при використанні розчину діазинону даної концентрації спостерігалась на 45-тій хвилині і становила 88,8% від контролю. Крім того, збільшення тривалості дії досліджуваної речовини не викликало подальшої зміни динамічних параметрів скорочення.

Вплив інсектициду в концентрації  $2,5 \cdot 10^{-6}$  моль/л мав більш виражений характер. Максимальне зниження рівня сили, яку розвивав м'яз спостерігалось на 55 хв. Силова продуктивність м'язу при цьому знизилася на 36% порівняно з контрольними значеннями, час утримання досягнутого стаціонарного стану також знизився на 20%. Максимальне зниження ступеня зміни довжини м'язу становило 56,9% від контрольних значень, починаючи з 51 хв. проведення досліджу. Тобто в межах концентрацій  $1 \cdot 10^{-6}$  та  $2,5 \cdot 10^{-6}$  моль/л спостерігається концентраційна залежність ефектів дії діазинону, як на силову продуктивність так і на зміну довжини скелетних м'язів при скороченні.

За описаної концентрації, максимальне зменшення ступеня зміни довжини переважало (у відсотках) показники сили скорочення м'язу. Тобто, під дією діазинону більш вираженого впливу зазнає зміна довжини порівняно з силовою продуктивністю м'язу при скороченні.



**Рис. 1.** Зміна сили скорочення викликані електростимуляцією з частотою 30 Гц та тривалістю 3000 мс під дією діазинону у діапазоні концентрацій  $10^{-6}$  моль/л -  $10^{-5}$  моль/л. По осі абсцис – час, по осі ординат – силові відповіді м'язових волокон у відсотках від контролю; 1-контроль, 2 - 6 - криві, які характеризують динамічні параметри скорочення скелетного м'язу під впливом діазинону у концентраціях:  $10^{-6}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $7,5 \cdot 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  моль/л відповідно. Час релаксації 3 хвилини. Інші пояснення в тексті.

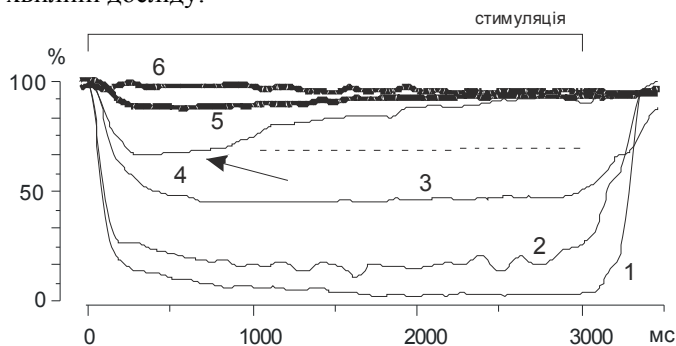
Стрілкою позначено криву (концентрація діазинону  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л) переходу динамічних параметрів скорочення до двофазної відповіді на прикладену стимуляцію. Горизонтальною пунктирною лінією показана передбачувана величина силової відповіді м'язу враховуючи її лінійне зменшення при зростанні концентрації діазинону.

Кільцями – показані значення, що відповідають досягненню м'язом рівноважного стаціонарного стану, та зміни часу його утримання (вертикальні пунктирні лінії).

У результаті досліджень впливу розчину діазинону в концентрації  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л було встановлено, що інгібіторна дія інсектициду на динамічні параметри скорочення достовірно зростає. Максимальне зниження силової продуктивності м'язу спостерігалось на 68 хв. дії інсектициду, значення сили м'язового скорочення становило 59,6% від контролю.

При концентрації діазинону  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л відбувається розділення силової відповіді на два періоди: наростання та вихід на стаціонарний рівень, що не співпадає з лінійним зменшенням сили, яке спостерігалось при дії інсектициду у менших концентраціях. Після досягнення максимальної силової відповіді м'яз не здатен підтримувати цей стан та стрімко втрачає потужність скорочення, виходячи на нову, меншу за силовою продуктивністю, рівноважну позицію, що триває протягом всього часу стимуляційного сигналу без помітних трендів. При дії діазинону у концентраціях, які перевищують  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л в межах досліджуваного концентраційного діапазону швидкість наростання сили не змінюється.

При використанні  $5 \cdot 10^{-6}$  моль/л розчину діазинону зменшення зміни довжини м'язу при скороченні носили дещо нерівномірний характер з максимальним зниженням на 77,3% порівняно з контролем, на 57 хвилині досліду.



**Рис. 2.** Зміни довжини скорочення викликані електростимуляцією з частотою 30 Гц та тривалістю 3000 мс під дією діазинону у діапазоні концентрацій  $10^{-6}$  моль/л -  $10^{-5}$  моль/л

1-контроль, 2 - 6 - криві, які характеризують динамічні параметри скорочення скелетного м'язу під впливом діазинону у концентраціях:  $10^{-6}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $7,5 \cdot 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  моль/л відповідно. По осі абсцис – час, по осі ординат відображені зміни довжини м'язових волокон виражені у відсотках від контролю. Час релаксації 3 хвилини. Інші пояснення такі як для рис 1.

Вплив діазинону у концентрації  $7,5 \cdot 10^{-6}$  моль/л зумовлював пригнічення силової продуктивності на 72,4% порівняно з контролем. Максимальне зменшення рівня сили, яку розвивав м'яз, спостерігалось на 39 хв. тривалості дії досліджуваного інсектициду. Тобто при збільшенні концентрації

спостерігається зменшення часу виходу силової продуктивності на стаціонарний стан. Як і у випадку попередньої концентрації, після досягнення максимальної силової відповіді, рівень стаціонарного рівноважного положення не утримується і поступово спадає впродовж подальшої дії стимуляційного сигналу.

Максимальне зменшення ступеня зміни довжини відбувалося на 33 хвилини проведення дослідів і становило 11,6% від контрольних значень.

Діазинон в концентрації  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л пригнічував силову продуктивність скелетних м'язів на 81,8% порівняно з контролем, причому максимальне зниження спостерігалось вже на 21 хв. його дії. Тобто при дії діазинону, зменшення сили, яку здатен розвивати м'яз, є пропорційним концентрації даної речовини.

Під впливом діазинону у концентрації  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л зміна довжини м'язу при скороченні не спостерігалася вже після 10 хв. його дії (рис.2). Тобто, сила, яка розвивається м'язом за таких умов є недостатньою для того, щоб подолати прикладене навантаження, що призводить до зміни режиму скорочення з ізотонічного в ізометричний.

Припинення дії інсектициду не призводить до відновлення початкового функціонального стану м'язу. Відмивання м'язових препаратів розчином Рінгера також не супроводжувалося відновленням динамічних параметрів скорочення.

Основним механізмом токсичної дії всіх фосфорорганічних інсектицидів на функціонування скелетних м'язів вважається інгібування ацетилхолінестерази [6]. В роботах [16, 17], присвячених вивченню впливу фосфорорганічних інсектицидів на функціональну активність скелетних м'язів, зниження рівня сили розглядають лише як наслідок їх холінергічних ефектів. Оскільки ми проводили дослідження на ізольованих скелетних м'язах, які були попередньо очищені від нервових закінчень, то зміна динамічних параметрів скорочення відбувається в результаті безпосередньої дії діазинону на міофібрили. Результати досліджень показали зниження скоротливої активності м'язів під впливом діазинону незалежно від його холінергічних ефектів. Це узгоджується з результатами інших дослідників [18], які встановили, що під дією низьких доз діазинону спостерігаються зміни в скелетних м'язах, хоча при цьому інактивація ацетилхолінестерази не відбувається. Таким чином, можна припустити, що порушення роботи скелетних м'язів під дією фосфорорганічних інсектицидів відбувається не лише на рівні нервово - м'язової передачі але й на рівні клітини та субклітинних структур.

Отримані результати свідчать, що інгібіторні властивості розчинів діазинону підсилювались як при підвищенні концентрацій даної речовини, так і при збільшенні тривалості її дії, в усіх досліджених нами випадках. Оскільки, даний інсектицид за своєю природою є ліпофільною молекулою та здатний

проникати в клітину за рахунок розчинення в ліпідній фазі плазматичної мембрани, і у подальшому впливати на функціональну активність клітинних структур, концентраційну та часову залежність зменшення динамічних параметрів скорочення можна пояснити збільшенням кількості речовини, що проникає через плазматичну мембрану м'язового волокна, а також її впливом на клітинні процеси. До таких ефектів фосфорорганічних інсектицидів можна віднести порушення синтезу АТФ в мітохондріях в результаті NO-опосередкованого пригнічення активності мітохондріальної АТФ-синтази [13 - 15] та окисне пошкодження мембрани міофібрил шляхом перекисного окиснення ліпідів [19]. Крім того, всі фосфорорганічні сполуки володіють високою афінністю взаємодії з мембранними фосfolіпідами, тому, припускають, що фосfolіпідні компоненти мембран є однією з основних мішеней дії цих речовин. При отруєнні фосфорорганічними інсектицидами значно змінюється ліпідний склад мембран міофібрил [12]. Зміна функціонального стану плазматичної мембрани м'язових клітин може призвести до порушення у спряженні збудження-скорочення.

## ВИСНОВКИ

Отримані результати дозволяють припустити, що описані зміни динамічних параметрів скорочення під дією діазинону є результатом його безпосереднього впливу на функціонування клітин, що призводить до зниження скоротливої активності скелетних м'язів.

## Література

1. Яструб Т.О., Кірсенко В.В. Вплив органічних розчинників на величину гранично допустимого рівня діазинону на шкірі // Сучасні проблеми токсикології. – 2007. - №4. – С.4-9.
2. (RTECS) Register of Toxic Effects of Chemical Substances / Canadian Centre for Occupational Health and Safety, 1999.
3. Каган Ю.С. Общая токсикология пестицидов. —К.: Здоров'я, 1981. —176 с.
4. Yehiaa M.A., El-Bannab S.G., Okabb A. B. Diazinon toxicity affects histophysiological and biochemical parameters in rabbits // Experimental and Toxicologic Pathology. - 2007. –Vol.59, № 3-4. - P. 215-225.
5. Paudyal B.P. Organophosphorus Poisoning // J Nepal Med Assoc. - 2008. –Vol.47, №172. – P. 251-258
6. Karalliede L., Henry J.A. Effect of organophosphates on skeletal muscle// Hum Exp Toxicol. – 1993. – V.12. - P.289-296.
7. Thiermann H., Zilkerb T., Eyerb F., Felgenhauerb N., Eyerc P., Worek F. Monitoring of neuromuscular transmission in organophosphate pesticide-poisoned patients // Toxicology Letters. – 2009. – Vol. 191, № 2-3. – P. 297-304.
8. Abdou H.M, Mazoudy R.H. Myotoxic and hyperlipidemic effects of diazinon in female rats // Journal of Medical Research Institute. – 2007. - Vol. 28, №3. –P. 292-298.
9. Vidyasagar J., Karunakar N., Reddy M.S., Rajnarayana K., Surender T., Krishna D.R. Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. // Indian J Pharmacol. – 2004. – Vol. 36. – P.76-79.
10. Yang Z.P., Dettbarn W.D. Lipid peroxidation and changes in cytochrome c oxidase and xanthine oxidase activity in organophosphorous anticholinesterase induced myopathy// J Physiol Paris. – 1998. – Vol. 92. – P. 157-161.
11. Ogutcu A., Uzunhisarcikli M., Kalenderb S., Durakc D., Bayrakdara F., Kalendera Y. The effects of organophosphate insecticide diazinon on malondialdehyde levels and myocardial cells in rat heart tissue and protective role of vitamin E // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2006. - Vol. 86, №. 2. - P. 93-98.
12. Venkatesh S., Zachariah A., Oommen A. Myofibril Membranes in Relation to the Neuromuscular Weakness of Acute Monocrotophos Poisoning // Toxicology Mechanisms and Methods. - 2006. – Vol. 16, № 8. – P.419 – 426.
13. Venkatesh S., Ramachandran A., Zachariah A., Oommen A. Mitochondrial ATP synthase inhibition and nitric oxide are involved in muscle weakness that occurs in acute exposure of rats to monocrotophos // Toxicol Mech Methods. - 2009. – Vol.19, №3. – P. 239–245.
14. Raghupathya V., Poornimab S., Sivagurub J., Ramachandran A., Zachariahc A., Oommen A. Monocrotophos toxicity and bioenergetics of muscle weakness in the rat // Toxicology. – 2010. - Vol. 277, № 1-3. – P. 6-10.
15. Chan J.Y., Chan S.H., Dai K.Y., Cheng H.L., Chou J.L., Chang A.Y. Cholinergic-receptor-independent dysfunction of mitochondrial respiratory chain enzymes, reduced mitochondrial transmembrane potential and ATP depletion underlie necrotic cell death induced by the organophosphate poison mevinphos // Neuropharmacology. – 2006. – Vol.51, №7-8. – P.1109-1119.
16. Thiermann H., Eyer P., Worek F. Muscle force and acetylcholinesterase activity in mouse hemidiaphragms exposed to paraoxon and treated by oximes in vitro // Toxicology. – 2010. – Vol. 272, №1-3, 4. – P. 46-51.
17. Thiermann H., Eyer P., Worek F., Szinicz L. Effects of oximes on muscle force and acetylcholinesterase activity in isolated mouse hemidiaphragms exposed to paraoxon. // Toxicology. – 2005. – Vol.214, №3. - P.190-197.
18. Blaquiére G.E., Waters L., Blain P.G., Williams F.M. Electrophysiological and biochemical effects of single and multiple doses of the organophosphate diazinon in the mouse // Toxicol Appl Pharmacol. -2000. – Vol.166, №2. – P. 81-91.
19. Dandapani M., Zachariah A., Kavitha M.R., Jeyaseelan L., Oommen A. Oxidative damage in intermediate syndrome of acute organophosphorus poisoning. // Ind J Med Res. – 2003. – Vol.117. - P.253–259.

---

**ВЛИЯНИЕ ДИАЗИНОНА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ****Левковская Л. В., Ноздренко Д.Н., Мирошніченко Н.С.**

Проведены тензометрические исследования динамики сокращения скелетной мышцы m.tibialis лягушки *Rana temporaria* в изотоническом режиме под воздействием растворов диазинона в концентрационном диапазоне от  $1 \cdot 10^{-6}$  до  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л. Ингибиторные свойства растворов диазинона усиливались как при повышении концентрации вещества, так и при увеличении длительности его действия. Максимальное снижение изменения длины преобладало по сравнению с соответствующими показателями силы сокращения. Сила, которую развивает мышца при таких условиях, является недостаточной, для того чтобы преодолеть приложенную нагрузку, что приводит к изменению режима сокращения с изотонического в изометрический.

**Ключевые слова:** скелетные мышцы, диазинон.

**THE EFFECT OF DIASINON ON SKELETAL MUSCLE CONTRACTION ACTIVITY****Levkivska L.V., Nozdrenko D.M., Miroshnichenko M.S.**

Tensometric researches of the dynamics of contraction of m. tibialis skeletal muscle from *Rana temporaria* under isotonic conditions and under influence of diazinon solutions in concentration range from  $1 \cdot 10^{-6}$  to  $1 \cdot 10^{-5}$  mmol/l were conducted. Inhibitory properties of diazinon solutions were enhanced during concentration increase and time of duration. Maximal decrease of muscle length change was more substantial than such force. The force generated by muscle under such conditions is insufficient to overcome applied load that causes change of isotonic contraction to isometric.

**Key words:** skeletal muscles, diazinon.

---