

ВПЛИВ УЛЬТРАЗВУКУ РІЗНИХ РЕЖИМІВ НА СУПЕРПРЕЦИПІТАЦІЮ ОКИСНОМОДИФІКОВАНОГО АКТОМІОЗИНОВОГО КОМПЛЕКСУ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ КРОЛЯ

О. В. ШЕЛЮК, Н. Є. НУРИЩЕНКО, К. О. МЕДИНСЬКА

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;
e-mail: shelyuk_olga@ukr.net

Проведено дослідження впливу ультразвуку неперервного та імпульсного (2 мс) режимів на реакцію суперпрєципїтації окисномодифікованого актоміозину скелетних м'язів кроля. За одержаними кінетичними кривими реакції визначили величину суперпрєципїтації ($A_m - A_0$). Нормовану за значенням A_m максимальну швидкість V_n зміни A у часі використовували як головний кінетичний параметр. Показано, що застосування ультразвуку неперервного режиму для окисномодифікованого актоміозину супроводжується вірогідним зниженням величини суперпрєципїтації відносно контролю. Проте імпульсний ультразвук спричинює вірогідне збільшення величини суперпрєципїтації, крім значення ($A_m - A_0$) у разі застосування інтенсивності $0,2 \text{ Вт/см}^2$. Як неперервний, так і імпульсний ультразвук інтенсивністю 1 Вт/см^2 зменшують параметр V_n реакції суперпрєципїтації окисномодифікованого актоміозинового комплексу відносно інших значень інтенсивності ультразвуку, що можливо зумовлено його тепловим впливом. В цілому дані, які було одержано, дають підставу припустити, що ефекти неперервного та імпульсного ультразвуку на реакцію суперпрєципїтації окисленого протеїнового комплексу актоміозину тотожні.

Ключові слова: ультразвук, актоміозиновий комплекс, його окисна модифікація, суперпрєципїтація, кінетичні параметри.

М'язова патологія може виникати не лише під час різних захворювань, але також і як результат прямого механічного впливу, тобто м'язової травми. Важливим наслідком м'язової травми є розвиток у тканині запального процесу [1, 2]. З даних літератури відомо, що у разі запалення за дії цитокінів та інших медіаторів нейтрофіли генерують активні форми кисню та інші оксиданти. Азотні, гідроксильні та пероксидні радикали виявляють високу реакційну здатність по відношенню до біомакромолекул, зокрема протеїнів. При цьому може відбуватися окислення амінокислотних залишків, що позначається як на структурі, так і на функціонуванні протеїнів. Таким чином, під впливом вільних радикалів загальна запальна відповідь значно підсилюється, що ускладнює відновлення м'язів після травмування [3, 4]. В останні роки істотну увагу дослідників приділяють вивченню модифікації протеїнових молекул під впливом активних форм кисню. Проте не існує даних про окисну модифікацію м'язового протеїнового комплексу актоміозину (АМ).

На сьогодні традиційно для усунення запалення під час терапії м'язової травми засто-

совують нестероїдні протизапальні препарати. Дослідження А. Vignaud та ін. [5] показали, що, незважаючи на зменшення вторинного пошкодження м'язової тканини за дії цих препаратів, нормальна регенерація м'яза значно пригнічується.

Саме тому пошук терапевтичних засобів, які зменшували б вторинне пошкодження м'яза активними формами кисню та сприяли його нормальній регенерації – одна з актуальних проблем терапії м'язової травми. Таким засобом може бути терапевтичний ультразвук (УЗ), оскільки було виявлено його здатність зменшувати інтенсивність вільнорадикального окислення та оптимізувати роботу антиоксидантних систем за експериментального запалення [6]. Також із даних літератури відомо, що терапевтичний УЗ стимулює регенерацію тканин. Проте існують неоднозначні погляди щодо механізму позитивної дії УЗ у відновленні функціонування м'язів після травми.

Відомо, що реакція суперпрєципїтації (СПП) тісно пов'язана з актоміозиновою АТР-азою, тому що є її наслідком і моделлю м'язового скорочення [7]. Враховуючи наведене вище, метою нашого дослідження стало з'ясування впливу УЗ на параметри реакції СПП АМ в умовах окисної модифікації.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на актоміозині скелетних м'язів кроля породи Радянська шиншила (Soviet Shinshilla). АМ виділяли за методикою Пеппі, наведеною в роботі А. Д. Тартаковського [8]. Концентрацію актоміозинового комплексу визначали за біуретовою реакцією, яка була оптимальною в діапазоні досліджуваних концентрацій [9]. Озвучення АМ скелетних м'язів кроля проводили з використанням приладу УЗТ-3.04 С (Україна) впродовж 5 хв. Частота ультразвукового сигналу становила 0,88 МГц. Використовували неперервний та імпульсний режими ультразвукового впливу з інтенсивністю: 0,05; 0,2; 0,4; 0,7 і 1,0 Вт/см².

Окисну модифікацію АМ проводили за методом О. Ю. Дубініної зі співавторами [10]. Метод оцінки окисної модифікації базується на визначенні вмісту 2,4-динітрофенілгідрозонів, що утворюються за взаємодії окислених амінокислотних залишків із 2,4 динітрофенілгідрозоном (2,4-ДНФГ). Для ініціації окислення протеїну в реакційну суміш (реакцію проводили в 0,066 М фосфатному буфері, рН 7,4) додавали середовище Фентона: FeSO₄ (10⁻⁵ М) і H₂O₂ (3·10⁻⁴ М). Зразки інкубували в темноті при 37 °С протягом 15 хв.

Вплив УЗ на функціональні показники актоміозину в умовах окисної модифікації досліджували за кінетикою реакції СПП.

Реєстрацію кінетичних кривих СПП актоміозинового комплексу проводили на спектрофотометрі SPECORD M40 (Німеччина). Кінетику процесу СПП протеїнового комплексу реєстрували за зміною величини адсорбції A на довжині хвилі 450 нм в кюветках (1 см) при температурі 25 °С в реакційній суміші (загальний об'єм – 3 мл): 1 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂, 50 мМ KCl, 20 мМ трис-НCl, рН 7,5, кінцева концентрація протеїну – 0,2 мг/мл. Реакцію СПП актоміозину ініціювали внесенням до реакційної суміші розчину АТР (кінцева концентрація 0,1 мМ). Контролем були проби, що не містили АТР. У дослідах реєстрували типові експериментальні криві СПП актоміозинового комплексу. За одержаними кінетичними кривими розраховували величину СПП за формулою ($A_m - A_0$), де A_0 – початкова адсорбція актоміозину в ході реакції СПП, A_m – адсорбція актоміозину після завершення реакції СПП [7, 11].

Оскільки реакція СПП актоміозину являє собою S-подібну криву (зміна адсорбції A в

часі) вивчення кінетики даного процесу проводили за методом [12].

Із лінеаризованих кривих СПП в координатах $\{\ln[(A_m - A)/A]; \ln t\}$, де A_m – величина максимальної адсорбції, вираховували проміжні кінетичні параметри: n – тангенс кута нахилу кривих та τ – характеристичний час, за який СПП досягає напівмаксимального рівня ($1/2 A_m$). Визначення n і τ проводили для розрахунку нормованої максимальної швидкості (V_n):

$$V_n = \frac{1}{A_m} \frac{dA}{dt} = \left| -\frac{(n-1)^{\frac{n-1}{n}} \cdot (n+1)^{\frac{n+1}{n}}}{4n\tau} \right|.$$

Статистичну обробку результатів експериментів та кінетичний аналіз проводили в програмі Origin 8.0 (OriginLab Corporation, США). У разі лінеаризованих механокінетичних графіків типове значення коефіцієнта кореляції r становило 0,977–0,998.

Результати досліджень оброблено статистично з використанням t -критерію Стьюдента. Статистичний аналіз одержаних даних проводили із залученням загальновідомих стандартних методів.

Результати та обговорення

Вплив неперервного та імпульсного УЗ на величину реакції СПП комплексу АМ скелетних м'язів кроля в умовах окисної модифікації. У попередніх наших дослідженнях щодо впливу імпульсного (2 мс) та неперервного УЗ (УЗІ та УЗН відповідно) на реакцію СПП АМ скелетних м'язів кроля [13] було показано високу чутливість цього протеїнового комплексу до дії УЗ, а саме зростання швидкості СПП порівняно з контролем. Встановлено, що найбільша величина нормованої максимальної швидкості СПП спостерігається за застосування УЗ з інтенсивністю 0,7 Вт/см² для УЗН, і для УЗІ (2 мс) – 0,4 Вт/см².

Беручи до уваги наведені вище дані в подальших порівняльних дослідженнях ми вивчали вплив УЗ різних режимів на реакцію СПП АМ в умовах його окисної модифікації.

Результати експериментів показали, що модифікація АМ вільними радикалами, які генеруються реактивом Фентона, та дія неперервного УЗ різної інтенсивності спричинює певні зміни в реакції СПП (рис. 1).

В цілому за масивом проведених експериментів ($n = 7$) було одержано такі значення величини СПП: для нативного АМ ($A_m - A_0$) = 0,147; для окисленого – ($A_m - A_0$) = 0,165. Одночасне застосування УЗ

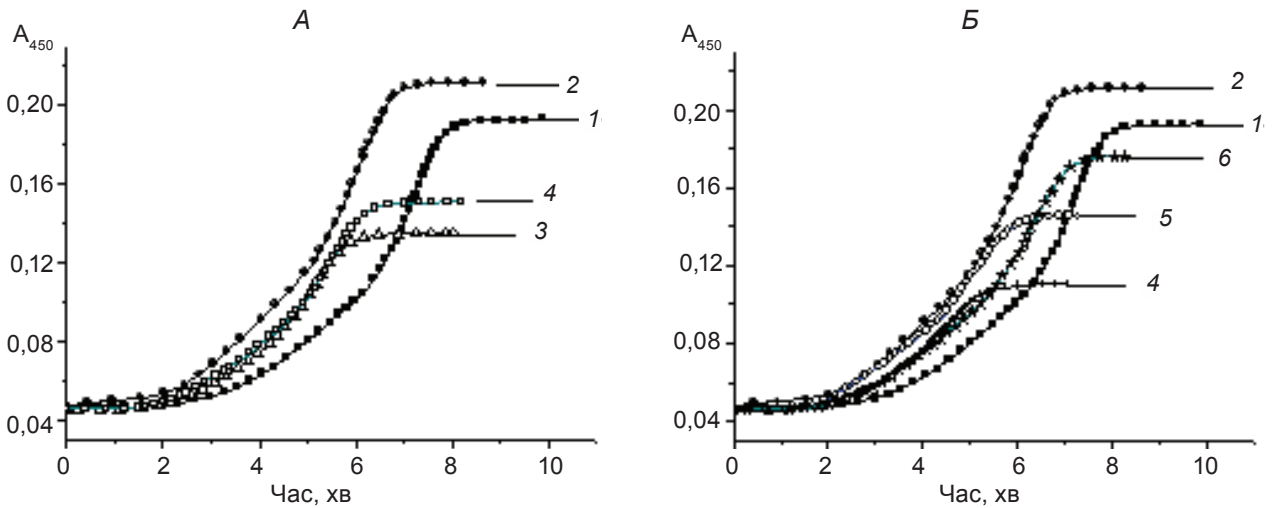


Рис. 1. Типові кінетичні криві реакції суперпреципітації актоміозину скелетних м'язів кроля за дії неперервного ультразвуку різної інтенсивності в умовах окисної модифікації: 1 – контроль (нативний актоміозин); 2 – окислений актоміозин; за дії УЗ ($Вт/см^2$): 3 – 0,05; 4 – 0,2; 5 – 0,4; 6 – 0,7; 7 – 1,0

неперервного режиму та дії вільних радикалів завжди супроводжується вірогідним зниженням величини СПП як відносно окисленого, так і відносно нативного актоміозинового комплексу. Ультразвук інтенсивністю 0,05 $Вт/см^2$ вірогідно пригнічує процес СПП, величина СПП є зниженою на 39,4 % ($P < 0,05$) відносно контролю, який було прийнято за 100%. Дія ультразвуку з інтенсивністю 0,2 і 0,4 $Вт/см^2$ є подібною, показники величини СПП становлять 0,105 та 0,100 відповідно. Тобто УЗ цієї інтенсивності вірогідно пригнічує величи-

ну СПП. Застосування УЗН з інтенсивністю 0,7 $Вт/см^2$ хоча і спричинює незначне зменшення ($A_m - A_0$) – на 11,5 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем, проте найбільше підвищує величину СПП окисленого АМ (0,130) порівняно з УЗ іншої інтенсивності, тим самим наближаючи значення СПП до контрольного. Максимальне пригнічення реакції СПП спостерігається за дії УЗН 1,0 $Вт/см^2$ – на 56,1% відносно контролю. Одержані результати добре узгоджуються з даними літератури і свідчать про позитивний вплив УЗ на процеси вільнорадикального

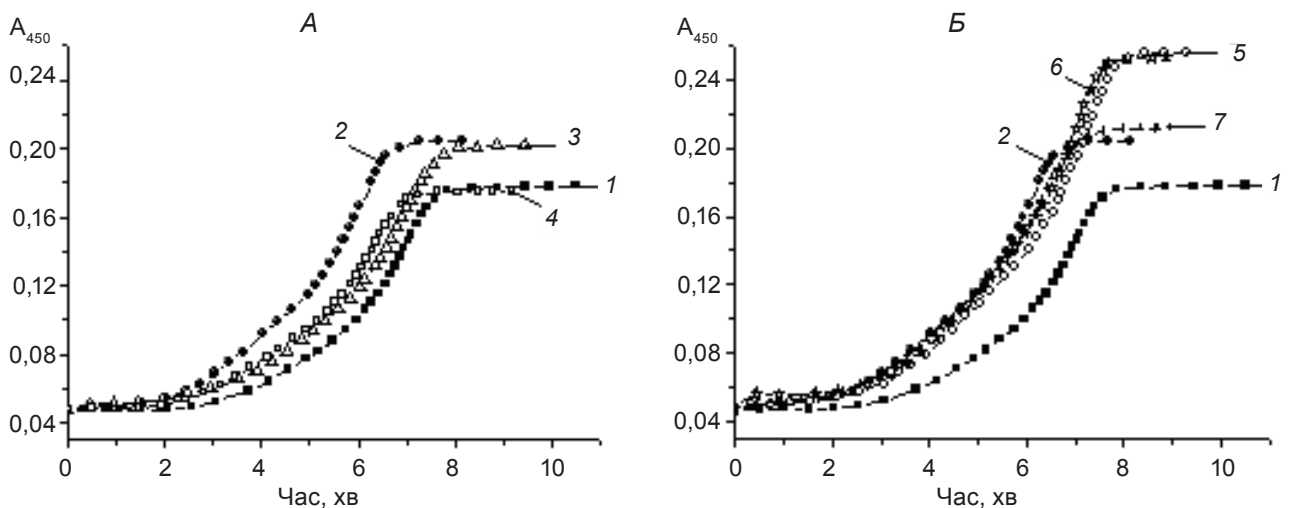


Рис. 2. Типові кінетичні криві реакції суперпреципітації актоміозину скелетних м'язів кроля за дії імпульсного (2 мс) ультразвуку різної інтенсивності в умовах окисної модифікації: 1 – контроль (нативний актоміозин); 2 – окислений актоміозин; за дії УЗ ($Вт/см^2$): 3 – 0,05; 4 – 0,2; 5 – 0,4; 6 – 0,7; 7 – 1,0

окислення у разі експериментального запалення, а також з відомостями про те, що в умовах дії УЗ інтенсивністю 1,0 Вт/см² відбувається ультразвукове нагрівання розчину АМ [5].

У дослідях з вивчення дії імпульсного УЗ на СПП актоміозинового комплексу в умовах окисної модифікації було встановлено (рис. 2), що всі величини СПП, крім значення ($A_m - A_0$) у разі застосування УЗ інтенсивністю 0,2 Вт/см², окисленого АМ були вірогідно більшими відносно контролю. Такий характер впливу імпульсного УЗ можна пояснити, з огляду на дані літератури, особливостями застосування режиму УЗ, коли УЗ діє з проміжком у часі, що дорівнює 2 мс [6]. УЗІ інтенсивністю 0,05 Вт/см² зумовлює незначне підвищення величини СПП (на 5,4%) відносно ($A_m - A_0$) нативного АМ. У разі дії із інтенсивністю 0,2 Вт/см² величина СПП зменшується відносно контролю на 12,9% і становить 0,128. В той самий час максимальні значення адсорбції A_m та величини СПП за впливу УЗІ інтенсивністю 0,4 та 0,7 Вт/см² вірогідно зростають в середньому на 40,8% ($P \leq 0,05$), а за застосування УЗІ 1,0 Вт/см² ($A_m - A_0$) – лише на 11,5% порівняно з контрольною величиною.

Кінетичні параметри реакції СПП АМ-комплексу скелетних м'язів кроля в умовах впливу УЗ за різних режимів та окисної модифікації. Для кількісного визначення зміни динаміки СПП за дії УЗ різних режимів відповідні криві досліджуваної реакції аналізували, використовуючи вищенаведений кінетичний метод,

а саме проводили лінеаризацію кінетичних кривих реакції СПП (лінеаризовані кінетичні графіки не наведено, $r = 0,977-0,998$) з наступним розрахунком проміжних кінетичних параметрів: логарифмічний коефіцієнт крутизни n і характеристичний час τ , за який СПП досягає напівмаксимального рівня. Так, у разі максимальної адсорбції A_m 0,19 та 0,21 (рис. 1, кінетичні криві 1 та 2 відповідно) ці показники становлять: 2,47 і 0,37 хв та 2,34 і 0,35 хв відповідно. За формулою (1) було розраховано величину нормованої максимальної швидкості V_n , які для кривих 1 і 2 (рис. 1) відповідно становили: 1,98 та 2,16 хв⁻¹.

В умовах дії реактиву Фентона середні значення максимальної нормованої швидкості V_n , у разі застосування УЗН інтенсивністю 0,4 та 0,7 Вт/см², збільшуються на 22–33% (відмінності вірогідні щодо контролю, $P \leq 0,05$) (рис. 3, А). За дії УЗН інтенсивністю 0,2 Вт/см² значення показника V_n зменшується на 28% ($P \leq 0,05$). Як виявилось, УЗН інтенсивністю 0,05 та 1,0 Вт/см² в умовах окисної модифікації спричиняє зниження V_n до контрольного значення. Цей факт є досить цікавим, оскільки з даних літератури відомо, що дія УЗ інтенсивністю 0,05 Вт/см² вважається не-тепловою, а дія УЗ інтенсивністю 1,0 Вт/см² – тепловою.

У разі порівняння значень нормованої максимальної швидкості V_n в контролі та в умовах окисної модифікації АМ із застосуванням УЗІ 0,05 Вт/см² встановлено, на відміну від результатів експериментів з УЗН тієї самої

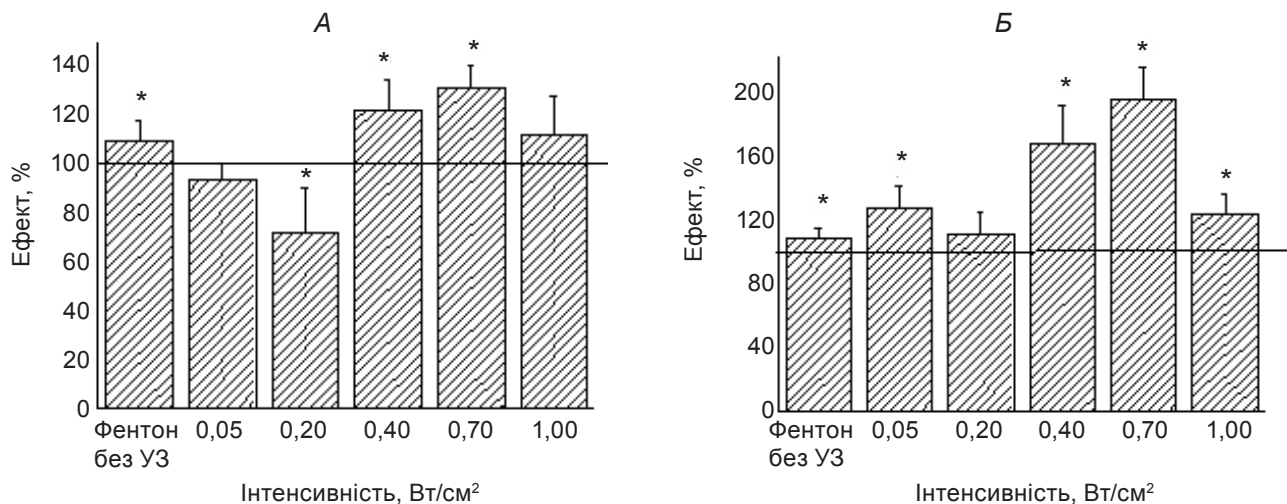


Рис. 3. Дія УЗ за різних режимів та інтенсивності в умовах окисної модифікації (у % порівняно з контролем, прийнятим за 100%) на нормовану максимальну швидкість реакції суперпреципітації актоміозину скелетних м'язів кроля (V_n): А – неперервний ультразвук, Б – імпульсний ультразвук 2 мс ($M \pm m, n = 7$); * різниця вірогідна відносно контролю при $P < 0,05$

інтенсивності, вірогідне зростання цього показника на 28% ($P < 0,05$) (рис. 3, Б). Що ж стосується зміни параметра V_n , у разі УЗІ інтенсивністю 0,4 і 0,7 Вт/см², то вона мала ті ж тенденції що й за УЗН, а саме середні значення нормованої максимальної швидкості відповідно вірогідно зростають на 70 та 95% відносно контролю.

Як було встановлено, застосовані нами режими УЗ інтенсивністю 1,0 Вт/см² в умовах окислення скоротливого протеїнового комплексу зменшували параметр V_n порівняно із застосуванням УЗ іншої інтенсивності, але відносно контролю V_n залишається більшою на 12 і 24% відповідно.

Таким чином, одержані результати дозволяють зробити низку узагальнень та припущень. По-перше, при вивченні кінетики СПП в умовах дії реактиву Фентона встановлено, що значення нормованої максимальної швидкості V_n зростає, а такі кінетичні параметри як n і τ зменшуються. Збільшення максимальної швидкості, на нашу думку, свідчить про підвищення доступності АТР-азного центру внаслідок зміни структури комплексу АМ за впливу вільних радикалів. По-друге, застосування УЗН за окисної модифікації АМ супроводжується вірогідним зниженням величини СПП відносно контролю. Проте у дослідях з вивчення дії УЗІ на СПП АМ в окисній модифікації встановлено, що всі величини СПП, крім значення $(A_m - A_0)$, у разі застосування УЗІ інтенсивністю 0,2 Вт/см², окисленого АМ вірогідно більші порівняно з контролем. По-третє, параметр V_n , у разі як УЗН, так і УЗІ інтенсивністю 0,4 та 0,7 Вт/см² характеризується однаковими тенденціями, а саме його середні значення нормованої максимальної швидкості вірогідно зростають відносно контролю.

Порівнюючи одержані в цій роботі дані з одержаними нами раніше за вивчення різних режимів УЗ на реакцію СПП нативного актомиозинового комплексу [13], можна стверджувати, що ефекти УЗН та УЗІ на реакцію СПП окисномодифікованого АМ тотожні. Отже можна припустити, що дія УЗ інтенсивністю 0,4 та 0,7 Вт/см² максимально ефективна в умовах експериментального окисного модифікування актомиозинового комплексу скелетних м'язів кроля. Що ж стосується закономірностей дії УЗІ на величину та кінетичні параметри СПП, то це питання потребує подальших досліджень. Втім, беручи до уваги імпульсний характер дії УЗ [6], можна припустити, що його вплив на V_n СПП

скоротливого протеїнового комплексу опосередкований особливостями подачі ультразвукового сигналу через певні проміжки часу.

Робота виконувалась за рахунок державних коштів, наданих як грант Президента України.

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА РАЗНЫХ РЕЖИМОВ НА СУПЕРПРЕЦИПИТАЦИЮ ОКИСЛИТЕЛЬНОМОДИФИЦИРОВАННОГО АКТОМИОЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА

*О. В. Шелюк, Н. Е. Нурищенко,
Е. А. Медынская*

Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: shelyuk_olga@ukr.net

В работе было проведено исследование влияния ультразвука непрерывного и импульсного (2 мс) режимов на реакцию суперпреципитации окислительномодифицированного актомиозина скелетных мышц кролика. По кинетическим кривым определяли величину суперпреципитации $(A_m - A_0)$, время $t_{1/2}$, которое необходимо для достижения половины ее величины, а также рассчитывали нормированную максимальную скорость данной реакции V_n . Показано, что применение ультразвука непрерывного режима к окислительномодифицированному актомиозину сопровождалось достоверным снижением величины суперпреципитации относительно контроля. Однако импульсный ультразвук вызывал достоверное увеличение величины суперпреципитации кроме значения $(A_m - A_0)$ при применении интенсивности 0,2 Вт/см². Как непрерывный, так и импульсный ультразвук при интенсивности 1 Вт/см² уменьшали параметр V_n реакции суперпреципитации окислительномодифицированного актомиозинового комплекса относительно других использованных значений интенсивности, что, вероятно, вызвано тепловым эффектом ультразвука. В целом полученные данные дают основание допустить, что эффекты непрерывного и импульсного ультразвука на реакцию суперпреципитации окисленного протеинового комплекса актомиозина тождественны.

Ключевые слова: ультразвук, актомиозин, его окислительная модификация, суперпреципитация, кинетические параметры.

**INFLUENCE OF VARIOUS REGIMENS
ULTRASAUND ON OXIDE-MODIFIED
ACTOMYOSIN SUPERPRECIPITATION
REACTION FROM SKELETAL MUSCLE
OF RABBIT**

*O. V. Shelyuk, N. Ye. Nurishchenko,
K. O. Medynska*

Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: shelyuk_olga@ukr.net

S u m m a r y

A comparative study of rabbit skeletal muscles oxide-modified actomyosin superprecipitation reaction in dependence on continuous and impulsive (2 ms) ultrasound regimens was studied. From the analyses of kinetic curves the effect of the value of superprecipitation ($A_m - A_0$), time $t_{1/2}$, required for achievement of half of its value was determined, and the normalized maximal rate of this reaction V_n was also calculated. It is shown that the use of continuous ultrasound to oxide-modified actomyosin was associated with a significant decrease of superprecipitation relative to controls. However, pulsed ultrasound caused a significant increase in superprecipitation value except for the values ($A_m - A_0$) in the application of the intensity of 0.2 W/cm². The oxide-modified actomyosin superprecipitation value under the effect of continuous and impulsive ultrasound at intensity 1 W/cm² in relative to control and all other applied intensities decrease to the most extent. It is caused perhaps by thermal influence of ultrasound. In general, the data obtained give reason to assume that the effects of continuous and pulsed ultrasound on the reaction of oxide-modified proteins complex superprecipitation are identical.

Key words: ultrasound, actomyosin, oxidative modification, superprecipitation, kinetic parameters.

1. Scott A., Khan K. M., Roberts C. R. et al. // Br. J. Sports Med. – 2004. – **38**. – P. 372–380.
2. Tidball J. G. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2005. – **288**. – P. 345–353.
3. Brickson S., Ji L. L., Schell K. et al. // J. Appl. Physiol. – 2003. – **95**. – P. 969–976.
4. Pizza F. X., Koh T. J., McGregor S. J. et al. // J. Appl. Physiol. – 2002. – **92**. – P. 1873–1878.
5. Vignaud A., Cebrian J., Martelly I. et al. // Exp. Physiol. – 2005. – **90**. – P. 487–495.
6. Нурищенко Н. Є., Мирошніченко Н. С. // Фізика живого. – 2004. – **12**, № 1. – С. 73–81.
7. Кофман Е. Б. / Сб.: Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков / Под ред. Г. Р. Иваницкого. – Л.: Наука. – 1978. – С. 40–54.
8. Тартаковский А. Д. / Сб.: Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков / Под ред. Г. Р. Иваницкого. – Л.: Наука, 1978. – С. 55–76.
9. Северин С. Е., Соловьева Г. А. Практикум по биохимии. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1989. – 509 с.
10. Дубинина Е. Е., Бурмистров С. О., Ходов Д. А., Поротов И. Г. // Вопросы мед. химии – 1995. – **41**, №1. – С. 24–26.
11. Ebashi S. // J. Biochem. – 1961. – **50**. – P. 236.
12. Burdyga Th. V., Kosterin S. A. // Gen. Physiol. Biophys. – 1991. – N 10. – P. 589–598.
13. Мединська К. О., Шелюк О. В., Омелянюк В. С., Нурищенко Н. Є. // Укр. біохім. журн. – 2010. – **82**, №1. – С. 77–81.

Отримано 05.09.2011