

ВПЛИВ НЕПЕРЕРВНОГО ТА ІМПУЛЬСНОГО УЛЬТРАЗВУКУ НА РЕАКЦІЮ СУПЕРПРЕЦИПІТАЦІЇ АКТОМІОЗИНУ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ КРОЛЯ

К. О. МЕДИНСЬКА, О. В. ШЕЛЮК, В. С. ОМЕЛЬЯНИЮК,
Н. Є. НУРИЩЕНКО, Л. І. ПЕЛЮХ

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

Проведено порівняльне дослідження впливу ультразвуку неперервного та імпульсного (2 мс) режимів на реакцію суперпреципітації актоміозину скелетних м'язів кроля. З одержаних кінетичних кривих визначали величину суперпреципітації ($D_m - D_0$), час $t_{1/2}$, який необхідний для досягнення половини її величини, а також розраховували нормовану максимальну швидкість даної реакції V_n . Показано, що найбільший ефект спостерігається у разі застосування неперервного ультразвуку інтенсивністю $0,7 \text{ Вт/см}^2$ (величина суперпреципітації і V_n були максимальними), а для імпульсного — при $0,4 \text{ Вт/см}^2$. Як неперервний, так і імпульсний ультразвук при інтенсивності 1 Вт/см^2 найбільш зменшує величину суперпреципітації відносно контролю і всіх інших величин застосованої інтенсивності, що, можливо, пов'язано з тепловим впливом ультразвуку такої інтенсивності. В цілому ж дані, які було одержано, дають підставу припускати, що в актоміозині встигають відбутися зміни адаптивного характеру до дії імпульсного ультразвуку, оскільки сигнал даного режиму діє з проміжками в часі.

Ключові слова: ультразвук, актоміозин, суперпреципітація, величина суперпреципітації, кінетичні параметри.

Поширене використання ультразвуку (УЗ) у медичній діагностиці, терапії і біотехнології створює нагальну необхідність дослідження його впливу на ензими, м'язи та інші біологічно важливі об'єкти на молекулярному рівні. Ультразвук помітно впливає на структуру і функції протеїнів. Ці зміни залежать від розмірів і форми молекул, від природи присутніх у розчині сторонніх речовин і параметрів ультразвукового поля. Молекули фібрилярних протеїнів, на відміну від глобулярних, досить чутливі до дії УЗ, зокрема ті, структура яких не пов'язана жорсткими поперечними зв'язками і може змінюватись за відносно слабких впливів. До таких протеїнів належить м'язовий протеїновий комплекс — актоміозин [1]. З урахуванням вищенаведеного і, зокрема, беручи до уваги поширене застосування УЗ, з'ясування механізмів його дії, в тому числі на м'язовий протеїновий комплекс, є важливим як з фундаментальної, так і з практичної точок зору. Деякі автори вважають, що реакцію суперпреципітації (СПП) актоміозину можна розглядати як спрощену модель м'язового скорочення [2, 3]. СПП дає певне уявлення про процеси скорочення-розслаблення м'язів на молекулярному рівні, а також дозволяє вивчати деякі властивості ско-

ротливого комплексу і вплив на нього різних факторів, зокрема УЗ. Під час дослідження кінетики окремих стадій СПП, можна одержати інформацію про скоротливий процес [4].

З метою вивчення закономірностей дії УЗ на скоротливу систему м'язів ми провели порівняльне дослідження впливу неперервного (УЗН) та імпульсного (УЗІ) 2 мс режимів на СПП актоміозину скелетних м'язів кроля.

Матеріали та методи

Дослідження проводили на актоміозині скелетних м'язів кроля породи Радянська шиншила (Soviet Shinshilla). Забій тварин ($n = 4$) здійснювали за умови попереднього наркотизування їх нембуталом. Виділення актоміозину проводили за методикою Перрі, описаною в роботі А. Д. Тартаковського [5], з модифікаціями, розробленими у відділі біофізики НДІ фізіології імені академіка Петра Богача. Актomioзин додатково очищували центрифугуванням при 20 000 об/хв протягом однієї години. Чистоту протеїну контролювали електрофоретично. Визначали концентрацію актоміозину за біуретовою реакцією, яка є оптимальною у діапазоні концентрацій від 0,5 до 10 мг/мл [6]. Озвучували одержаний актоміозин на УЗ-приладі УЗТ-3.04 С (Україна) уп-

родовж 5 хв. Частота ультразвукового сигналу становила 0,88 МГц. Використовували такі режими ультразвукового впливу: 1) неперервний з інтенсивністю 0,05; 0,2; 0,4; 0,7 і 1,0 Вт/см²; 2) імпульсний 2 мс з інтенсивністю 0,05; 0,2; 0,4; 0,7 і 1,0 Вт/см².

Одержували кінетичні криві СПП актоміозину на спектрофотометрі SPECORD M40 (Німеччина) за реєструванням зміни оптичної густини при довжині хвилі 450 нм в 1 см кюветках при 25 °С у реакційній суміші загального об'єму 3 мл (мМ): MgCl₂ – 1,0; CaCl₂ – 1,0; KCl – 50,0; ЕГТА – 0,1; трис-НСl – 20,0; рН 7,5; кінцева концентрація протеїну – 0,2 мг/мл. Реакцію СПП актоміозину ініціювали внесенням у реакційну суміш розчину АТР (кінцева концентрація 0,1 мМ). Контролем були проби, що не містили АТР. За 100% приймали величину СПП протеїну без впливу УЗ. У дослідах реєстрували типові експериментальні криві СПП актоміозину. З одержаних кінетичних кривих розраховували величину СПП за формулою ($D_m - D_0$), де D_0 – початкова оптична густина актоміозину, D_m – оптична густина актоміозину після завершення СПП, а $t_{1/2}$ – час, потрібний для досягнення половини ($D_m - D_0$) [7, 8].

Оскільки СПП актоміозину за характером змін оптичної густини в часі не має принципових відмінностей від досліджених механокінетичних параметрів процесу скорочення-розслаблення гладеньком'язових препаратів у роботах [4, 9], даний метод ми застосовували також для аналізу кривих СПП. Метод ґрунтується на кількісному визначенні S-подібної кривої відповідно до емпіричного рівняння:

$$D = D_m \frac{t^n}{\tau^n + t^n} \quad (1)$$

З лінеаризованих кривих СПП у координатах $\{\ln[(D_m - D)/D]; \ln t\}$, де D – величина миттєвої оптичної густини, D_m – величина максимальної оптичної густини, t – час реакції СПП, вираховували параметри n – тангенс кута нахилу кривих та τ – характеристичний час, за який СПП досягає напівмаксимального рівня ($1/2 D_m$). Визначення n і τ проводили для розрахунку головної кінетичної характеристики – нормованої максимальної швидкості (V_n):

$$V_n = \frac{1}{D_m} \frac{dD}{dt} = \left| \frac{(n-1)^{\frac{n-1}{n}} \cdot (n+1)^{\frac{n+1}{n}}}{4n\tau} \right| \quad (2)$$

Статистичну обробку результатів експериментів та механокінетичний аналіз проводили у програмі Origin 8.0 (Origin Lab Corporation, США). У випадку лінеаризованих механокінетичних графіків типове значення коефіцієнта кореляції r становило 0,978–0,998.

Результати та обговорення

Результати експериментів показали, що як УЗН, так і УЗІ 2 мс спричинюють певні зміни у процесі СПП. На рис. 1 та 2 представлено типові кінетичні криві реакції СПП актоміозину за дії УЗ різних режимів.

Як видно з одержаних результатів (рис. 1, А) УЗН з інтенсивністю 0,05 Вт/см² має найбільший час ($t_{1/2}$), який необхідний для досягнення половини величини СПП ($D_m - D_0$), що дорівнює 13 хв. За умов впливу УЗ з інтенсивністю 0,05 та 0,2 Вт/см² величини СПП близькі до контрольного значення 0,117 відн. од. і відповідно становлять 0,119 і 0,118 відн. од.

У разі дії УЗ з інтенсивністю 0,2, 0,4 і 0,7 Вт/см² (рис. 1, А, Б) $t_{1/2}$ зменшується і складає відповідно 10, 9 та 8,4 хв. Найбільша величина СПП (0,121 відн. од.) спостерігається при інтенсивності УЗН 0,7 Вт/см², тоді як при 0,4 Вт/см² вона становить 0,108 відн. од. УЗН з інтенсивністю 1 Вт/см² спричинює зменшення величини СПП (0,099 відн. од.), а також зменшення $t_{1/2}$, який становить 8 хв порівняно з контролем і з іншими величинами.

УЗІ 2 мс впливає на СПП актоміозину дещо по-іншому. За дії УЗІ 2 мс з інтенсивністю 0,4 Вт/см² (рис. 2, А) відбувається швидка СПП актоміозину, найбільша величина якої складає 0,133 відн. од. у порівнянні з контролем і з іншими величинами. Значення оптичної густини (D) також було найвищим, що пояснюється утворенням більшої кількості агрегатів актоміозину. При цьому $t_{1/2}$ дорівнює 6,9 хв. Результати наших досліджень підтверджують раніше одержані дані [11], в яких найбільший ефект (зсув максимуму спектра флуоресценції актоміозину скелетних м'язів кроля) також спостерігається при озвученні УЗІ 2 мс з інтенсивністю 0,4 Вт/см². Величини СПП та $t_{1/2}$ із застосуванням УЗІ 0,05 і 0,2 Вт/см² зменшувались відносно контролю і відповідно становили 0,087 відн. од. і 7,9 хв та 0,085 відн. од. і 7,3 хв. Вплив УЗ інтенсивністю 0,7 і 1 Вт/см² (рис. 2, Б) за амплітудою є подібним, при цьому значення величини СПП зменшується (0,081 і 0,068 відн. од. відповідно). За даних умов також спостерігається зниження показників оптичної густини (утворюється менше агрегатів), $t_{1/2}$ становить 5,9 і 6,2 хв відповідно.

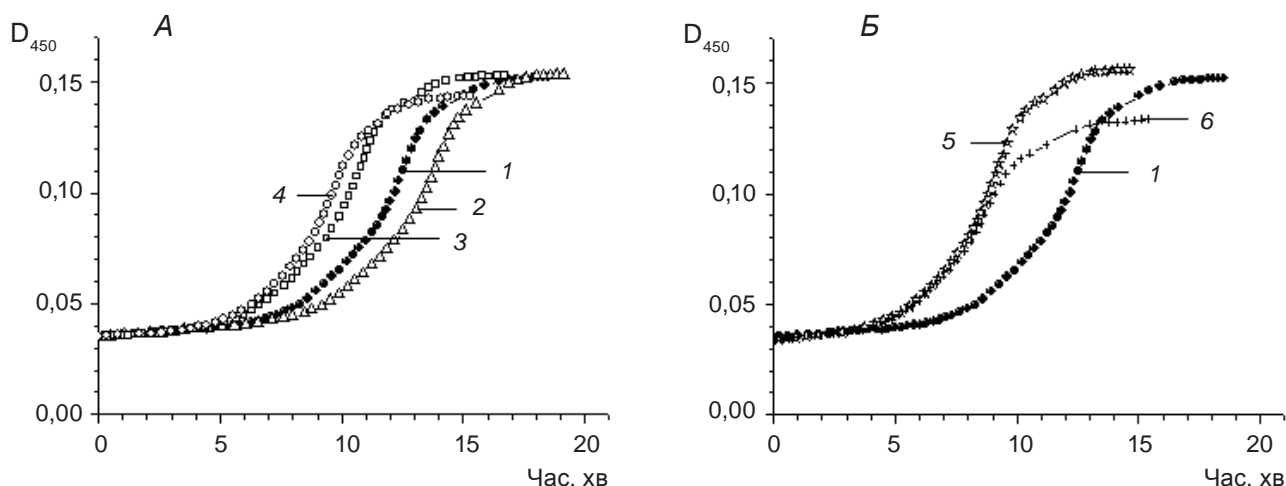


Рис. 1. Кінетичні криві реакції суперпреципітації актоміозину скелетних м'язів кроля за дії неперервного ультразвуку з інтенсивністю 0,05–0,4 Вт/см² (А) і 0,7 та 1 Вт/см² (Б): 1 – контроль; 2 – 0,05 Вт/см²; 3 – 0,2 Вт/см²; 4 – 0,4 Вт/см²; 5 – 0,7 Вт/см²; 6 – 1 Вт/см²

Отже, в наших дослідженнях було визначено, що УЗІ порівняно з УЗН спричинює менший вплив на величину СПП актоміозину. Одержані нами результати підтверджуються даними інших авторів [12–14], з яких видно, що неперервний сигнал постійно діє, спричиняючи більший вплив, а сигнал імпульсного УЗ діє з проміжками в часі. Отже можливо, що актоміозин встигає адаптуватися до дії імпульсного УЗ.

Слід зазначити, що як імпульсний УЗ 2 мс, так і неперервний УЗ за інтенсивності 1 Вт/см² найбільше зменшує величину СПП відносно контролю та інших застосованих інтенсивностей, що, ймовірно, викликано тепловим ефектом УЗ за такої інтенсивності. Одер-

жані результати також узгоджуються з даними літератури [1, 10] і додатково підтверджують, що за умов дії УЗ 1 Вт/см² відбувається ультразвукове нагрівання розчину актоміозину.

Порівняно з вищезастосованою методикою Ебаші С. [7], механокінетичний аналіз Ф. В. Бурдиги і С. О. Костеріна [4] дозволяє розрахувати нормовану максимальну швидкість СПП, що є важливим параметром даної реакції. Саме тому кількісний ефект УЗ на динаміку СПП ми оцінювали за кінетичного аналізу зареєстрованих нами кривих [4].

Як видно з результатів експериментів (лінеаризовані графіки не наведено, $r = 0,978–0,998$), УЗ як неперервного, так і імпульсного режимів спричинює зменшення параметра τ

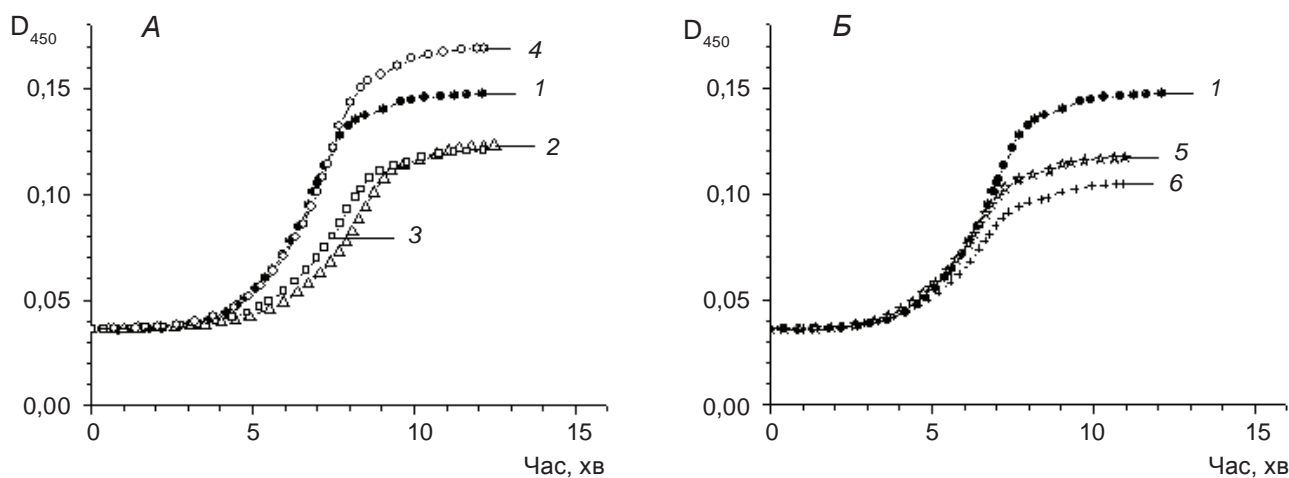


Рис. 2. Кінетичні криві реакції суперпреципітації актоміозину скелетних м'язів кроля за дії імпульсного ультразвуку 2 мс з інтенсивністю 0,05–0,4 (А) і 0,7 та 1 Вт/см² (Б): 1 – контроль; 2 – 0,05 Вт/см²; 3 – 0,2 Вт/см²; 4 – 0,4 Вт/см²; 5 – 0,7 Вт/см²; 6 – 1 Вт/см²

порівняно з контролем. Характеристичний час (τ) при застосуванні УЗІ 2 мс з інтенсивністю 0,05 і 0,2 Вт/см² є однаковим (0,597), проте тангенс кута нахилу (n) відрізняється (2,73 та 3,102 відповідно). Для одержання додаткової інформації про реакцію СПП у разі дії УЗ за формулою (2) розраховували нормовані максимальні швидкості. Як видно з рис. 3, за збільшення інтенсивності УЗН від 0,05 до 0,7 Вт/см² нормована максимальна швидкість (V_n) зростає порівняно з контролем. При 0,7 Вт/см² V_n є максимальною, при цьому на 19,2% вищою відносно контролю ($P < 0,05$). Під час застосування УЗІ 2 мс інтенсивністю 0,05 Вт/см² спостерігається зменшення V_n порівняно з контролем на 24,7% ($P < 0,05$), за інтенсивності 0,2 Вт/см² V_n вірогідно зростає. Максимальна величина V_n визначається при 0,4 Вт/см² і вона перевищує показники у контролі на 4,25% ($P < 0,05$). УЗІ інтенсивністю 0,7 Вт/см² спричинює зниження нормованої максимальної швидкості СПП. Неперервний УЗ за величини 1 Вт/см² викликає зменшення V_n після досягнення її максимуму при 0,7 Вт/см², але відносно контролю V_n залишається більшою на 12,9% ($P < 0,05$). Імпульсний УЗ 2 мс з інтенсивністю 1 Вт/см² також знижує нормовану максимальну швидкість після досягнення максимуму при 0,4 Вт/см² відносно контролю V_n і також є меншим на 23,4% ($P < 0,05$).

Отже, за дослідження впливу УЗ різних режимів визначено, що УЗН за всіх величин інтенсивності спричинює зростання нормованої максимальної швидкості відносно контролю, тоді як у випадку УЗІ зростання V_n відбувається лише при 0,4 Вт/см², а в усіх інших випадках V_n відносно контролю зменшується.

Таким чином, одержані результати свідчать про високу чутливість актоміозину скелетних м'язів до впливу УЗ. Реакція СПП актоміозину значно змінюється за впливу УЗН і УЗІ 2 мс. Отже, УЗ здатен впливати на функціональні характеристики скоротливого протеїнового комплексу м'язів – актоміозину, модулюючи актин-міозинову взаємодію. Вплив УЗ суттєво залежить від його інтенсивності. При застосуванні терапевтичної інтенсивності (< 1 Вт/см²) для УЗН найбільший ефект (величина СПП і V_n) спостерігається при 0,7 Вт/см², а для УЗІ 2 мс – при 0,4 Вт/см². Тобто, для кожного режиму УЗ існує певна максимально ефективна інтенсивність. Встановлено, що за умов дії УЗН відбувається поступове зростання нормованої максимальної швидкості (V_n) для інтенсивності у діапазоні 0,05–0,7 Вт/см², тоді як для УЗІ – за інтенсивності 0,05–0,4 Вт/см². Подальше збільшення інтенсивності УЗ при-

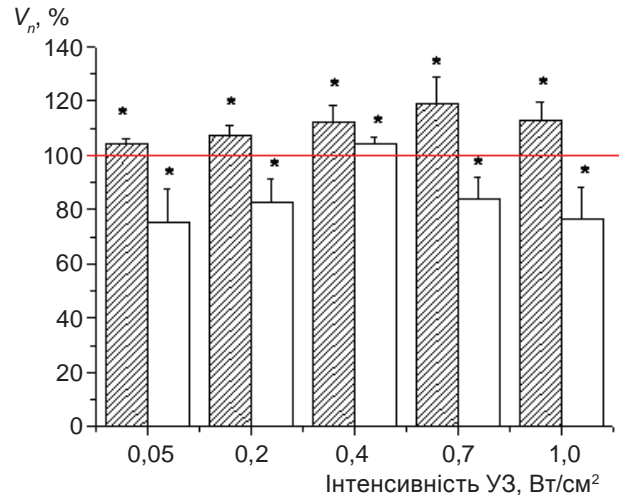


Рис. 3. Дія УЗ різних режимів (у % порівняно з контролем, прийнятим за 100%) на нормовану максимальну швидкість (V_n): – неперервний ультразвук, – імпульсний ультразвук 2 мс ($M \pm t$, $n = 7$); * достовірна різниця відносно контролю при $P < 0,05$

зводить до протилежного ефекту – зменшення V_n . Для УЗН такий ефект спостерігається при 1 Вт/см². Для УЗІ зменшення V_n відбувається вже при 0,7 Вт/см², при інтенсивності УЗІ 1 Вт/см² даний ефект підсилюється. Як імпульсний УЗ 2 мс, так і неперервний УЗ інтенсивністю 1 Вт/см² найбільше зменшують величину СПП і оптичну густину відносно контролю та всіх інших застосованих інтенсивностей, що, ймовірно, викликано тепловим впливом УЗ.

ВЛИЯНИЕ НЕПРЕРЫВНОГО И ИМПУЛЬСНОГО УЛЬТРАЗВУКА НА РЕАКЦИЮ СУПЕРПРЕЦИПИТАЦИИ АКТОМИОЗИНА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА

Е. А. Медынская, О. В. Шелюк,
В. С. Омелянюк, Н. Е. Нурищенко,
Л. И. Пелюх

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

Проведено сравнительное исследование влияния ультразвука непрерывного и импульсного (2 мс) режимов на реакцию суперпреципитации актомиозина скелетных мышц кролика. По кинетическим кривым определяли величину суперпреципитации ($D_m - D_0$), $t_{1/2}$ – время

половины ее величины, а также рассчитывали нормированную максимальную скорость данной реакции V_n . Показано, что наибольший эффект наблюдается при действии непрерывного ультразвука интенсивностью 0,7 Вт/см² (величина суперпреципитации и V_n были максимальными), а для импульсного — при 0,4 Вт/см². Как непрерывный, так и импульсный ультразвук при интенсивности 1 Вт/см² оказывает наибольшее влияние, уменьшая величину суперпреципитации относительно контроля и других величин использованных интенсивностей, что, вероятно, вызвано тепловым эффектом ультразвука. Проведенные исследования дают возможность предположить, что в актомиозине успевают произойти изменения адаптивного характера к действию импульсного ультразвука, поскольку сигнал данного режима действует с промежутками во времени.

Ключевые слова: ультразвук, актомиозин, суперпреципитация, величина суперпреципитации, кинетические параметры.

INFLUENCE OF CONTINUOUS AND IMPULSIVE ULTRASOUND ON ACTOMYOSIN SUPERPRECIPITATION REACTION FROM RABBIT SKELETAL MUSCLES

*K. O. Medynska, O. V. Shelyuk,
V. S. Omelyanyuk, N. Ye. Nurishchenko,
L. I. Pelyukh*

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

Summary

A comparative study of the effect of continuous and impulsive (2 ms) ultrasound regimes on actomyosin superprecipitation reaction of the rabbit skeletal muscles was carried out. From the obtained kinetic curves the value of superprecipitation ($D_m - D_0$), time $t_{1/2}$, which required to achieve a half its value was determined, and the normalized maximal rate of this reaction V_n was calculated as well. It is shown that continuous ultrasound with intensities 0.7 W/cm² and impulsive ultrasound — of 0.4 W/cm² produced the most pronounced effect (value of superprecipitation and V_n were maximal). The actomyosin superprecipitation value under continuous and impulsive ultrasound with intensity 1 W/cm² relative to control and all other applied intensities was most decreased. It is caused perhaps thermal influence of the ultrasound. Thus the obtained data give every reason to assume, that

impulsive ultrasound causes changes of adaptive character in actomyosin because the interrupted regime of the ultrasound signal.

Key words: ultrasound, actomyosin, superprecipitation, value of superprecipitation, kinetic parameters.

1. Акоюян В. Б., Ершов Ю. А. Основы взаимодействия ультразвука с биологическими объектами. Ультразвук в медицине, ветеринарии и экспериментальной биологии: Учеб. Пособие / Под ред. Шукина С. И. — М.: Изд-во МГТУ им. Н. Э. Баумана. — 2005. — С. 93–98.
2. Заалишвили М. М. Физико-химические основы мышечной деятельности. — Тбилиси: Мецниереба. — 1971. — 374 с.
3. Кофман Е. Б., Нанкина В. П. / Сб.: Биофизика и биохимия мышечного сокращения. — М.: Наука, 1996. — С. 82–86.
4. Burdya Th. V., Kosterin S. A. // Gen. Physiol. Biophys. — 1991. — N 10. — P. 589–598.
5. Тартаковский А. Д. / Сб.: Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков / Под. ред. Г. Р. Иванецкого. — Л.: Наука, 1978. — С. 55–76.
6. Северин С. Е., Соловьева Г. А. Практикум по биохимии. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1989. — 509 с.
7. Ebashi S. // J. Biochem. — 1961. — 50. — P. 236–244.
8. Кофман Е. Б. / Сб.: Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков / Под. ред. Г. Р. Иванецкого. — Л.: Наука, 1978. — С. 40–54.
9. Онуфрийчук О. В., Цимбалюк О. В., Мірошніченко М. С., Костерін С. О. // Фізика живого. — 2006. — 14, № 3. — С. 63–75.
10. Бэйли М. Р., Хохлова В. А., Сапожников О. А. и др. // Акустический журн. — 2003. — 49, № 4. — С. 437–464.
11. Нурищенко Н. Є., Омелянюк В. С., Мірошніченко М. С. та ін. // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия “Биология, химия”. — 2007. — 20 (59), № 1. — С. 123–128.
12. Мединська К. О., Омелянюк В. С., Грибова М. І. та ін. // Фізика живого. — 2008. — 16, № 1. — С. 34–38.
13. Haar ter G. // European J. Ultrasound. — 1999. — 9. — P. 3–9.
14. Baker K. G., Robertson V. J., Duck F. A. // Physical Therapy. — 2001. — 81, N 7. — P. 1351–1358.

Отримано 03.12.2009