

УДК 577.3

ВПЛИВ УЛЬТРАЗВУКУ РІЗНИХ РЕЖИМІВ НА СПЕКТРАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ АКТОМІОЗИНУ

*Нурищенко Н.Є., Омелянюк В.С., Мірошниченко М.С.,
Обора Н.І., Мединська К.О.*

Вивчено вплив неперервного та імпульсного ультразвуку різних інтенсивностей на спектральні характеристики актоміозину скелетних м'язів. Встановлено, що під впливом УЗ терапевтичного діапазону відбуваються невеликі зсуви максимуму спектру флуоресценції актоміозину в короткохвильову область. Це можна пояснити конформаційними перебудовами актоміозину, що призводить до зміни мікрооточення триптофанових залишків, які, головним чином, відповідають за спектр флуоресценції актоміозину. Найбільші зміни відбувались при озвученні неперервним УЗ і імпульсним УЗ 2 мс.

Ключові слова: імпульсний ультразвук, актоміозин, флуоресценція.

ВСТУП

Ультразвук (УЗ), як неінвазійний фізіотерапевтичний фактор, використовується в медицині вже декілька десятиліть. УЗ застосовують для діагностики і лікування широкого спектру захворювань [1]. Серед робіт, присвячених впливу УЗ на органи і тканини, найбільший інтерес представляє вивчення дії терапевтичних інтенсивностей цього фактору [2,3]. Результати таких досліджень свідчать про багатосторонній вплив УЗ, який проявляється на органному, клітинному, субклітинному і молекулярному рівнях [4-6]. Незважаючи на велику кількість матеріалу, який відображає зміни характеру біологічних процесів під впливом УЗ різних параметрів, дані про механізм дії цього фізичного фактору неоднозначні, а часто суперечливі. Показано, що озвучення впливає і на процес скорочення м'язів, що проявляється в зниженні спазму, покращенні розтягування колагенових волокон. Терапевтичні ультразвукові коливання регулюють тонус м'язів, викликають рефлексорне розширення судин, посилення капілярного кровозабезпечення. В ряді робіт вказано на позитивну іотропну дію на серцевий м'яз біляпорогових інтенсивностей. Однак механізми такого впливу ультразвуку на м'язову тканину не встановлені [7].

Як відомо, актоміозин є головним компонентом скоротливої системи м'язів і є зручною моделлю для вивчення механізму м'язового скорочення [8,9].

Зважаючи на вищенаведене, метою роботи було вивчення впливу неперервного та імпульсного ультразвуку різних інтенсивностей на структурні показники актоміозину скелетних м'язів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Велика складність білкових молекул вимагає застосування різноманітних біофізичних підходів при дослідженні їх структури і функції. Важливе місце серед цих підходів займають люмінесцентні методи. Білки мають власну люмінесценцію завдяки триптофановим, тирозиновим і фенілаланіновим залишкам. При наявності в білку триптофанілів його люмінесцентні властивості в основному визначаються цим

хромофором. Параметри триптофаної люмінесценції білків (максимум спектра, напівширина спектра, квантовий вихід, час життя збудженого стану) залежать від умов мікрооточення хромофорів в спектрі білкової молекули. Через розмитість максимумів на спектрах триптофаної флуоресценції можна надійно реєструвати тільки спектральні зсуви більше 1-2 нм. Розроблена у відділі біофізики НДІ фізіології Київського національного університету імені Тараса Шевченка флуоресцентна установка [10], дозволяє реєструвати спектральні зсуви до 0,2-0,5 нм. Для цього використовується відношення інтенсивностей при двох фіксованих довжинах хвиль (параметр $V=I_{\lambda_1}/I_{\lambda_2}$, де $\lambda_1=320$ нм і $\lambda_2=370$ нм), на прямолінійних схилах спектра флуоресценції. Довжина хвилі збудження дорівнювала 297 нм, при цьому збуджуються тільки триптофанові хромофори білку.

При достатній тривалості часу ділення двох сигналів (2-3 хв) установка дозволяє достовірно зареєструвати перебудову конформації білкової молекули, що супроводжується зміною параметра V на 0,005, що відповідає спектральному зсуву $\sim 0,05$ нм.

Дослідження проводили на актоміозині скелетних м'язів кроля. Виділення актоміозину проводили за методикою Перрі описаною в роботі Тартаковського [11] з модифікаціями розробленими у відділі біофізики НДІ фізіології.

Для визначення впливу ультразвуку на спектральні характеристики білка зразки актоміозину з концентрацією 0,5 мг/мл озвучували протягом 5 хвилин. Через 2 хвилини після впливу ультразвуку проводили визначення параметру V .

Озвучення актоміозину скоротливих м'язів кроля проводили УЗ-приладом (УЗТ-3.04 С) з частотою ультразвукового сигналу 0,88 МГц. Використовували наступні режими ультразвукового впливу:

- 1) неперервний з інтенсивностями 0,2, 0,4, 0,7, 1,0 Вт/см²
- 2) імпульсний 2 мс з інтенсивностями 0,2, 0,4, 0,7 і 1,0 Вт/см²
- 3) імпульсний 4 мс з інтенсивностями 0,2, 0,4, 0,7 і 1,0 Вт/см²
- 4) імпульсний 10 мс з інтенсивностями 0,2, 0,4, 0,7 і 1,0 Вт/см²

Аналіз даних проводили з використанням аналітичних програмних продуктів Origin 7.5 (MicroCal Software). Експериментальні точки подані на графіках як усереднені значення п'яти вимірів \pm стандартна похибка середнього. Статистична вірогідність результатів визначалась за критерієм Стьюдента ($p < 0,01$ вважалось статистично вірогідним).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Значення параметру V актоміозину скоротливих м'язів кроля за дії ультразвуку різних режимів наведено в табл.1.

На рис.1-4 представлено отримані результати зміни показника V актоміозину скоротливих м'язів кроля за умов дії ультразвуку різних режимів. Для більшої наочності всі контрольні значення були зведені до одиниці і проведена відповідна корекція отриманих результатів.

Вплив неперервного ультразвуку всіх інтенсивностей виявлявся у зниженні показника V (рис.1).

**ВПЛИВ УЛЬТРАЗВУКУ РІЗНИХ РЕЖИМІВ
НА СПЕКТРАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ АКТОМІОЗИНУ**

Таблиця 1

Параметр В актоміозину скоротливого м'язу кроля при впливі ультразвуку різних інтенсивностей за присутності Ca^{2+} ($C_{\text{Ca}^{2+}} = 1,25 \text{ мМ}$, $C_{\text{білка}} = 0,5 \text{ мг/мл}$)

Інтенсивність, Вт/см ²	Параметр В			
	Контроль УЗ неперервний	Контроль УЗ імпульси 2 мс	Контроль УЗ імпульси 4 мс	Контроль УЗ імпульси 10 мс
0,2	$\frac{0,983 \pm 0,002}{0,970 \pm 0,001^*}$	$\frac{0,991 \pm 0,003}{0,969 \pm 0,002^*}$	$\frac{0,987 \pm 0,002}{0,978 \pm 0,002^*}$	$\frac{0,982 \pm 0,002}{0,978 \pm 0,0035^*}$
0,4	$\frac{0,993 \pm 0,003}{0,933 \pm 0,0015^*}$	$\frac{0,995 \pm 0,003}{0,952 \pm 0,002^*}$	$\frac{0,994 \pm 0,002}{0,980 \pm 0,004^*}$	$\frac{0,993 \pm 0,002}{0,980 \pm 0,004^*}$
0,7	$\frac{0,995 \pm 0,002}{0,958 \pm 0,003^*}$	$\frac{0,997 \pm 0,002}{0,962 \pm 0,002^*}$	$\frac{0,990 \pm 0,002}{0,978 \pm 0,001^*}$	$\frac{0,995 \pm 0,002}{0,985 \pm 0,003^*}$
1,0	$\frac{0,992 \pm 0,003}{0,954 \pm 0,003^*}$	$\frac{0,992 \pm 0,003}{0,955 \pm 0,002^*}$	$\frac{0,993 \pm 0,001}{0,980 \pm 0,0035^*}$	$\frac{0,994 \pm 0,0015}{0,987 \pm 0,004^*}$

*- достовірна відміна порівняно з контролем при $p < 0,01$ (n=5)

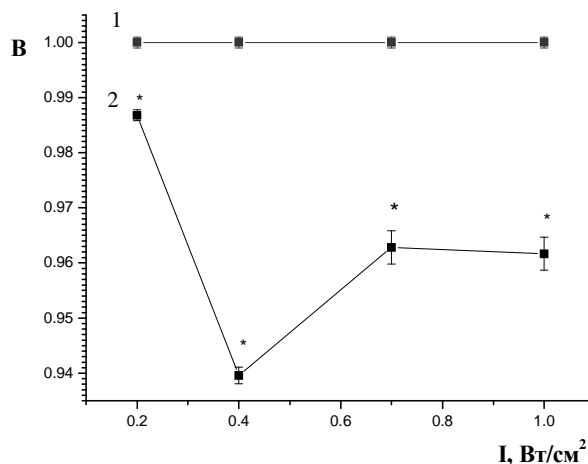


Рис. 1. Вплив неперервного ультразвуку різних інтенсивностей, на параметр В актоміозину скоротливих м'язів кроля. 1 – контроль. 2 - при додаванні 1,25 мМ Ca^{2+} .

* - достовірна відміна порівняно з контролем при $p < 0,01$

Найбільший вплив спричиняв УЗ з інтенсивністю 0,4 Вт/см². Зменшення параметра В при цьому складало 0,06, що відповідає зміщенню максимуму спектра на 0,6 нм в короткохвильову область. Менша і майже однакова зміна параметра В (0,04) спостерігалась за дії інтенсивностей 0,7 і 1,0 Вт/см²: Найменший вплив спостерігали за дії інтенсивності 0,2 Вт/см²: параметр В зменшується на 0,02, що відповідає зміщенню максимуму спектра на 0,2 нм.

Дія імпульсного УЗ 2 мс була подібною до неперервного, але менш вираженою (рис. 2). Так за дії зазначеного режиму при інтенсивності 0,4 Вт/см² зменшення параметру В було найбільшим з імпульсних режимів і складала 0,042 (~ 0,4 нм).

Дія імпульсного УЗ 4 мс і 10 мс призводила до незначних змін параметра В (рис. 3, 4).

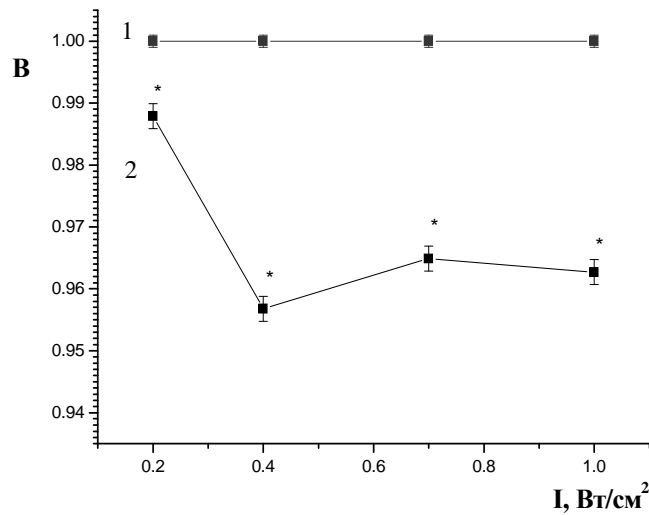


Рис. 2. Вплив імпульсного (2 мс) ультразвуку різних інтенсивностей, на параметр В актоміозину скоротливих м'язів кроля. 1 – контроль. 2 - при додаванні 1,25 мМ Са²⁺.

* - достовірна відміна порівняно з контролем при $p < 0,01$

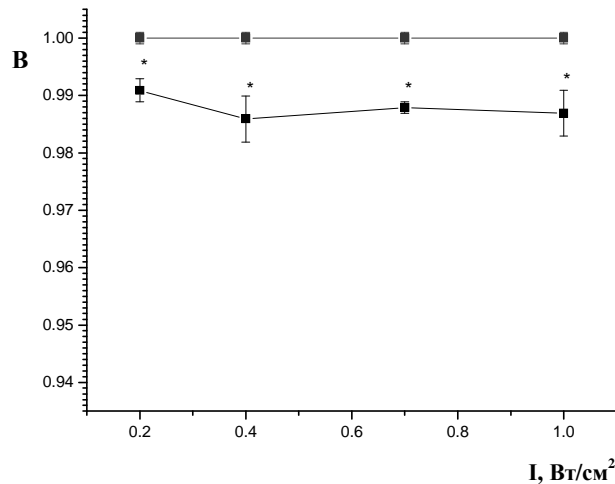


Рис. 3. Вплив імпульсного (4 мс) ультразвуку різних інтенсивностей, на параметр В актоміозину скоротливих м'язів кроля. 1 – контроль. 2 - при додаванні 1,25 мМ Са²⁺.

* - достовірна відміна порівняно з контролем при $p < 0,01$

ВПЛИВ УЛЬТРАЗВУКУ РІЗНИХ РЕЖИМІВ НА СПЕКТРАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ АКТОМІОЗИНУ

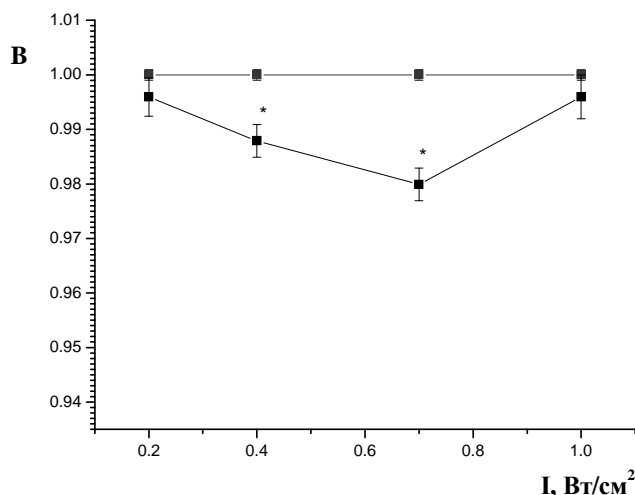


Рис. 4. Вплив імпульсного (10 мс) ультразвуку різних інтенсивностей, на параметр В актоміозину скоротливих м'язів кроля. 1 – контроль. 2 - при додаванні 1,25 мМ Ca²⁺.

* - достовірна відміна порівняно з контролем при $p < 0,01$

ВИСНОВКИ

Таким чином, зареєстровані малі зміни зміщення максимуму спектру свідчать про невеликі конформаційні перебудови в структурі вивчаємого білка. Це можна пояснити зміною мікрооточення триптофанових залишків актоміозину. Найбільші зміни відбувались при озвученні неперервним УЗ і імпульсним УЗ 2 мс з інтенсивністю 0,4 Вт/см². Треба відмітити, що в терапевтичних цілях використовують саме інтенсивності УЗ 0,2-0,4 Вт/см².

Список літератури

1. Bluth E.L., Arger P.H., Benson C.B., Ralls P.W., Siengel M.J. Ultrasound: a practical approach to clinical problems. – New York, Thieme, 2000.
2. Haar ter G. Therapeutic ultrasound // European J. of Ultrasound. - 1999. – N. 9. - P.3-9.
3. Baker K.G., Robertson V.J., Duck F.A. A Review of therapeutic ultrasound: Biophysical effects // Physical Therapy. - 2001. – Vol. 81, N 7. - P.1351-1358.
4. Dalecki D. Mechanical bioeffects of ultrasound // Annu.Rev. Biomed. Eng. - 2004. - № 6. - P.229-248.
5. Clarke L., Andrew E.A., Graham E. Acoustic streaming: An in vitro study // Ultrasound Med & Biol. - 2004. Vol. 30, N 4. - P.559-562.
6. Krekman F.W., Caratenaen E.L., Aldridje W.G. Macromolecular interaction in sound absorption // Interaction of Ultrasound and Biological Tissues / (Eds. J.M. Reid and M.R. Sikov) DNEW Publikation (FDA) 73-8006 BRH/DBE 73.1 - 1972. - P.37-42.
7. Barnett S.B., Rott H.D., Haar ter G., Ziskin M.C., Maeda K. The sensitivity of biological tissue to ultrasound // Ultrasound in Med & Biol. - 1997. – Vol. 23, N 6. - P. 805-812.
9. Левицкий Д.И. Структура и функции белков сократительных мышц. Л.: Наука, - 1987. – 220 с.

10. Гусев Н.Б. Структура и функции тропонина // Структура и функции белков сократительных систем. Л.: Наука, 1987. – С. 91-110.
11. Филенко А.М., Зима В.Л. Двухволновой метод регистрации малых спектральных сдвигов флуоресценции белков // Молекулярная генетика и биофизика. К.: Издательство при Киевском государственном университете издательского объединения «Вища школа», 1981. – Вып. 6. - С.126-135.
12. Тартаковский А.Д. Методы выделения и характеристика миозина и его субъединиц из поперечно-полосатых мышц // Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков. - Л.: Наука, 1987. - С.55 - 76.

Нурищенко Н.Є., Омелянюк В.С., Мірошниченко Н.С., Обора Н.І., Медынская К.О. Влияние ультразвука разных режимов на спектральные характеристики актомиозина // Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». - 2007. – Т. . 20 (59), № 1. – С. 123-128

Изучено влияние непрерывного и импульсного ультразвука разных интенсивностей на спектральные характеристики актомиозина скелетных мышц. Установлено, что при действии УЗ происходят небольшие сдвиги максимума спектра флуоресценции актомиозина в коротковолновую сторону. Это можно объяснить конформационными перестройками актомиозина, которые приводят к изменению микроокружения триптофановых остатков, главным образом, ответственных за спектр флуоресценции актомиозина. Наибольшие изменения наблюдались при озвучивании непрерывным УЗ и импульсным УЗ 2 мс.

Ключевые слова: ультразвук, актомиозин, флуоресценция.

Nurishchenko N., Omelyanyuk V., Miroshnychenko N., Obora N., Medynskaya K. Influence of ultrasound of sonification regimes on actomyosin spectral characteristics // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V.I. Vernadskogo. Series "Biology, chemistry". – 2007. – Vol. 20 (59), № 1. – P. 123-128.

Present research was intended to study the effects of continuous and impulsive ultrasound of different intensities on the spectral characteristics of actomyosin from skeletal muscles. The ultrasound of said regimens has been shown to affect the skeletal muscle actomyosin structure. Furthermore, the small shifts of maximum localizations in actomyosin fluorescence spectra towards the short wave zone has been discovered to occur. This phenomenon may be due to the conformational rearrangements of actomyosin resulting in microenvironment changes around the tryptophane residues responsible mainly for actomyosin fluorescence spectrum. The most evident shifts were recorded for sonification by continuous as well as impulsive 2 ms ultrasound regimens.

Keywords: ultrasound, actomyosine, fluorescence.