

УДК 612.015.87

## ВПЛИВ УЛЬТРАЗВУКУ НА ПЕРЕБІГ ЗАПАЛЕННЯ ПРИ ТРАВМІ СКЕЛЕТНОГО М'ЯЗУ ЩУРА

Чорноморець П.М., Нурищенко Н.Е., Мірошніченко М.С.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

Надійшла до редакції 15.12.2008

Досліджено вплив терапевтичного ультразвуку (УЗ) на показники, що відображають перебіг запалення при м'язовій травмі. Встановлено, що ефекти УЗ залежать від фази запального процесу, на яку припадає дія фізичного фактору. Запропоновано гіпотетичну модель, що пояснює виявлену фазну залежність дії ультразвуку з точки зору часової динаміки тканинних та біохімічних процесів при запаленні.

**Ключові слова:** ультразвук, запалення, скелетні м'язи.

### ВСТУП

Ультразвук низької інтенсивності широко застосовується в терапії травматичного запалення, у тому числі при м'язовій травмі. Однак механізми дії цього фактору на пошкоджену тканину залишаються невизначеними.

Спірним є сам факт впливу ультразвуку на фізіологічні процеси (див., напр., [1]). Ряд дослідників вважають, що зафіксовані явища слід пояснювати ефектом плацебо. Якщо факт дії ультразвуку на біологічну тканину все ж визнається, оцінка такого впливу також є неоднозначною: вона може бути позитивною або негативною, в залежності від дизайну дослідження. Нарешті, значну частину ефектів ультразвуку було виявлено у дослідженнях *in vitro*: на ізольованих білках, клітинах або культурі клітин. Однак в таких експериментах культуральне середовище є відносно рівномірним за щільністю, а в нативній біологічній тканині характер проходження звукової

хвилі може суттєво модулюватись неоднорідностями тканинної структури. В результаті ефекти ультразвуку *in vitro* виявляються при суттєво менших інтенсивностях, а отримані результати не можуть бути прямо перенесені на моделі *in vivo*.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проводились на статевозрілих білих безпородних щурах-самцях масою 200–250 г, що утримувались на стандартному раціоні за умов 12-годинного світлового дня. Експерименти проводили за наступною схемою. Щурів (n=90) наркотизували шляхом інтраперитонеального введення нембуталу у дозі 30 мг/кг маси. М'язову травму моделювали шляхом подвійного контрольованого стискання по 5 с литкового м'язу лівої задньої кінцівки. Зовнішня поверхня шкіри при цьому залишалася неушкодженою. Порядок озвучення та забою тварин відображено у табл.1.

Таблиця 1

Схема експерименту

Група	0 год	4 год	6 год	24 год	48 год	7 діб	14 діб
УЗ-4	наркоз+ травма	УЗ	1 забій	іУЗ/ 2 забій	3 забій	4 забій	5 забій
УЗ-24	наркоз+ травма	іУЗ		УЗ	1 забій	2 забій	3 забій
Позитивний контроль	наркоз+ травма	іУЗ	1 забій	іУЗ/ 2 забій	3 забій	4 забій	5 забій
негативний контроль	накоз	іУЗ	1 забій	іУЗ			2 забій

**Примітки:** УЗ – озвучення неперервним ультразвуком частотою 0,88 МГц, інтенсивністю 0,2 Вт/см<sup>2</sup>; УЗ-4 – озвучення через 4 год після травмування; УЗ-24 – озвучення через 24 год після травмування; іУЗ – імітація озвучення - повне повторення процедури при вимкненому приладі. Кожна з груп складалась з 6 тварин.

Декапітованих тварин препарували, відбираючи кров та м'яз з місця травмування. У плазмі крові визначали активність креатинкінази [2]. У травмованому м'язі вимірювали вміст інтерлейкінів ІІ-6 та ІІ-8 [3], фактору некрозу пухлин  $TNF\alpha$  [4], малонового діальдегіду (МДА) [5], активність мієлопероксидази (МПО) [6], супероксиддисмутази (СОД) [7], каталази [8], глутатіонредуктази [9].

Первинну обробку даних проводили у програмі MS Excel 2003. Статистичну обробку – у програмному пакеті StatSoft Statistika 6.0. Використовували непараметричні методи аналізу: попарне порівняння незалежних груп за тестами Вальда-Вольфовіца, Колмогорова-Смірнова та Манна-Вітні. Вірогідними вважали лише результати, вірогідні за усіма трьома тестами.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Показано, що всі досліджувані показники демонстрували вірогідні зміни у процесі розвитку травматичного запалення. Виявлено також вірогідний вплив терапевтичного ультразвуку на ці показники. Однак вплив має неоднозначний характер і залежить від фази запального процесу, на яку припадає озвучення (рис.1-4, Б,В).

У перебігу м'язової травми як такої звертають на себе увагу два типових паттерни змін біохімічних параметрів:

1. Різке збільшення вмісту речовини або активності ферменту в межах першої доби після травми та подальше поступове зниження до контрольного значення через 7-14 діб.

2. Коливання показників з піками максимумів через 6 та 48 год, та проміжним мінімумом через 24 год після травмування.

У відповідності до першого паттерну змінюється вміст ІІ-6 та ІІ-8, що відображають рівень загальної прозапальної регуляції в тканині (рис.2, А), активність МПО, що вказує на загальний рівень активності нейтрофілів у тканині, рис.3, А) та активність каталази (рис.4, А). За другим паттерном змінюються такі параметри, як активність креатинкінази у плазмі крові, що свідчить про загальний ступінь пошкодження м'язу, (рис.1, А), вміст МДА – показника перекисного окиснення ліпідів (рис.3, А), вміст редокс-пов'язаного медіатора запалення  $TNF\alpha$ , (рис.1, А), активність СОД (дані не показано). Таким чином, на фоні рівномірних у часі змін загального прозапального статусу тканини та активності нейтрофілів, активність вільнорадикальних процесів та ступінь вторинного пошкодження м'язу змінюються коливально. Найбільш парадоксальним видається зниження активності пошкоджувальних процесів через 24 год після травми, коли активність нейтрофілів та рівень

прозапальних інтерлейкінів у тканині близькі до максимальних значень. Див., наприклад, рис.3, А.

Ми припускаємо, що такий характер перебігу травматичного запалення м'язу може бути пов'язаний з розвитком ексудації упродовж першої доби після травми. Гіпотетичну модель, що може пояснити ці взаємозв'язки, наведено на рис.5, А. Модель створено на основі наших даних, а також загального розуміння механізмів регуляції та часового перебігу запалення (див, напр., [10]). У перші години після пошкодження в тканині різко підвищується рівень прозапальних цитокінів та активність нейтрофілів. Це призводить до розвитку вільнорадикальних процесів та вторинного пошкодження тканини. Однак запалення також супроводжується венозним та лімфостазом, результатом яких є ексудація та створення умов помірної гіпоксії у вогнищі запалення. Така гіпоксія відіграє роль протективного фактору: нестача кисню призводить до зниження продукції супероксидного аніону  $O_2^-$  нейтрофілами. Загальний рівень активності нейтрофілів через 24 год після травми залишається високим, однак оксидативне пошкодження тканини суттєво знижується. Через 48 год після травми знижується рівень прозапальних інтерлейкінів, що зумовлює нормалізацію активності венул та лімфатичних капілярів та відновлення кровообігу в тканині. Незважаючи на те, що загальна активність нейтрофілів у вогнищі запалення до цього часу дещо знижується, відновлення постачання кисню призводить до повторного піку вільнорадикальних процесів через 48 год після травми.

Така модель є також ключем до розуміння залежності ефектів ультразвуку від фази запального процесу, на яку припадає його дія. Озвучення через 4 год після травми призводило до нетривалого початкового загострення запального процесу. Це відзначається за різким підвищенням активності креатинкінази у плазмі крові (рис.1, Б), вмісту ІІ-8 (рис.2, Б), активності МПО (рис.3, Б). Однак таке загострення відбувається на фоні низької активності вільнорадикальних процесів: вміст МДА (рис.3, Б), активність каталази (рис.4, Б) та СОД (результати не показано) залишаються на рівні негативного контролю. Більше того, такий режим озвучення призводить до прискореного завершення запалення: через 48 год після травми більшість біохімічних показників є вірогідно нижчими, ніж у випадку запалення без дії терапевтичного ультразвуку. Також озвучення через 4 год після травми суттєво підвищує активність глутатіонредуктази, що означає збільшення загальної антиоксидантної здатності тканини. Таким чином, дію ультразвуку через 4 год після пошкодження можна оцінити позитивно, оскільки

вона забезпечує повну нормалізацію вільнорадикальних процесів та прискорене завершення запалення у травмованій тканині.

Натомість озвучення через 24 год після травми має неоднозначні ефекти. З одного боку, через 48 год після пошкодження (24 год після озвучення) спостерігається певна протизапальна та протективна дія: вірогідне зниження вмісту TNF $\alpha$  (рис.1, В), активності МПО (рис.3, В), а також підвищення активності глутатіонредуктази (рис.4, В). Однак у віддаленій перспективі такий режим озвучення призводить до ряду негативних наслідків: підвищеної активності вільнорадикальних процесів (вміст МДА та активність каталази вірогідно вищі від контролю та від інших дослідних груп через 1 та 2 тижні після травми, рис.3, В, 4, В), а також пролонгованого перебігу запалення як такого (вміст IL-6 та IL-8 залишається підвищеним через 2 тижні після травми). Таким чином, дію озвучення через 24 год після травми можна охарактеризувати як загалом негативну.

Спираючись на результати наших досліджень та дані інших авторів, ми припускаємо, що ультразвук може виконувати роль регуляторного тригера принаймні на трьох рівнях:

1. Підвищення рівня прозапальних цитокінів з подальшим прискореним "перемиканням" тканини до процесів відновлення [11,12].
2. Антиоксидантна дія та інгібування утворення вільних радикалів [13,14].
3. Вазодилатуюча дія [15].

В залежності від фази запалення та відповідно характеру процесів, що відбуваються в тканині, накладання цих трьох ефектів терапевтичного ультразвуку може призводити до принципово різних наслідків.

Через 4 год після травми активність запального процесу в тканині знаходиться на піковому рівні. При цьому рівень вторинного пошкодження тканини вільними радикалами також є високим. В таких умовах антиоксидантна дія ультразвуку та прискорене "перемикання" тканини до відновлювальних процесів мають безумовно позитивні наслідки. Вазодилатуюча ж дія УЗ не відіграє принципового значення, оскільки забезпечення тканини кров'ю на цьому етапі, імовірно, залишається на відносно нормальному рівні (рис.5, Б).

Через 24 год після травми у тканині спостерігається принципово інша картина. На фоні загального високого рівня прозапальної активності, вільнорадикальні процеси інгібовані через потужний протективний ефект венозного стазу та тканинної гіпоксії. Вазодилатуюча дія ультразвуку на цьому етапі усуває гіпоксію та знімає її

протективний ефект. На цьому фоні інші регуляторні ефекти терапевтичного озвучення відступають на другий план. Система виходить зі збалансованого стану, що призводить до пролонгованого перебігу запалення та продовження пошкоджувальної його дії навіть через 2 тижні після травми (рис.5, В).

## ВИСНОВКИ

Таким чином, показано, що вплив ультразвуку на перебіг запалення залежить від фази процесу, на яку припадає дія цього фізичного чинника. Озвучення через 4 год після травми сприяє нормалізації вільнорадикальних процесів на фоні нетривалого початкового загострення запалення та подальшого прискореного його завершення. Озвучення через 24 год після травми призводить до дисбалансу регуляторних та вільнорадикальних процесів у тканині й пролонгованого перебігу запалення. Імовірно, виявлена фазна залежність дії ультразвуку пов'язана з його впливами на тканинному рівні, зокрема дією на мікроциркуляторне русло та забезпечення тканини киснем.

## Література

1. *Speed C.A.* Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions // *Rheumatology*. – 2001. – Vol.40. – P.1331-1336.
2. *Cuby S.A., Noda L., Lardy H.A.* Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase. I. Isolation of the crystalline enzyme from rabbit muscle // *J. Biol. Chem.* – 1954. – Vol.209, No.1. – P.191-201.
3. Лимфоциты. Методы / Под ред. *Дж.Клауса*. М.: Мир, 1990. – 395 с.
4. *Петров P.B., Лопухин Ю.М., Череев А.Н.* Оценка иммунологического статуса человека. Методические рекомендации. – М.: Медицина, 1994. – 37 с.
5. *Стальная И.Д., Гаршивили Т.Г.* Современные методы в биохимии. – М.: Наука, 1977. – С.63-64.
6. *Mullane K.M., Kraemer R., Smith B.* Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium // *J. Pharmacol. Meth.* - 1985. - Vol. 14. - P. 157-167.
7. *Bannister J.V., Calabrese L.* Assays for SOD // *Methods Biochem. Anal.* – 1987. – V.32. – 279p.
8. *Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова М.А., Токарева В.Е.* Метод определения активности каталазы // *Лабораторное дело*. – 1988. – №11. – С.16-19.
9. *Kar N.C., Pearson C.M.* Catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase and thiobarbituric acid-reactive products in normal and dystrophic human muscle // *Clin. Chim. Acta* – 1979. – V. 94. – P. 277-280.
10. *Aller M.-A., Arias J.-L., Sánchez-Patán F., Arias J.* The inflammatory response: An efficient way of life // *Med. Sci. Monit.* – 2006. – Vol.12, No.10. – P.225-234.
11. *Li J.K., Chang W.H., Lin J.C., Ruaan R.C., Liu H.C., Sun J.S.* Cytokine release from osteoblasts in response to

- ultrasound stimulation // *Biomaterials*. – 2003. – Vol.24., No.13. – P.2379-2385.
12. *Reher P., Doan N., Bradnock B., Meghji S., Harris M.* Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF // *Cytokine*. – 1999. – Vol.11, No.6. – P.416-423.
  13. *Нурищенко Н.Е., Мірошніченко Н.С.* Влияние ультразвука терапевтических интенсивностей на содержание малонового диальдегида, глутатиона и активность миелопероксидазы при экспериментальном воспалении // *Физика живого*. – 2004. – Т.12. – №1. – С.73-81.
  14. *Чорноморець П.М., Нурищенко Н.С., Мірошніченко М.С., Клепко А.В.* Вплив ультразвуку на вільнорадикальне окиснення в скелетних м'язах при їх травмуванні // *Фізика живого*. – 2007. – Т.15. – №2. – С.73-76.
  15. *Altland O.D., Dalecki D., Suchkova V.N., Francis C.W.* Low-intensity ultrasound increases endothelial cell nitric oxide synthase activity and nitric oxide synthesis // *J. Thromb. Haemost.* – 2004. – Vol.2. – P.637-643.

## ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА ПРОТЕКАНИЕ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ТРАВМЕ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ КРЫСЫ

**Чорноморець П.М., Нурищенко Н.Е., Мірошніченко Н.С.**

Исследовано влияние терапевтического ультразвука (УЗ) на показатели, которые отражают течение воспаления при мышечной травме. Установлено, что эффекты УЗ зависят от фазы воспалительного процесса, на которой происходит воздействие физическим фактором. Предложена гипотетическая модель, которая объясняет обнаруженную фазную зависимость действия ультразвука с точки зрения временной динамики тканевых и биохимических процессов при воспалении.

**Ключевые слова:** ультразвук, воспаление, скелетные мышцы.

## EFFECT OF ULTRASOUND ON INFLAMMATION IN SKELETAL MUSCLE TRAUMA

**Chornomorets P.M., Nurishenko N.E., Miroshnichenko M.S.**

The present research deals with investigation of effects of therapeutic ultrasound (US) on key parameters of inflammation in skeletal muscle trauma. It was shown that effects of US depend on phase of inflammation when physical is applied. We propose a hypothetic model of phase dependence of ultrasound effects due to time dynamics of tissue and biochemical processes in inflammation.

**Key words:** ultrasound, inflammation, skeletal muscle.