

УДК 57.043: 577.359

ВПЛИВ УЛЬТРАЗВУКУ НА ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНЕ ОКИСНЕННЯ В СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗАХ ПРИ ЇХ ТРАВМУВАННІ

Чорноморець П.М.¹, Нурищенко Н.Є.¹, Мірошніченко М.С.¹, Клепко А.В.²

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна

² Науковий центр радіаційної медицини АМН України, Україна

Надійшла до редакції 15.09.2007

Досліджено вплив ультразвуку на стан вільнорадикального окиснення при м'язовій травмі у щурів. Показано що м'язова травма супроводжується порушенням вільнорадикального окиснення, що проявляється в збільшенні рівня МДА і зміні активностей каталази і СОД. Найбільш виражені зміни відбуваються через 6 год після травмування. Ультразвук, що застосовували через 4 год після травмування нормалізував вміст МДА і активність каталази. Вплив ультразвуку на активність СОД був менш вираженим.

Ключові слова: ультразвук, м'язове пошкодження, вільнорадикальне окиснення.

ВСТУП

Ультразвук, поряд з іншими фізіотерапевтичними факторами, широко використовується в терапії м'язових травм [1,2]. Але однозначних поглядів на механізм позитивної дії ультразвуку у відновленні функціонування м'язів наразі не існує. В ушкодженні скелетних м'язів значна роль належить запаленню і пов'язаній з ним міграції нейтрофілів в місце травмування. Активовані нейтрофіли генерують активні форми кисню поряд з цитокінами та іншими медіаторами запалення. Крім прямого пошкоджуючого впливу на клітини вільні радикали та оксиданти можуть підсилювати загальну запальну відповідь і сприяти ускладненню відновлення м'язів при травмуванні. В роботах [3,4] показано, що ультразвук з інтенсивністю 0,2 Вт/см² нормалізує процеси вільнорадикального окиснення при експериментальному запаленні.

Виходячи з вищенаведеного метою дослідження було вивчення впливу ультразвуку на вміст кінцевого продукту перекисного окиснення ліпідів -малонового діальдегіду, а також активність основних антиоксидантних ферментів каталази і су пероксиддисмутази при м'язовій травмі.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проводились на статевозрілих білих безпородних щурах-самцях масою 200–250 г розведення віварію біологічного факультету, що утримувались на стандартному раціоні за умов 12-

годинного світлового дня. Експерименти проводили за наступною схемою. Щурів (n=58) наркотизували шляхом інтраперитонеального введення нембуталу у дозі 30 мг/кг маси. М'язову травму моделювали шляхом потрійного контрольованого стискання по 5 с литкового м'язу лівої задньої кінцівки. Зовнішня поверхня шкіри при цьому залишалася неушкодженою. Через 4 години після травми тварин дослідних груп озвучували ультразвуком (частота 0,88 МГц, інтенсивність 0,2 Вт/см²) по 5 хв. у зону травмованого м'яза. Через 6, 24, 48 годин, 1 та 2 тижні після травми, а також після травми з подальшим озвученням тварин декапітували та препарували травмований литковий м'яз. Контрольну групу (n=8) склали щури, яким проводили наркотизацію без подальших процедур.

В тканинах м'язу взятого з місця травмування визначали вміст малонового діальдегіду (МДА), активність супероксиддисмутази (СОД) та каталази.

Заморожені шматочки м'язів щура розтирали у фарфоровій ступці в присутності рідкого азоту. Наважки подрібненої тканини ресуспендували в 5 мл середовища виділення (50 мМ трис-НСl; 150 мМ NaCl, рН 7,5), після чого центрифугували при 4000 об/хв протягом 15 хв. Отриманий супернатант обережно відбирали та використовували в подальших дослідженнях. Кількість білку в гомогенаті визначали за біуретовою реакцією.

Активність СОД, (ЕС 1.15.1.1) визначали згідно [5]. До 0,5 мл отриманого гомогенату м'язів додавали 1 мл реагенту I: 0,15 М фосфатний буфер (рН 7,8); 0,2

мМ ЕДТА; 0,7 мМ нітросиній тетразолій; 0,75 мМ феназинметасульфат. Добре перемішували та вимірювали оптичну щільність проби при довжині хвилі 540 нм (D_1). Після цього додавали 0,035 мл реагенту II: 1 мМ тріс-ЕДТА буфер (рН 8,0); 1 мМ НАД·Н. Зразки інкубували 10 хв при кімнатній температурі та знову вимірювали оптичну щільність проби (D_2). Активність ферменту (А) розраховували за формулою

$$A = (D_2 - D_1) / D_2 \cdot 100\%$$

та виражали у відносних одиницях.

Активність каталази (пероксид водню: пероксид водню оксидоредуктаза, ЕС 1.11.1.6) визначення відповідно до [6]. Дослідна проба містила: 0,1 мл гомогенату, 1,9 мл 0,03% розчин H_2O_2 . В контрольну пробу замість пероксиду додавали 0,1 мл дистильованої води. Через 10 хв в кожну пробірку додавали 1 мл 4% молібдату амонію. Після цього на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 410 нм вимірювали оптичну щільність забарвлення розчину. Як контроль використовували пробу, в яку замість H_2O_2 вносили 2 мл води.

Розрахунки проводили за формулою:

$$A = 14,18 \Delta D / C_k$$

де А – активність каталази, ΔD – різниця оптичної щільності контрольної та дослідної проб, C_k – концентрація білку в пробі.

Кількість МДА, визначали за методом [7]. Гомогенат в об'ємі 1,5 мл вносили в центрифужні пробірки, які містили по 0,5 мл 17% розчину трихлороцтової кислоти (кінцева концентрація 5%). Утворений осад відділяли центрифугуванням протягом 10 хв при 4000g. Супернатант в об'ємі 1 мл переносили в пробірки, додавали по 0,5 мл 8% розчину 2-тіобарбітурової кислоти і ставили проби на водяну баню (при 95°C) на 30 хв. Після розвитку рожевого забарвлення проби охолоджували та вимірювали їх оптичну щільність при 532 нм проти контролю (не містив білка).

При розрахунку кількості МДА враховували коефіцієнт його молярної екстинції $\epsilon = 156 \cdot 10^3 M^{-1} cm^{-1}$.

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, в інших випадках різниця між групами розглядалась як спірна, про що окремо зазначається по тексту статті. Для аналізу кореляцій між різними

показниками застосовували рангову кореляцію Спірмена.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

При вивченні динаміки вільнорадикальних процесів та активності основних антиоксидантних ферментів при м'язовій травмі, а також під дією ультразвуку встановлено, що через 6 год після травмування вміст малонового діальдегіду зростав з 0,11 до 0,38 нмоль/мг загального білку ($p < 0,01$). Значення цього показника через 24 год, 48 год та через 1 тиждень після травми падали до 0,19-0,20 нмоль/мг білку, але залишалися підвищеними відносно контролю (рис. 1а). Однак вірогідність цієї відмінності є спірною, оскільки за тестами Колмогорова-Смірнова та Манна-Вітні статистична значимість складала $p < 0,05$, а відповідно до тесту Вальда-Вольфовіца $p = 0,0524$, що є вище за загальноприйнятту межу статистичної значимості в біологічних дослідженнях. У тварин, яким через 4 год після травмування проводили озвучення вміст МДА коливався в межах контрольних значень у всіх досліджених часових проміжках (рис.1б).

Активність каталази через 6 год після травми збільшувалась за медіаною з 1,32 до 4,65 мкмоль H_2O_2 / мг*хв. Через 6 год, 24 год та 48 год після травми активність ферменту знижувалась, але залишалась вірогідно вищою за норму ($p < 0,01$). Через 2 тижні після травмування активність ферменту нормалізувалась і складала 1,31 мкмоль H_2O_2 / мг*хв (рис. 2а).

Натомість вплив ультразвуком на травмований м'яз забезпечував підтримання активності каталази у межах норми через 6 год, 24 год, 48 год, 1 та 2 тижні після травми ($p < 0,01$) (рис. 2б).

Активність супероксиддисмутази при травмі демонструє коливальні зміни упродовж розвитку травматичного запалення скелетного м'яза (рис.3,а). Так, активність ферменту через 6 год знижувалась за медіаною з 67,5% в контролі до 53,8% ($p < 0,05$). Через 24 год активність СОД зростала до 59,1% і не відрізнялась від контролю ($p > 0,1$).

Через 48 год. активність СОД знову знижувалась до 48,4% ($p < 0,05$), а через 1 тиждень зростала до 57,1% ($p > 0,05$), знижуючись через 2 тижні до 48,7% ($p < 0,05$). Озвучення травмованих м'язів не викликало змін активності ферменту відносно відповідних значень при травмі. Активність СОД коливалась в межах 56,5%-60,7%. Лише через 2 тижні активність СОД при травмі з озвученням була вищою, та відповідно ближчою до норми, відносно травми без озвучення ($p < 0,05$, рис.3,б).

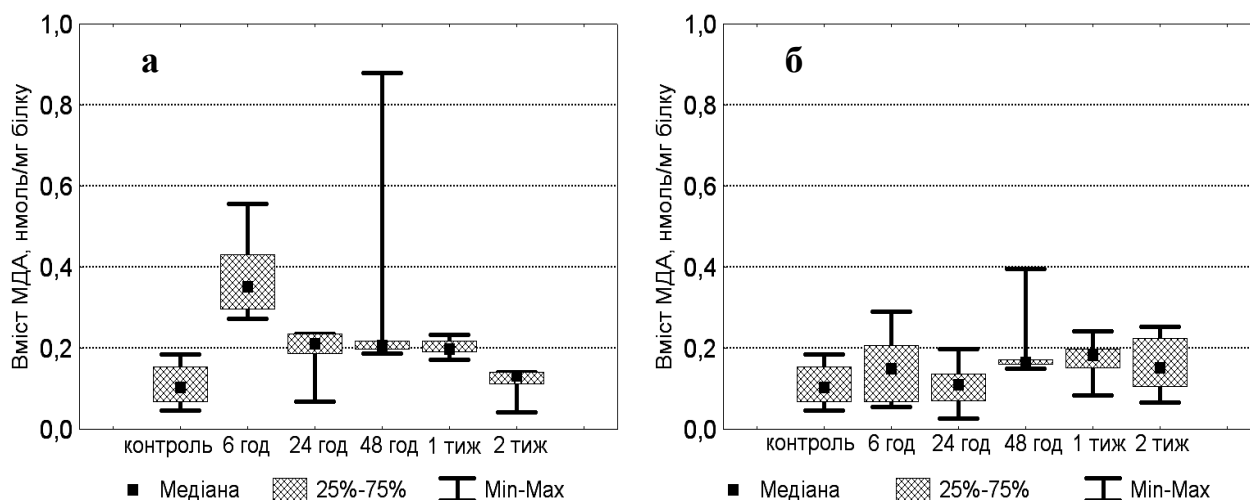


Рис. 1. Вміст малонового діальдегіду в скелетному м'язі щура при травмуванні (а), а також дії ультразвуку на травмований м'яз (б).

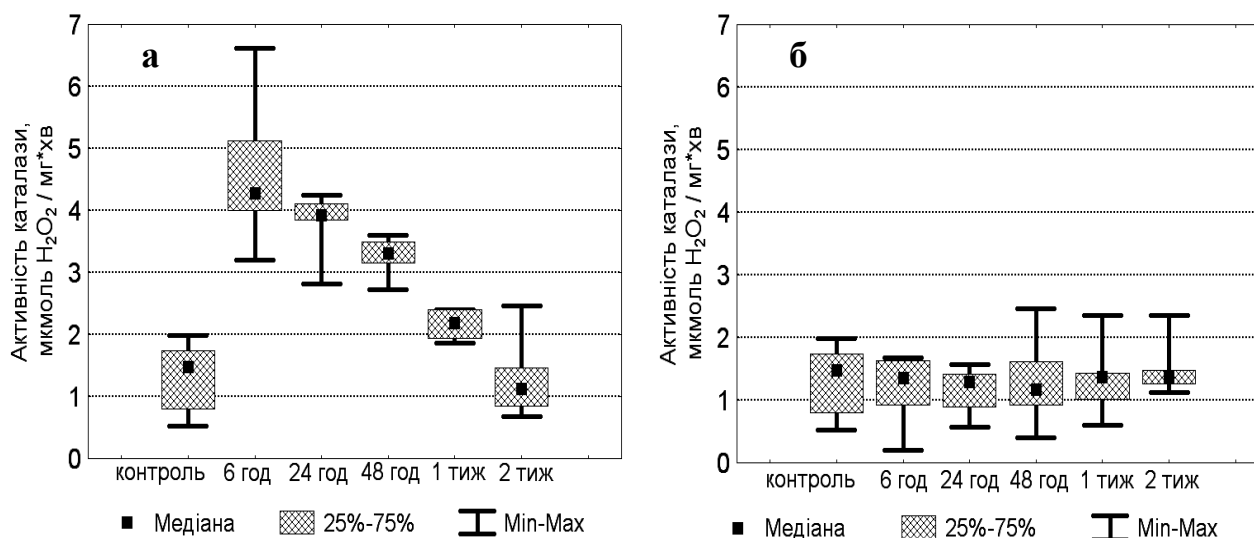


Рис. 2. Активність каталази в скелетному м'язі щура при травмуванні (а), а також дії ультразвуку на травмований м'яз (б).

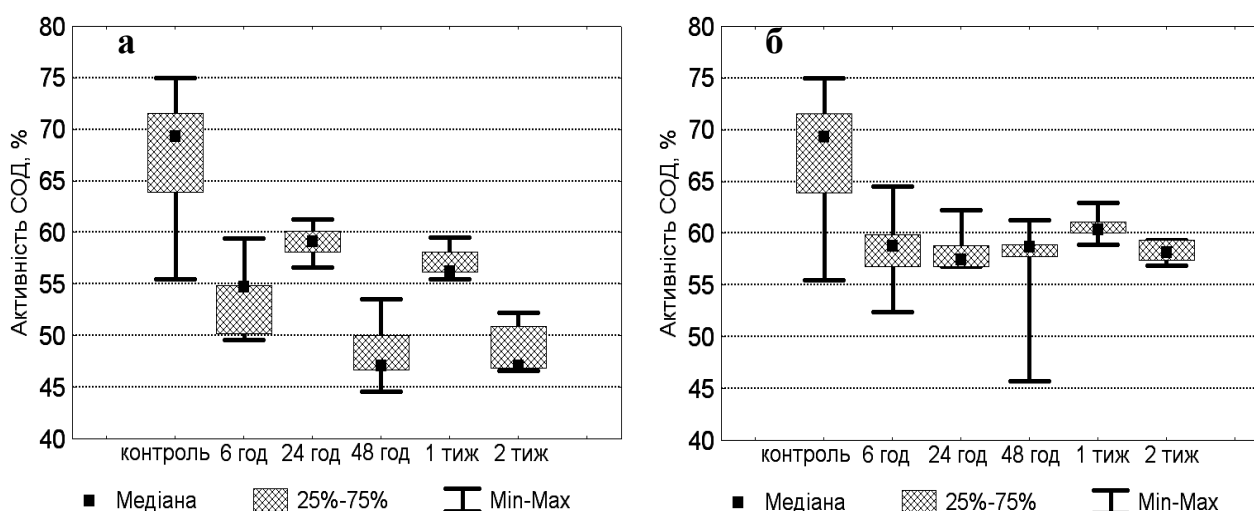


Рис. 3. Активність супероксиддисмутази в скелетному м'язі щура при травмуванні (а), а також дії ультразвуку на травмований м'яз (б).

Було виявлено позитивну кореляцію між вмістом малонового діальдегіду та активністю каталази ($p < 0,01$) при збільшенні обох показників під час травматичного запалення, з наступним їх зниженням у процесі відновлення пошкодженого м'яза. Активність супероксиддисмутази під час запального процесу знижувалась та виявляла негативну кореляцію з активністю каталази ($p > 0,05$).

ВИСНОВКИ

Таким чином показано, що м'язова травма супроводжується порушенням вільнорадикального окиснення, що проявляється в збільшенні рівня МДА і зміні активностей каталази і СОД. Найбільш виражені зміни відбуваються через 6 год після травмування. Можливо це пов'язане з розвитком запальної реакції в місці травмування, зокрема міграцією нейтрофілів і їх активацією [8,9,10]. Ультразвук, що застосовували через 4 год після травмування нормалізував вміст МДА і активність каталази. Вплив ультразвуку на активність СОД був менш вираженим. Нормалізація вільно радикального окиснення запобігає руйнівному впливу вільних радикалів і оксидантів на оточуючі тканини, що може сприяти відновленню травмованого м'язу.

Література

1. Bertuglia S., Giusti A., Picano E. Effects of diagnostic cardiac ultrasound on oxygen free radical production and microvascular perfusion during ischemia reperfusion // *Ultrasound in Med & Biol.* – 2004. – Vol. 30. – № 4. – P. 549-557.
2. Freitas L.S., Silveira TP, Rocha L.G., Pinho R.A., Streck E.L. Effect of therapeutic pulsed ultrasound on parameters of oxidative stress in skeletal muscle after injury // *Cell Biol Int.* 2007. – № 5. – P. 482-488.
3. Нурищенко Н.Є., 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.
4. Нурищенко Н.Є., Андрейченко С.В., Мірошніченко Н.С. Влияние однократного и курсового применения ультразвука разных интенсивностей на развитие экспериментального отека // *Физика живого.* – 2003. – Т. 11. – № 2. – С. 106-111.
5. Bannister J.V., Calabrese L. Assays for SOD // *Methods Biochem. Anal.* – 1987. – V. 32. – 279 p.
6. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова М.А., Токарева В.Е. Метод определения активности каталазы // *Лабораторное дело.* – 1988. – № 11. – С. 16-19.
7. Стальная И.Д., Гаршивили Т.Г. Современные методы в биохимии. – М.: Наука, 1977. – С. 63-64.
8. Tsvitse S.K., Mylona E., Peterson J.M., Gunning W.T., Pizza F.X. Mechanical loading and injury induce human myotubes to release neutrophil chemoattractants // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2005. – Vol. 288. – C721-C729.
9. Toumi H., Best T.M. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? // *Br. J. Sports Med.* – 2003. – Vol. 37. – P. 284-286.
10. Toumi H., F'guyer S., Best T. M. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch // *J. Anat.* – 2006. – Vol. 208. – P. 495- 470.

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ПРИ ИХ ТРАВМИРОВАНИИ

Чорноморець П.М., Нурищенко Н.Є., Мірошніченко Н.С., Клепко А.В.

Исследовано влияние ультразвуку на свободнорадикальное окисление при мышечной травме у крыс. Показано, что при травматическом процессе в скелетной мышце крысы возрастает уровень МДА и наблюдаются изменения активности каталазы и СОД. Наиболее явные изменения происходят через 6 ч после травмы. Воздействие ультразвуку на травмированную мышцу через 4 ч после травмы приводило к достоверной нормализации уровня МДА и активности каталазы. Влияние ультразвуку на активность СОД было менее выраженным.

Ключевые слова: ультразвук, мышечное повреждение, свободнорадикальное окисление.

INFLUENCE OF ULTRASOUND ON FREE RADICAL OXIDATION IN SKELETAL MUSCLES AFTER ITS INJURY

Chornomorets P.M., Nurishchenko N.Ye., Miroshnichenko M.S., Klepko A.V.

The present research deals with the investigation of ultrasound effects (0,2 W/cm², 0,88 MHz) on free radical oxidation under skeletal muscle injury. Changes in free radical processes are important part of inflammation. It was shown growth of MDA level and changes of catalase and SOD activity during traumatic process in rat skeletal muscle. The most apparent changes occurs at 6 h after trauma, probably as a result of neutrophil activation and migration into inflamed muscle. Exposure of traumatized muscle to ultrasound at 4 h after trauma led to reliable normalization of MDA level and catalase activity. Effect of ultrasound on SOD activity was less considerable. Normalization of free radical processes prevents inflammation-induced muscle damage, so exposure of traumatized muscle to ultrasound can promote muscle regeneration.

Key words: ultrasound, muscle injury, free radical oxidation.