

УДК 612.014/577.353.24

## ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ТА ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЯ ПОШКОДЖЕННЯ ОКИСНО-МОДИФІКОВАНОГО АКТОМІОЗИНУ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ КРОЛЯ ЗА ДІЇ УЛЬТРАЗВУКУ

Мединська К.О., Шелюк О.В., Літюга В.В., Омелянюк В.С.

ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету  
 імені Тараса Шевченка, Україна

Надійшла до редакції 19.02.2010

Проведено дослідження структурних характеристик та визначення ступеня пошкодження окисно-модифікованого актоміозину (АМ) скелетних м'язів кроля за дії ультразвуку (УЗ). Було виявлено вірогідні зміни параметра В та підвищення рівня 2,4-ДНФгідрозонів порівняно зі спонтанною окисною деструкцією актоміозину. Отримані дані підтверджуються аналізом рівня окисних пошкоджень. Під впливом УЗ кількість карбонільних груп зменшувалась, що відображалось на значеннях параметра В, який характеризує структурні зміни. Ультразвук з інтенсивностями 0,05 та 0,2 Вт/см<sup>2</sup> не впливав на досліджені параметри порівняно з окисненням. Тоді як УЗ з підвищенням інтенсивності (0,4; 0,7 та 1,0 Вт/см<sup>2</sup>) в силу термічної компоненти справляв більш виражену дію. Отже, ультразвук хоча і зменшував концентрацію карбонільних груп, проте остаточно не нормалізував білок. Таким чином окиснений актоміозин за дії ультразвуку повністю не відновлювався.

**Ключові слова:** актоміозин, окисна модифікація білків, карбонільні групи, ультразвук, параметр В.

### ВСТУП

В останні роки суттєва увага дослідників приділяється дослідженню спонтанної та металкаталізованої окисної (МКО) модифікації білків у розвитку вільнорадикальних патологій в тканинах [1]. Окиснення амінокислот у складі білків призводить до їх структурних змін, які проявляються агрегацією, фрагментацією, а також підвищеною чутливістю до протеолізу. Відомо, що окисна деструкція білків являється одним з перших показників пошкодження тканини. Це зумовлює вивчення рівня карбонільних груп, які є важливим маркером окисної модифікації білків [2, 3]. Крім того, з літературних даних відомо, що внаслідок особливостей структурної організації білків процес окисної модифікації має складний та специфічний характер який супроводжується порушенням як первинної, вторинної так і третинної структури [4, 5]. В літературі не існує даних про модифікацію скоротливих білків вільними радикалами, надлишкова кількість яких продукується при м'язовій патології. Відомо, що терапевтичний УЗ має позитивний вплив на процеси вільнорадикального окиснення [6, 7]. Тому метою роботи було вивчення впливу ультразвуку різних режимів на спектральні характеристики окисненого АМ та на ступінь його пошкодження.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження проводили на актоміозині скелетних м'язів кроля породи Радянська Шиншила (Soviet Chinchilla). Забій тварин здійснювали, попередньо наркотизуючи їх нембуталом. Виділення актоміозину

проводили за методикою Перрі, описаною в роботі Тартаковського [8] з модифікаціями, розробленими у відділі біофізики НДІ фізіології імені академіка Петра Богача. Актomioзин додатково очищували центрифугуванням при 30 000 g протягом однієї години. Озвучення актоміозину скелетних м'язів кроля проводили з використанням УЗ-приладу УЗТ-3.04 С (Україна) впродовж 5 хв. Частота ультразвукового сигналу становила 0,88 МГц. Використовували наступні режими ультразвукового впливу:

- 1) неперервний з інтенсивностями 0,05; 0,2; 0,4; 0,7 і 1,0 Вт/см<sup>2</sup>;
- 2) імпульсний 2 мс з інтенсивностями 0,05; 0,2; 0,4; 0,7 і 1,0 Вт/см<sup>2</sup>.

Структурні параметри актоміозину вивчали за спектрами флуоресценції. Розроблена у відділі біофізики НДІ фізіології флуоресцентна установка [9], дозволяє реєструвати спектральні зсуви, використовуючи відношення інтенсивностей на прямолінійних схилах спектра флуоресценції (параметр В) при двох фіксованих довжинах хвиль. Визначення  $V = I_{\lambda_1}/I_{\lambda_2}$  проводили на довжинах хвиль:  $\lambda_1 = 320$  нм,  $\lambda_2 = 370$  нм, ( $\lambda_{36} = 297$  нм). При достатній тривалості часу ділення двох сигналів (2 хв) установка дозволяє достовірно зареєструвати перебудову конформації білкової молекули, що супроводжується зміною параметра В на 0,005, що відповідає спектральному зсуву ~0,05 нм.

Окисну модифікацію актоміозину проводили за методом Дубініної О.Ю. зі співавторами [3, 10] та з нашими модифікаціями. Даний метод заснований на

реакції взаємодії окиснених амінокислотних залишків білків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) та утворенням при цьому похідних 2,4-динітрофенілгідразону [11, 12]. Досліджували спонтанну та металкаталізовану окисну модифікацію актоміозину скелетних м'язів кроля.

Для визначення спонтанної окисної модифікації актоміозину в досліджувані та контрольні пробірки вносили по 1 мл АМ з концентрацією 0,2 мг/мл, розчиненого в буфері Tris-HCl 20 мМ (рН 7.5). Пробірки інкубували в темноті при 37 °С протягом 15 хв. Потім в усі пробірки додавали по 1 мл 20 % ТХУ. В досліджувані пробірки до денатурованого АМ додавали по 1 мл 0,1 М 2,4-ДНФГ, розчиненого в 2 н НСІ, тоді як в контрольні пробірки замість 2,4-ДНФГ додавали такий же об'єм 2 н НСІ. Для визначення металкаталізованої окисної модифікації актоміозину в досліджувані та контрольні пробірки також вносили по 1 мл АМ з концентрацією 0,2 мг/мл, розчиненого в буфері Tris-HCl 20 мМ (рН 7.5). Для ініціації окиснення білку, в реакційну суміш додавали середовище Фентона: FeSO<sub>4</sub> (10<sup>-5</sup> М) і H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3·10<sup>-4</sup> М). Зразки інкубували в темноті при 37 °С протягом 15 хв. Реакцію зупиняли додаванням 1 мл 20 % ТХУ в усі пробірки. До денатурованого АМ в досліджувані пробірки вносили по 1 мл 0,1 М 2,4-ДНФГ. В контрольні пробірки замість 2,4-ДНФГ додавали такий же об'єм 2 н НСІ. Всі пробірки після додавання 2,4-ДНФГ та 2 н НСІ інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі (25 °С), перемішуючи кожні 15 хв. Потім їх центрифугували 20 хв при 4 тис об/хв. Осад промивали два рази розчином етанол-етилацетат (1:1) для екстракції ліпідів та 2,4-ДНФГ, який не прореагував з карбонільними групами окисненого білка. Отриманий осад підсушували на холоді та розчиняли в 8 М сечовині, яка попередньо підігрівалася. Для кращого розчинення осаду АМ додавали по краплям 2 н НСІ. Оптичну густину утворених 2,4-динітрофенілгідразонів реєстрували при 370 нм на спектрофотометрі „SPCORD-M40”. За дії УЗ зразки проб інкубували в темноті при 37 °С протягом 10 хв, потім озвучували впродовж 5 хв та одразу зупиняли реакцію 20 % ТХУ. Ступінь окисної модифікації АМ виражали в мкМ 2,4-ДНФГ на 1 мг білку:  $A = (D_p - D_k) \cdot V / 22000 \cdot C$ , де D<sub>p</sub> – оптична густина пробірки; D<sub>k</sub> – оптична густина контролю; V – кінцевий об'єм пробірки; 22000 моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup> – коефіцієнт молярної екстинції для 2,4-ДНФГ похідних; C – концентрація білку в мг/мл.

Статистичну обробку результатів експериментів проводили в програмі Origin 8.0 (OriginLab Corporation, США). Результати досліджень було оброблено статистично з використанням t-критерія Стьюдента (p<0,05 вважалось статистично вірогідним).

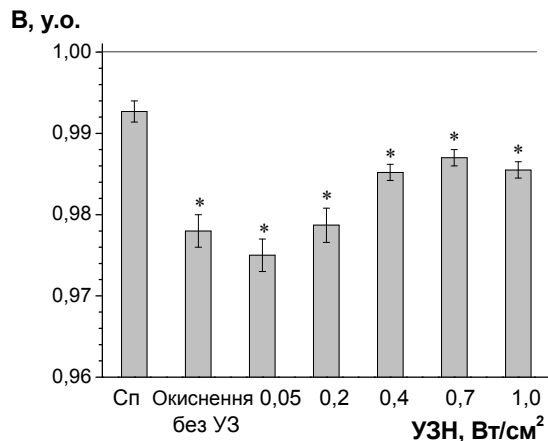
## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив окисної модифікації вільними радикалами, що генеруються реактивом Фентона, на структурні показники актоміозину досліджували за параметром В. Для більшої наочності та зручності порівняння

отриманих результатів всі контрольні значення нативного актоміозину було зведено до одиниці і проведена відповідна корекція отриманих результатів. На рис. 1 представлено узагальнюючий графік впливу неперервного ультразвуку на двохвильовий показник В окисно-модифікованого АМ скелетних м'язів кроля. Після обробки білкового комплексу окиснюючими факторами вірогідно зменшувався параметр В відносно контрольних проб (спонтанного окиснення без реактиву Фентона) на 0,015 у.о., що становить зміщення спектру флуоресценції на 0,15 нм. Таке зміщення спектру може свідчити про структурну модифікацію білку. УЗ невеликих інтенсивностей 0,05 та 0,2 Вт/см<sup>2</sup> змінював параметр В на 0,018 та 0,014 у.о. (0,18 та 0,14 нм), відповідно. При цьому дані інтенсивності УЗ не викликали статистично достовірних змін показника порівняно з окисненням без озвучення. Аналіз структурних змін окисненого білкового комплексу за дії більших інтенсивностей ультразвуку 0,4; 0,7 та 1,0 Вт/см<sup>2</sup> показав зростання значення параметру В відносно попередньо застосованих інтенсивностей. Їх значення були наближеними до параметра В, зареєстрованому при спонтанному окисненні, проте залишалися статистично достовірно меншими на 0,008; 0,006 та 0,007 у.о., відповідно, відносно останнього.

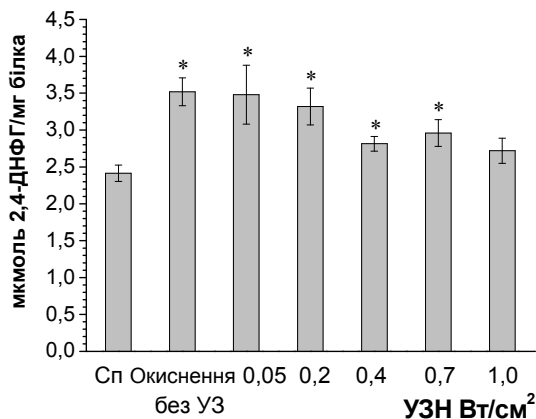
Відомо, що одним з методів оцінки інтенсивності ступеня окисної модифікації білкових молекул є дослідження кількості карбонільних груп при окисненні амінокислот: аргініну, лізину та проліну. При аналізі металкаталізованої окисної модифікації АМ за контроль ми приймали значення вмісту карбонільних похідних амінокислот при спонтанній окисній модифікації. Як видно з рис. 2 в усіх випадках МКО білкового комплексу нами було виявлено статистично достовірне збільшення рівня карбонільних груп відносно контролю. Після ініціації окиснення АМ вільними радикалами рівень карбонільних похідних білків зростав на 45,75 %, що свідчить про окисне пошкодження білку. Для з'ясування впливу УЗ на модифікований АМ спочатку було застосовано неперервний УЗ невисоких інтенсивностей 0,05 та 0,2 Вт/см<sup>2</sup>, що призводило до незначного статистично не достовірного зниження вмісту 2,4-динітрофенілгідразонів (1,14 % та 5,68 %, відповідно). В той час зі збільшенням інтенсивності неперервного УЗ до 0,4; 0,7 та 1,0 Вт/см<sup>2</sup> рівень карбонільних груп знижувався, порівняно з контрольними окисненими пробілками без застосування УЗ, на 20,0; 15,91 та 22,73 % відповідно, але великої різниці між цими показниками в проведених нами дослідженнях виявлено не було. Отже дані інтенсивності УЗ не спричиняли зменшення рівня карбонільних похідних до їх вихідного значення при спонтанному окисненні.

З метою порівняння впливу УЗ різних режимів за умов окисної модифікації було застосовано імпульсний УЗ 2 мс (рис. 3). При цьому спостерігалась тенденція до зменшення вмісту карбонільних похідних амінокислот окисненого АМ.



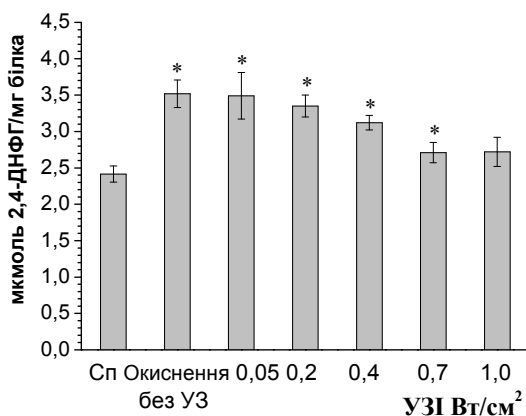
**Рис. 1.** Зміна параметра В окисно-модифікованого актоміозину скелетних м'язів кроля (концентрація 0,2 мг/мл) за дії неперервного ультразвуку різних інтенсивностей ( $M \pm m$ ),  $n = 14$

*Примітки:* Sp – спонтанне окиснення актоміозину; 1.000 – нативний актоміозин; \* – достовірна різниця відносно контролю при  $p < 0,01$ .



**Рис. 2.** Вміст мкмоль 2,4-ДНФГ/мг актоміозину за дії неперервного УЗ різних інтенсивностей ( $M \pm m$ ),  $n = 14$

*Примітки:* Sp – спонтанне окиснення актоміозину; \* – достовірна різниця відносно контролю при  $p < 0,05$



**Рис. 3.** Вміст мкмоль 2,4-ДНФГ/мг актоміозину за дії імпульсного ультразвуку різних інтенсивностей ( $M \pm m$ ),  $n = 14$

*Примітки:* Sp – спонтанне окиснення актоміозину; \* – достовірна різниця відносно контролю при  $p < 0,05$

При застосуванні імпульсного УЗ, як і неперервного за низьких інтенсивностей 0,05 та 0,2 Вт/см<sup>2</sup> не було виявлено суттєвої різниці у рівні окисних пошкоджень відносно неозвученого АМ (0,85 та 4,83%, відповідно). Тоді як зі збільшенням інтенсивності УЗ (0,4; 0,7 та 1,0 Вт/см<sup>2</sup>) реєстрували статистично достовірне зменшення ступеня окиснення на 11,37; 23,02 та 22,73 %, відповідно, відносно окисненого білкового комплексу без дії УЗ.

## ВИСНОВКИ

Проведені нами дослідження металкаталізованої окисної модифікації актоміозину дозволили виявити статистично достовірні зміни параметра В та суттєве вірогідне підвищення рівня ДНФГгідрозонів порівняно зі спонтанною окисною деструкцією АМ. Отримані дані щодо визначення структурних змін окисненого білкового комплексу за дії неперервного УЗ підтверджуються аналізом рівня окисних пошкоджень.

Інтенсивності ультразвуку 0,05 та 0,2 Вт/см<sup>2</sup> достовірно не знижували кількість карбонільних груп та значення параметра В. Тоді як зі збільшенням інтенсивності (0,4; 0,7 та 1,0 Вт/см<sup>2</sup>) УЗ зменшував концентрацію карбонільних груп та змінював параметр В, проте остаточно не нормалізував їх показники. Такий вплив може бути зумовлений тепловим ефектом, який проявляється вище 0,4 Вт/см<sup>2</sup>, тоді як при 0,05 та 0,2 Вт/см<sup>2</sup> він відсутній.

Таким чином, окиснений актоміозин за дії ультразвуку повністю не відновлюється. Причому прослідковується чітка тенденція до зменшення деструкції білкових молекул, тобто до їх нормалізації з підвищенням інтенсивності УЗ.

## Література

1. Дубинина Е.Е., Коновалов П.В., Солитернова И.Б. и др. Окислительная модификация белков плазмы крови у пожилых людей с сосудистой деменцией // Украинський біохімічний журнал. – 2001. – Т. 73, № 1. – С. 125–129.
2. Лисицина Т.А., Васильева И.М., Дурнев А.Д. и др. // Докл. РАН. – 1999. – Т. 365, № 2. – С. 263–266.
3. Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Поротов И.Г. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // Вопросы медицинской химии. – 1995. Т. 41, вып. 1. – С. 24–26.
4. Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях // Украинський біохімічний журнал. – Київ, 2008. – Т. 80, № 6. – С. 5–18.
5. Дубинина Е.Е., Гавровская С.В., Кузьмич Е.В. и др. Окислительная модификация белков: окисление триптофана и образование битиروزина в очищенных белках с использованием системы Фентона // Биохимия. – 2002. – Т. 67, № 3. – С. 413–421.
6. Нурищенко Н.Е., Мирошниченко 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.
7. Чорноморець П.М., Нурищенко Н.С., Мірошніченко М.С., Кленко А.В. Вплив ультразвуку на вільнорадикальне окиснення в скелетних м'язах при їх травмуванні // Фізика живого. – 2007. – Т. 15, № 2. – С. 73–76.
8. Тартаковский А.Д. // Сб.: Биофизические и биохимические методы исследования мышечных белков / Под ред. Иваницкого Г.Р. – Л.: Наука. – 1978. – С. 55–76.
9. Филенко А.М., Зима В.Л. Двухволновой метод регистрации малых спектральных сдвигов флуоресценции белков // Молекулярная генетика и биофизика. – К.: Мир, 1981. – С. 126–135.
10. Дубинина Е.Е., Морозова М.Г., Леонова Н.В. и др. Окислительная модификация белков плазмы крови больных психическими расстройствами (депрессия, деперсонализация) // Вопросы медицинской химии. – 2000. – № 4. – С. 6–9.
11. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N. et al. // Meth. Enzymol. – 1990. – Vol. 186. – P. 464–478.
12. Oliver C.N., Ahn B.W., Moerman E.J. et al. // J. Biol. Chem. – 1987. – Vol. 262. – P. 5488–5491.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНО-МОДИФИЦИРОВАННОГО АКТОМИОЗИНА СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ КРОЛИКА ПОД ВЛИЯНИЕМ УЛЬТРАЗВУКА

Медынская Е.А., Шелюк О.В., Литюга В.В., Омелянюк В.С.

Проведено исследование структурных характеристик и определение степени повреждения окислительно-модифицированного актомиозина (АМ) скелетных мышц кролика под влиянием ультразвука (УЗ). Было обнаружено достоверные изменения параметра В и повышение уровня 2,4-ДФгидразонов по сравнению со спонтанной окислительной деструкцией актомиозина. Полученные данные подтверждаются анализом уровня окислительных повреждений. Под влиянием УЗ уменьшалось количество карбонильных групп, что отражалось на значениях параметра В, который характеризует структурные изменения. Ультразвук с интенсивностями 0,05 и 0,2 Вт/см<sup>2</sup> не влиял на исследуемые параметры по сравнению с окислением. Тогда как УЗ с повышением интенсивности (0,4; 0,7 та 1,0 Вт/см<sup>2</sup>) в силу термической компоненты влиял более выраженно. Ультразвук хотя и уменьшал концентрацию карбонильных групп, однако окончательно не нормализовал белок. Таким образом, окисленный актомиозин под влиянием ультразвука полностью не восстанавливался.

**Ключевые слова:** актомиозин, окислительная модификация белков, карбонильные группы, ультразвук, параметр В.

## ULTRASOUND INFLUENCE ON STRUCTURAL CHARACTERISTICS AND DAMAGE RATE OF OXIDATIVE MODIFICATION ACTOMYOSIN FROM RABBIT SKELETAL MUSCLES

Medynskaya K.A., Shelyuk O.V., Lityuga V.V., Omelyanyuk V.S.

Oxidative modification and structural characteristics of actomyosin (AM) from rabbit skeletal muscles under ultrasound (US) were studied. It was found significant parameter B changes and increase of 2,4-DNFhydrazones under oxidation compared with spontaneous oxidative destruction of actomyosin. The analysis of level oxidative damage confirms by obtained data. The rate of carbonyl groups decrease under influence of US, that reflected on the values of parameter B, which characterizes structural changes. Ultrasound with 0,05 and 0,2 W/cm<sup>2</sup> intensities did not influence on investigational parameters in comparison with oxidation. While US with increased intensity (0,4; 0,7 and 1,0 W/cm<sup>2</sup>) as a result of thermal component more expressed action. Thus, an ultrasound decreases the concentration of carbonyl groups, but did not finally normalizes protein. Oxidized actomyosin is not being restored completely under the influence of ultrasound.

**Key words:** actomyosin, oxidative modification of proteins, carbonyl groups, ultrasound, parameter B.