

АКТИВНОСТЬ МИОЗИНА В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ СОБАК ПРИ УДЛИНЕНИИ КОСТЕЙ ГОЛЕНИ

М.В. Стогов, А.И. Гайдышев

**Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им.
акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, Курган, Россия
stogo_off@list.ru**

В настоящее время удлинение костей конечностей по методу Илизарова может являться интересной моделью для изучения метаболических сдвигов, происходящих в скелетных мышцах в условиях их переудлинения. Для исследований по сохранению и восстановлению двигательной активности мышц при удлинении конечности актуальным остается вопрос, связанный с изменениями, происходящими в мышце на молекулярном уровне, а именно изменениями активностей ферментов в сократительном аппарате мышц. Цель настоящего исследования – изучить активность миозиновой АТФ-азы различных мышц собак в условиях оперативного удлинения костей голени по Илизарову.

Материалы и методы. Исследование проведено на 30 взрослых беспородных собаках, которым в течение 28 суток осуществляли удлинение костей голени по Илизарову. Режим удлинения составлял 1 мм/сутки за 4 приема, после чего голень фиксировали в аппарате 30 суток (эксперименты проведены к.в.н. А.А. Емановым). Животных выводили из опыта через 14, 28 суток distraction, 15, 30 суток фиксации и 30, 180 суток после снятия аппарата. В качестве объектов исследования были взяты передняя большеберцовая (ПББМ) и икроножная мышца (ИКМ) удлиняемого и контралатерального сегмента конечности. Результаты исследования в экспериментальной группе сравнивали с группой интактных животных ($n=7$). На проведение экспериментального исследования получено разрешение комитета по этике при ФГУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ.

Миозин получали согласно модифицированной нами схеме выделения, основанной на растворимости миозина и актина в растворах солей различной ионной силы, которая сводилась к многократному, последовательному осаждению и растворению миозина в растворах хлористого калия разной концентрации. После выделения и переосаждения полученный препарат миозина лиофильно высушивали. Оценку на чистоту препарата миозина проводили методом электрофореза с помощью системы Paragon Beckman на пластинках той же фирмы. Электрофорез показал, что полученный белок имел одиночную четко выраженную полосу, что свидетельствовало о чистоте полученного препарата.

Об активности фермента судили по количеству неорганического фосфата, который образовался при действии миозина на АТФ в присутствии Ca^{2+} . Реакцию останавливали добавлением 1 мл 7,5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Затем в растворе по реакции с молибдатом аммония определяли неорганический фосфат, образовавшийся в процессе ферментативного расщепления АТФ. Ферментативную активность миозиновой АТФ-азы рассчитывали на мг белка в пробе, белок определяли по Лоури.

Результаты, полученные у животных экспериментальных групп, сравнивали с показателями животных интактной группы с использованием непараметрического W-критерий Вилкоксона для независимых выборок.

Результаты исследования и их обсуждение. Исследования ферментной системы сократительного аппарата мышц в условиях удлинения конечности, показали, что препараты миозина из передней большеберцовой и икроножной мышцы контралатерального и оперированного сегмента конечности, имели сигмоидальную зависимость скорости реакции от концентрации субстрата. Нами обнаружено, что при концентрациях АТФ вплоть до 0,01 ммоль, миозин не проявлял АТФ-азной активности, т.к. скорость реакции не изменялась при росте концентрации АТФ. В связи этим нами была проведена количествен-

ная оценка АТФ-азной активности миозина в пределах концентраций АТФ более 0,01 ммоль.

Согласно полученным нами данным к 28-е суткам distraction зафиксировано достоверное повышение показателя максимальной скорости ферментативной реакции препарата миозина оперированных передней большеберцовой 0,454 ($p=0,05$) и икроножной 0,390 ($p=0,047$) мышц по сравнению с показателем $V_{\max}$ миозина мышц, полученных от интактных животных, соответственно для ПББМ – 0,245 и ИКМ – 0,259. Та же тенденция сохранялась и при исследовании ферментативной активности миозина мышц контралатеральной конечности, при этом $V_{\max}$ для ПББМ и ИКМ было равно 0,344 и 0,551 соответственно. После завершения distraction мы наблюдали достоверное уменьшение величины $V_{\max}$ к 15-м суткам фиксации для ПББМ оперированной конечности до 0,238 ($p=0,03$), для ИКМ 0,338 ($p=0,01$). Аналогичная картина наблюдалась для миозина из мышц контралатеральной конечности: ПББМ – 0,247 ($p=0,02$) и ИКМ – 0,370. К 30-м суткам фиксации мы выявили тенденцию к постепенному увеличению $V_{\max}$ миозина из ПББМ оперированной конечности 0,519 ($p=0,04$) и для ИКМ – 0,481. Для миозина мышц контралатеральной конечности этот показатель достигал величин: для ПББМ – 0,675, для ИКМ – 1,914.

Основным показателем кинетики биохимических каталитических процессов является константа Михаэлиса (K_m), характеризующая сродство фермента к субстрату. В нашем случае, чем меньше значение K_m , тем предпочтительней и полнее фермент взаимодействует с субстратом, т.е. чем меньше константа Михаэлиса, тем меньше субстрата нужно ферменту для достижения максимального значения скорости химической реакции им катализируемой, т.е. сродство фермента к субстрату выше. Полученные нами данные косвенно указывают на то, что действительно при оперативном удлинении конечности в мышцах происходит изменение активности двигательных ферментов.

Нами обнаружено, что в послеоперационном периоде к 28-м суткам distraction константа Михаэлиса достоверно резко уменьшалась. Для ПББМ оперированной конечности K_m уменьшилась на 13,67 мМ, для ИКМ на 11,94 мМ ($p=0,04$) относительно интактных животных. При этом в ПББМ не оперированной конечности K_m уменьшилась на 10,92 мМ ($p=0,01$), а ИКМ на 12,88 мМ. На 15-е сутки фиксации показатель K_m в обеих мышцах увеличивался, но все же, оставался ниже значений интактных животных. Следует отметить тот факт, что K_m для ПББМ была существенно выше, чем для ИКМ как оперированной, так и контралатеральной конечности. Показатели константы Михаэлиса на этом сроке был ниже, чем в дооперационный период: для ПББМ оперированной конечности на 5,37 мМ ($p=0,02$), ИКМ на 7,56 мМ. Для ПББМ не оперированной конечности K_m снижался на 3,66 мМ, ИКМ на 6,88 мМ ($p=0,03$) от уровня интактных животных. В течение всего срока фиксации константа Михаэлиса для ПББМ контралатеральной конечности практически не изменилась (уменьшение K_m на 0,12 мМ до значения 12,57 мМ при $p=0,02$), что на 3,87 мМ меньше значений для этой мышцы в дооперационный период. В то же время для ИКМ контралатеральной конечности показатель K_m уменьшился на 5,4 мМ ($p=0,001$), что на 12,28 мМ ниже значения дооперационного периода. Для мышц оперированной конечности на 30-й день фиксации наблюдалось увеличение показателя K_m относительно значения в 15-й день, и составило для ПББМ – 4,26 мМ ($p=0,002$), а для ИКМ – 2,99 мМ. Сродство фермента к субстрату, обратно пропорционально зависящее от K_m , на 15-30-е сутки фиксации было ниже значений здоровых животных.

Сродство фермента к субстрату является величиной обратно пропорциональной константе Михаэлиса. В ходе проведенного эксперимента нами было показано, что через 28 дней distraction наблюдалось достоверное увеличение сродства фермента к субстрату с последующим снижением в период с 15 по 30 день фиксации сегмента конечности аппаратом Илизарова. После снятия аппарата наблюдалось резкое увеличение сродства фермента к субстрату, а затем в течение трех месяцев после снятия аппарата – тенденция к

его уменьшению. На 3-й месяц без аппарата значения константы Михаэлиса стали сравнимы со значениями интактных животных. На этом основании мы можем сказать, что АТФ-азная активность сократительного белка – миозина частично или полностью восстановилась к третьему месяцу после снятия аппарата. Причиной этому, на наш взгляд, является полное обновление белкового состава мышц, а так же компенсация повреждений мышечных волокон вследствие репаративной регенерации ткани.

Таким образом, на основании вышеизложенного, можно заключить, что в процессе удлинения голени по методу Илизарова происходило увеличение сродства миозина как АТФ-азы к субстрату, и, как следствие – интенсификация потребления субстрата. К моменту снятия аппарата максимальная скорость гидролиза АТФ в мышцах удлинённого и контралатерального сегмента конечности была статистически значимо выше, чем в мышцах интактных животных. В свою очередь максимальная скорость гидролиза АТФ миозином из мышц сегмента удлиняемой конечности была ниже, чем в мышцах контралатеральной конечности. На этом фоне константа Михаэлиса миозина, полученного из ПББМ и ИКМ обеих конечностей, к концу лечения оставалась сниженной относительно интактных животных, что свидетельствовало о росте сродства миозина к АТФ. Через три месяца после окончания лечения значения K_m стремились к дооперационным, при этом для миозина из ИКМ удлинённого сегмента конечности рост K_m превышал значения интактных животных.