

Н.М. Гасникова, А.А. Маркин, И.Б. Козловская, И.М. Ларина, Б.С. Шенкман

Содержание креатинфосфокиназы в сыворотке крови и состояние дистрофинового слоя сарколеммы мышечных волокон человека в условиях безопорности

Изучали влияния 7-суточной «сухой» иммерсии и дополнительной опорной стимуляции на содержание креатинфосфокиназы в сыворотке крови и состояние дистрофинового слоя сарколеммы мышечных волокон человека. Обследуемые контрольной группы у 9 добровольцев в течение 7 сут находились в условиях «сухой» иммерсии, дополнительно к которым проводили искусственную стимуляцию, а в опытной – глубоких рецепторов давления опорных зон стопы с помощью компенсатора опорной разгрузки. Процентное содержание волокон с нарушенным дистрофиновым слоем в ходе иммерсии не изменилось. Пребывание в условиях безопорности привело к достоверному снижению содержания креатинфосфокиназы в сыворотке крови и не повлияло на чувствительность сарколеммы мышечных волокон к повреждающим воздействиям. Применение компенсатора опорной разгрузки не оказало существенного влияния на изучаемые показатели.

ВСТУП

Известно, что пребывание в условиях невесомости приводит к ряду структурно-функциональных изменений опорно-двигательного аппарата. Козловской и соавт. показано, что ведущую роль в развитии этих изменений играет устранение опорной афферентации [7]. Для моделирования безопорности в наземных условиях используется «сухая» иммерсия. Во время иммерсии человек находится в ванне с водой, покрытой водонепроницаемой пленкой, размеры которой значительно превосходят площадь поверхности воды, благодаря чему осуществляется свободное и практически полное погружение тела человека в воду (рис. 1). При этом достигается равномерное давление воды на всю поверхность тела, что моделирует полное отсутствие опорных стимулов, характерное для невесомости.

Дистрофин – это цитоскелетный белок, располагающийся под сарколеммой. Вместе с комплексом связанных с ним белков дистрофин обеспечивает связь внутриклеточного цитоскелета с внеклеточным матриксом, механическую прочность сарколеммы, ее структурную целостность. При мутации гена, кодирующего синтез дистрофина, развивается тяжелое наследственное заболевание – миодистрофия Дюшена. Отсутствие дистрофина не просто делает сарколемму более чувствительной к повреждающим воздействиям, но и приводит к целому ряду структурных и функциональных изменений в мышечном волокне [1].

Содержание креатинфосфокиназы (КФК) в сыворотке крови является общепризнанным маркером мышечного повреждения и, в первую очередь, отражает состояние сарколеммы мышечных волокон, ее макро-

© Н.М. Гасникова, А.А. Маркин, И.Б. Козловская, И.М. Ларина, Б.С. Шенкман

молекулярную проницаемость. Известно, что физическая нагрузка вызывает транзиторное повреждение сарколеммы, что ведет к увеличению ее проницаемости и высвобождению некоторых цитозольных молекул, в том числе КФК. Максимальное содержание КФК в сыворотке крови отмечается через 24–48 ч после нагрузок эксцентрического характера [5, 12].

Целью нашей работы было изучение влияния 7-суточной «сухой» иммерсии и дополнительной опорной стимуляции на содержание креатинфосфокиназы в сыворотке крови и состояние дистрофинового слоя сарколеммы мышечных волокон человека.

МЕТОДИКА

Обследовано 9 мужчин-добровольцев, средний возраст которых был $(26,50 \pm 3,16)$ лет, рост $(178,30 \pm 3,95)$ см, масса $(77,90 \pm 11,09)$ кг.

Контрольную группу составили 5 человек в течение 7 сут находившихся в условиях «сухой» иммерсии без дополнительных воздействий. Для проведения различных обследований и гигиенических процедур обследуемых вынимали из ванны, общее время пребывания вне условий безопорности составило 13 ч 15 мин (7,9 %



Рис. 1. Положение обследуемых во время «сухой» иммерсии

от длительности наблюдений). Во второй группе из 4 человек дополнительно к условиям иммерсии проводили искусственную стимуляцию глубоких рецепторов давления опорных зон стопы с помощью компенсатора опорной разгрузки (рис. 2). Разработанный в ИМБП совместно с НПО «Звезда» компенсатор опорной разгрузки представляет собой специальный ботинок, в подошву которого вмонтированы пневматические подушки, обеспечивающие давление на опорные зоны стопы в заданном режиме. Стимуляцию проводили ежедневно. Стимулы, равные $0,2 \text{ кг/см}^2 \pm 0,15 \text{ кг/см}^2$, подавали 10 мин с частотой, соответствующей 75 шагам в минуту, и 10 мин с частотой, соответствующей 120 шагам в минуту, в начале каждого часа в течение 6 ч.

Пробы крови отбирали к концу 1, 3 и 6-х суток иммерсии, а также до и через 24 ч после тестирования на изокINETическом динамометре, выполненном за неделю до начала иммерсии и в первый день после ее окончания. ИзокINETическую динамометрию (ИКДМ) в сыворотке крови проводили на приборе «Clima 15» фирмы «RAL» (Испания), стандартными коммерческими наборами фирмы «Dia Sys». Измеряли содержание КФК в сыворотке крови (СК-NACFS) и содержание КФК миокардиального происхождения (СК-MBFS), затем, вычитая СК-MBFS из СК-NACFS, получа-



Рис. 2. Компенсатор опорной разгрузки

ли количество КФК мышечного происхождения.

За неделю до начала иммерсии и в первый день после ее окончания (через 5–6 ч) из *m. soleus* забирали пробы мышечной ткани методом игольчатой биопсии по Бергстрему. Криостатные срезы толщиной 10 мкм окрашивали моноклональными антителами против дистрофина (NCL-DYS 1, «Novocastra Laboratories») по стандартной методике. Анализ срезов проводили с помощью системы компьютерного анализа изображения Leika (Германия). Подсчитывали процентное содержание волокон с поврежденным дистрофиновым слоем (рис. 3).

РЕЗУЛЬТАТЫ

До начала иммерсии процентное содержание волокон с нарушенным дистрофиновым слоем не отличалось в обеих группах и оказалось равным $10,67 \% \pm 0,87 \%$ в контрольной группе и $10,10 \% \pm 1,34 \%$ в опытной. В ходе иммерсии в контрольной группе у трех из пяти обследуемых содержание таких волокон уменьшилось, а у двоих – увеличилось, и в среднем составило $9,72 \% \pm 1,13 \%$. В опытной группе

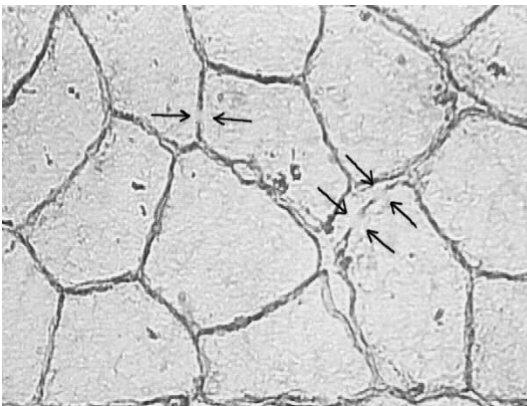


Рис. 3. Фрагмент среза, окрашенного моноклональными антителами к дистрофину. В большинстве волокон дистрофиновый слой выглядит как непрерывная линия, расположенная в области сарколеммы. В некоторых волокнах имеются участки, на которых дистрофин отсутствует (обозначены стрелками)

увеличение процентного содержания волокон с нарушенным дистрофиновым слоем произошло у двоих из трех обследованных (у одного человека проанализировать пробы мышечной ткани не удалось) и в среднем оказалось равным $11,81 \% \pm 3,53 \%$. Таким образом, процентное содержание волокон с нарушенным дистрофиновым слоем в ходе иммерсии не изменилось в обеих группах.

Поскольку содержание КФК в сыворотке крови зависит от физической активности человека, мы получили довольно большой разброс фоновых значений ($147,88 \pm 30,21$ и $197,5$ ЕД/л $\pm 59,36$ ЕД/л в контрольной и опытной группе соответственно), так как обследуемым рекомендовалось лишь избегать максимальных физических нагрузок, а общая физическая активность не ограничивалась. Поэтому мы сочли более правильным оценивать изменение содержания КФК в ходе иммерсии по отношению к значению, полученному к концу первых суток иммерсии, когда все обследованные находились в стандартных условиях в течение двух суток до начала эксперимента. В контрольной группе среднее значение содержания КФК снижалось к концу 6-х суток иммерсии на $36,86$ ЕД/л (от $132,30 \pm 21,26$ до $95,44$ ЕД/л $\pm 15,35$ ЕД/л к концу 1-х и 6-х суток соответственно, $P < 0,05$). В опытной группе снижение среднего значения КФК было даже чуть более выражено (на $43,50$ ЕД/л от $129,68 \pm 10,77$ до $86,18$ ЕД/л $\pm 20,03$ ЕД/л соответственно), но изменения оказались недостоверными. Поскольку достоверных отличий по содержанию КФК между опытной и контрольной группами на каждом этапе обследований не было выявлено, мы сочли возможным объединить обе группы. В целом по двум группам произошло достоверное снижение содержания КФК на $39,81$ ЕД/л или $30,4 \%$ к концу 6-х суток иммерсии по отношению к значениям в 1-е сутки (от $131,13 \pm 11,38$ до $91,32$ ЕД/л $\pm 10,87$ ЕД/л к

концу 1-х и 6-х суток соответственно, $P < 0,05$). Следует отметить, что наиболее выраженное снижение содержания КФК происходило в первые трое суток иммерсии.

ИКДМ привела к достоверному приросту содержания КФК как до, так и после иммерсии в обеих группах. Разброс индивидуальных значений оказался еще более выраженным, отличий между группами вновь не было выявлено. В целом по двум группам прирост КФК в ответ на ИКДМ до иммерсии составил $250,76$ ЕД/л (от $169,93 \pm 28,45$ до $420,69$ ЕД/л $\pm 83,39$ ЕД/л до и после ИКДМ соответственно, $P < 0,05$), после иммерсии – $281,09$ ЕД/л (от $91,32 \pm 10,87$ до $372,41$ ЕД/л $\pm 60,53$ ЕД/л до и после ИКДМ соответственно $P < 0,05$). Содержание КФК в сыворотке крови после ИКДМ не отличалось до и после иммерсии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Имеющиеся в литературе данные об изменении содержания дистрофина в ходе мышечной разгрузки весьма противоречивы. Так, Rezvani и соавт. показали [10], что 6 сут разгрузки приводят к увеличению содержания дистрофина в мышцах крыс. Затем Chopard и соавт. описали увеличение содержания дистрофина и некоторых ассоциированных с ним белков после 6 нед вывешивания и отсутствие достоверных изменений после 2 нед космического полета [3]. Позднее те же авторы показали уменьшение количества дистрофина после 3 нед вывешивания крыс [4]. Chockalingam и соавт. выявили уменьшение количества дистрофина через 10 сут после тенотомии [2]. Мы полагали, что пребывание в условиях иммерсии приведет к накоплению дистрофина и уменьшению количества волокон с нарушенным дистрофиновым слоем. Отсутствие изменений в нашем исследовании могло быть обусловлено отсроченностью биопсии, т.е. за 5–6 ч, прошедших после окончания иммерсии,

обычная физическая активность могла оказать некоторое повреждающее воздействие на сарколемму и вернуть долю волокон с нарушенным дистрофиновым слоем к исходному уровню. Кроме того, вполне вероятно, что 7 сут иммерсии оказалось не достаточно для восстановления дистрофинового слоя, так как в работе Lovering и De Deyne было показано, что полное восстановление дистрофинового слоя, разрушенного в результате вызванного максимального сокращения мышцы крысы, происходит не ранее чем через 1–3 нед [8].

Наши результаты относительно снижения содержания КФК в ходе иммерсии согласуются с данными других авторов, которые были получены при исследовании сыворотки крови космонавтов [9] и в ходе 14-суточной гипокинезии [5], что, по-видимому, является следствием пониженной мышечной активности и атонии мышц. Отсутствие достоверных отличий между группами обследованных может быть обусловлено тем, что характер стимуляции и ее показатели оказались недостаточными в сравнении с влиянием иммерсии.

Влияние мышечной разгрузки на чувствительность сарколеммы к повреждающим воздействиям исследовалось в двух работах. Dworzak и соавт. сравнивали величину прироста КФК в ответ на стандартную нагрузку, выполненную в первые сутки после окончания 5-суточной иммерсии и на 14-е сут восстановительного периода. Показано достоверно более высокое содержание КФК в первом случае, т.е. чувствительность сарколеммы к повреждающим воздействиям в ходе иммерсии увеличилась [6]. В работе Shenkman и соавт. обезьяны в течение 30 сут находились в условиях антиортостатической гипокинезии, а в качестве тестирующего воздействия использовали вращение на центрифуге. До начала гипокинезии это воздействие приводило к достоверному увеличению содержания КФК в сыворотке

крови, тогда как после гипокинезии оно не изменилось [11]. В нашей работе содержание КФК в сыворотке крови после ИКДМ не отличается до и после иммерсии, а большая величина прироста КФК в ответ на ИКДМ после иммерсии объясняется исходно более низким значением КФК, содержание которой снизилось в ходе иммерсии. Таким образом, влияния 7-суточной иммерсии на чувствительность сарколеммы к повреждающим воздействиям не выявлено.

ВЫВОДЫ

1. В данном исследовании не установлено влияния 7-суточной «сухой» иммерсии и дополнительной опорной стимуляции на состояние дистрофинового слоя сарколеммы мышечных волокон человека.

2. Показано снижение содержания КФК в сыворотке крови в ходе иммерсии, более выраженное в первые трое суток.

3. Прирост КФК в ответ на ИКДМ после иммерсии оказался сопоставим с таковым до начала эксперимента.

4. Использование компенсатора опорной разгрузки не оказало существенного влияния на содержание КФК в сыворотке крови.

Авторы выражают признательность всем сотрудникам ИМБП, принимавшим участие в подготовке и проведении эксперимента. Работа была поддержана Программой фундаментальных исследований Российской академии наук и Министерства промышленности, науки и технологий РФ.

N.M. Gasnikova, A.A. Markin, I.B. Kozlovskaya, I.M. Larina, B.S. Shenkman

SERUM CREATINE KINASE LEVELS AND THE NUMBER OF SARCOLEMMA DYSTROPHIN DISRUPTIONS IN HUMAN SKELETAL MUSCLE FIBERS UNDER CONDITIONS OF SUPPORTLESSNESS

9 male volunteers took part in the experiment. They were divided in two groups. 5 volunteers (control group) have been in “dry” immersion for 7 days. 4 volunteers (stimulated group)

in addition to “dry” immersion were treated with artificial support stimulation. We investigated the number of muscle fibers with the disruptions of sarcolemmal dystrophin and serum creatine kinase levels. 7-day “dry” immersion did not change the mean number of muscle fibers with dystrophin disruptions, it led to significant decrease of serum creatine kinase levels and did not influence on the sensitivity of sarcolemma to injury. Artificial support stimulation did not influence on these parameters.

RF SRC – Institute of Biomedical Problems of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blake D.J., Weir A., Newey S.E., Davies K.E. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle // *Physiol Rev.* – 2002. – **82**. – P. 291–329.
2. Chockalingam P.S., Cholera R., Oak S.A. et al. Dystrophin-glycoprotein complex and Ras and Rho GTPase signaling are altered in muscle atrophy // *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2002. – **283**. – C500–C511.
3. Chopard A., Leclerc L., Muller J. et al. Effect of a 14-day spaceflight on dystrophin associated proteins complex in rat soleus muscle // *J. Grav. Physiol.* – 1998. – **5**(1). – P. 67–68.
4. Chopard A., Pons F., Marini J. Cytoskeletal protein contents before and after hindlimb suspension in a fast and slow rat skeletal muscle // *Amer. J. Physiol.* – 2001. – **280**. – R323–R330.
5. Clarke M.S., Bamman M.M., Feedback D.I. Bed rest decreases mechanically induced myofiber wounding and consequent wound-mediated FGF release // *J. Appl. Physiol.* – 1998. – **85**(2). – P. 593–600.
6. Dworzak A.E., Secnik P., Parrak V. et al. Changes in muscular proteins during simulated microgravity // *J. Neurol. Sci.* – 1993. – **119**(1). – P. 119–20.
7. Kozlovskaya I., Dmitrieva I., Grigorieva L. et al. Gravitational mechanisms in the motor system. Studies in real and simulated weightlessness. – In: *Stance and Motion.* – New York, 1987. – P. 37–48.
8. Lovering R.M., De Deyne P.G. Contractile function, sarcolemma integrity, and the loss of dystrophin after skeletal muscle eccentric contraction-induced injury // *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 2004. – **286**. – C230–C238.
9. Markin A., Strogonova L., Balashov O. et al. The dynamics of blood biochemical parameters in cosmonauts during long-term space flights // *Acta Astronautica.* – 1998. – **42**. – P. 247–253.
10. Rezvani M., Ornatsky O.I., Connor M.K. et al. Dystrophin, vinculin, and aciculin in skeletal muscle subject to chronic use and disuse // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 1996. – **28**. – P. 79–84.
11. Shenkman B.S., Goncharova S.A., Strogonova L.B. et al. Muscle derived serum enzyme accumulation after

+gz acceleration test in rhesus monkeys exposed to bed rest // J. Grav. Physiol. – 2000. – 7(2). – P. 101–102.
12. Totsuka Manabu, Shigeyuki Nakaji, Suzuki et al. Break

point of serum creatine kinase release after endurance exercise // J. Appl. Physiol. – 2002. – 93. – P. 1280–1286.

*ГНЦ РФ – Ин-т медико-биологических проблем РАН,
Москва*