

АВИАКОСМИЧЕСКАЯ И ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

AVIAKOSMICHESKAYA I EKOLOGICHESKAYA MEDITSINA

НАУЧНЫЙ ПЕРИОДИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
SCIENTIFIC PERIODIC JOURNAL

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Орлов О.И., д.м.н., академик РАН

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Ардашев В.Н., д.м.н., профессор
Баранов В.М., д.м.н., профессор, академик РАН
Буравкова Л.Б., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН
Бухтияров И.В., д.м.н., профессор
Виноградова О.Л., д.б.н., профессор
Дьяченко А.И., д.т.н., профессор
Ерофеева Л.М., д.б.н., профессор
Иванов И.В., д.м.н., профессор
Ильин Е.А., д.м.н., профессор – заместитель главного редактора
Котов О.В., к.м.н.
Красавин Е.А., к.м.н., д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН
Меденков А.А., к.психол.н., д.м.н., профессор
Синяк Ю.Е., к.х.н., д.т.н., профессор
Сорокин О.Г., к.м.н.
Суворов А.В., д.м.н., профессор
Усов В.М., д.м.н., профессор
Хоменко М.Н., д.м.н., профессор
Mukai Ch., M.D., Ph.D. (Japan)
Sutton J., M.D., Ph.D. (USA)
Suchet L.G., Ph.D. (France)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Григорьев А.И., д.м.н., профессор, академик РАН – **председатель**
Благинин А.А., д.м.н., д.психол.н., профессор
Гальченко В.Ф., д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН
Жданько И.М., д.м.н.
Козловская И.Б., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН
Котовская А.Р., д.м.н., профессор
Никольский Е.Е., д.м.н., профессор, академик РАН
Островский М.А., д.б.н., профессор, академик РАН
Розанов А.Ю., д.г.-м.н., профессор, академик РАН
Рубин А.Б., д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН
Залуцкий И.В., д.б.н., профессор, член-корреспондент НАНБ (Беларусь)
Крышталь О.А., д.б.н., профессор, академик НАНУ (Украина)
Макашев Е.К., д.б.н., профессор, член-корреспондент АН РК (Казахстан)
Gerzer R., M.D., Ph.D., professor (Germany)
Gharib C., Ph.D., professor (France)
Yinghui Li, M.D., Ph.D., professor (China)

2017 Т. 51 № 7

(специальный выпуск)

ЖУРНАЛ ОСНОВАН В 1967 ГОДУ

С 1967 по 1974 г. назывался «Космическая биология и медицина»,
с 1974 по 1991 г. – «Космическая биология и авиакосмическая медицина»,
с 1991 г. по настоящее время – «Авиакосмическая и экологическая медицина»

ВХОДИТ В ПЕРЕЧЕНЬ ВЕДУЩИХ РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ ЖУРНАЛОВ
ВЫСШЕЙ АТТЕСТАЦИОННОЙ КОМИССИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УЧРЕДИТЕЛЬ И ИЗДАТЕЛЬ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем
Российской академии наук»

**Журнал зарегистрирован в Государственном комитете РФ по печати 28.02.1995,
рег. № 01072, лицензия ИД № 05859 от 18.09.2001 г.**

© Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, 2017
© State Research Center RF – Institute of Biomedical Problems Russian Academy of Sciences, 2017

Все права зарегистрированы. Никакая часть журнала не может быть воспроизведена
каким-либо способом без письменного разрешения Издателя
All rights reserved. No part of this journal may be reproduced in any form by any means without
written permission of the Editorial Board

**Метаданные статей, опубликованных в журнале, доступны в базе данных РИНЦ
(www.elibrary.ru) и на сайте журнала journal.imbp.ru**

Выпускающий редактор О.Г. Сорокин
Редакторы: С.О. Николаев, С.М. Плаксина
Корректор М.Е. Козлова
Компьютерная верстка Е.В. Рзаевой

Адрес: 123007, Москва, Хорошевское шоссе, д. 76а, метро «Полежаевская»,
Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН
Редакция: тел.: 8 (499) 195-68-74, факс: 8 (499) 195-22-53, эл. почта: library@imbp.ru
Секретарь: Муромцева Т.С., тел.: 8 (499) 195-65-12, эл. почта: arhiv@imbp.ru

Сдано в набор 04.12.2017
Подписано в печать 11.12.2017
Формат 60 × 84 1/8
Гарнитура Tahoma
Печать офсетная
Усл. печ. л. 14,88
Тираж 200 экз
Заказ № 340

Отпечатано в типографии ООО ИПЦ «Научная книга».
Адрес: 394030, г. Воронеж, Московский пр-т, д. 116.

Содержание

Введение

Томиловская Е.С., Козловская И.Б., Шенкман Б.С.,
Виноградова О.Л., Буравкова Л.Б., Орлов О.И.
XXXVIII Ежегодный международный симпозиум
по гравитационной физиологии

Экспериментальные и общетеоретические исследования

Орлов О.И., Колотева М.И. Центрифуга ко-
роткого радиуса как новое средство профилак-
тики неблагоприятных эффектов невесомости и
перспективные планы по разработке проблемы
искусственной силы тяжести применительно к
межпланетным полетам

Попова Ю.А., Суворов А.В., Зарипов Р.Н.,
Дьяченко А.И. Внешнее дыхание и распределе-
ние жидких сред в организме человека при дыха-
нии с дополнительным сопротивлением на вдохе
в условиях космического полета

Алчинова И.Б., Яковенко Е.Н., Кушин В.В.,
Иноземцев К.О., Карганов М.Ю., Баранов В.М.
Космический эксперимент «Феникс»: предвари-
тельные итоги

Амирова Л.Е., Шишкин Н.В., Китов В.В.,
Савеко А.А., Томиловская Е.С., Козловская И.Б.
Роль зрительной обратной связи в контроле вер-
тикальной устойчивости человека до и после
5-суточной «сухой» иммерсии

Шпаков А.В., Воронов А.В. Особенности орга-
низации ходьбы человека в условиях различной
по величине гравитационной нагрузки на опор-
но-двигательный аппарат

Фомина Е.В., Савинкина А.О., Лысова Н.Ю.
Эффективность локомоторных тренировок на
борту МКС в зависимости от индивидуальных
особенностей величин опорных реакций

Мейгал А.Ю., Герасимова-Мейгал Л.И.,
Саенко И.В., Субботина Н.С., Третьякова О.Г.,
Черникова Л.А. Влияние «сухой» иммерсии как
аналога микрогравитации на неврологические
симптомы при паркинсонизме

Саенко И.В., Черникова Л.А., Пойдашева А.Г.,
Хижникова А.Е., Кремнева Е.И., Морозова С.Н.,
Коновалов Р.Н., Козловская И.Б. Нейропласти-
ческие изменения в коре головного мозга, вы-
званные применением механической стимуляции
опорных рецепторов и мягкого мультимодального
экзоскелетонного комплекса «Регент» у здоро-
вых лиц и постинсультных больных

Contents

Introduction

5 Tomilovskaya E.S., Kozlovskaya I.B., Shenkman B.S.,
Vinogradova O.L., Buravkova L.B., Orlov O.I. XXXVIII
Annual International Gravitational Physiology
Meeting

Experimental and Theoretical Investigations

11 Orlov O.I., Koloteva M.I. Short-arm centrifuge
as a new countermeasure to the adverse effects
of microgravity and forward plans of work on the
problem of artificial force of gravity in context of
exploration missions

19 Popova Yu.A., Suvorov A.V., Zaripov R.N.,
Dyachenko A.I. The lung function and fluid distribu-
tion in humans under negative inspiratory pressure
breathing in spaceflight

26 Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Kushin V.V.,
Inozemtsev K.O., Karganov M.Yu., Baranov V.M. The
«Phoenix» space experiment: preliminary results

31 Amirova L.E., Shishkin N.V., Kitov V.V., Saveko A.A.,
Tomilovskaya E.S., Kozlovskaya I.B. The role of visu-
al feedback in the control of human vertical stability
before and after 5-day «dry» immersion

38 Shpakov A.V., Voronov A.V. Peculiarities of human
walking under different level of gravitational loading
on musculoskeletal system

48 Fomina E.V., Savinkina A.O., Lysova N.Yu.
The efficiency of locomotor training onboard the
International space station depending on ground
reaction forces individual features

53 Meigal A.Yu., Gerasimova-Meigal L.I., Saenko I.V.,
Subbotina N.S., Tret'yakova O.G., Chernikova L.A.
The effect of «dry» immersion as microgravity
analogue on neurological symptoms in Parkinsonism

60 Saenko I.V., Chernikova L.A., Poydasheva A.G.,
Khizhnikova A.E., Kremneva E.I., Morozova S.N.,
Konovalov R.N., Kozlovskaya I.B. Neuroplastic
changes in the cerebral cortex caused by the use of
mechanical stimulation of the support receptors and
the soft multimodal exoskeleton complex «Regent»
in healthy individuals and post-stroke patients

Руденко Е.А., Пучкова А.А., Баранов М.В. Исследование состояния периферической микроциркуляции при длительном пребывании в условиях ортостатической и антиортостатической гипокинезии

67 Rudenko E.A., Puchkova A.A., Baranov M.V. The research of peripheral microcirculation with a long stay in head-up bed rest and head-down bed rest

Атякшин Д.А., Бурцева А.С., Ильин Е.А., Алексеева Н.Т., Шишкина В.В. Экспрессия протеаз в тучных клетках органов пищеварительной системы монгольских песчанок после космического полета

71 Atiakshin D.A., Burtseva A.S., Ilyin E.A., Alexeeva N.T., Shishkina V.V. Protease expression in mast cells of digestive organs of Mongolian gerbils after spaceflight

Кирюхина О.О., Гайнуллина Д.К., Тарасова О.С., Виноградова О.Л. Механизмы эндотелий-зависимого расслабления разных артерий мыши: связь с изменениями в полетном эксперименте «Бион-М1»

80 Kiryukhina O.O., Gaynullina D.K., Tarasova O.S., Vinogradova O.L. Mechanisms of endothelium-dependent relaxation of different murine arteries: relationship to the alterations in «Bion-M1» flight experiment

Кузнецов М.С., Резвяков П.Н., Лисюков А.Н., Волков К.Д., Исламов Р.Р., Никольский Е.Е. Транскриптомный профиль спинного мозга мыши после 30-суточного космического полета на биоспутнике «Бион-М1» и последующей 7-суточной реадaptации на Земле

85 Kuznetsov M.S., Rezvyakov P.N., Lisyukov A.N., Volkov K.D., Islamov R.R., Nikolskiy E.E. Transcriptomic profile of mice spinal cord after 30 day space flight on «Bion-M1» biosatellite and subsequent 7 day readaptation

Прощина А.Е., Гулимова В.И., Барабанов В.М., Харламова А.С., Савельев С.В. Клетки Пуркинье хрящепалых гекконов после 30-дневного космического полета

88 Proshchina A.E., Gulimova V.I., Barabanov V.M., Kharlamova A.S., Saveliev S.V. Purkinje cells of thick-toed geckos after the 30-days space flight

Брындина И.Г., Шалагина М.Н., Овечкин С.В., Яковлев А.А. Метаболизм сфинголипидов в скелетных мышцах передних и задних конечностей мышей при антиортостатическом вывешивании разной длительности

94 Bryndina I.G., Shalagina M.N., Ovechkin S.V., Yakovlev A.A. Sphingolipid metabolism in mice forelimb and hindlimb skeletal muscles under antiorthostatic suspension of different durations

Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Петрова И.О., Шенкман Б.С. Сигнальные пути регуляции синтеза белка в постуральной мышце крысы в период реадaptации после функциональной разгрузки

99 Mirzoev T.M., Tyganov S.A., Petrova I.O., Shenkman B.S. Signaling pathways of protein synthesis regulation in rat postural muscle during recovery after hindlimb unloading

Попова А.С., Лагерева Е.А., Виноградова О.Л., Андреев-Андриевский А.А. Объем крови, ее клеточный состав и содержание воды в тканях мышей при антиортостатическом вывешивании

106 Popova A.S., Lagereva E.A., Vinogradova O.L., Andreev-Andrievskiy A.A. Blood volume, hematological parameters and tissue water content in hindlimb-unloaded mice

Тыганов С.А., Петрова И.О., Мирзоев Т.М., Шенкман Б.С. Изменение синтеза белка в изолированной *m. soleus* крысы в ответ на эксцентрическую нагрузку на фоне антиортостатического вывешивания

114 Tyganov S.A., Petrova I.O., Mirzoev T.M., Shenkman B.S. Changes in protein synthesis in isolated rat *m. soleus* after bout of eccentric contractions under hindlimb unloading condition

Куприянова М.С., Локтев С.С., Орлов О.И., Огнева И.В. Состояние цитоскелета клеток яичников и семенников *Drosophila melanogaster*, прошедших полный цикл гаметогенеза в условиях измененного внешнего механического поля

120 Kupriyanova M.S., Loktev S.S., Orlov O.I., Ogneva I.V. *Drosophila melanogaster* ovary and testes cells cytoskeleton after complete gametogenesis cycle under changed external mechanical field

ВВЕДЕНИЕ

XXXVIII ЕЖЕГОДНЫЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ СИМПОЗИУМ ПО ГРАВИТАЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ

Томиловская Е.С., Козловская И.Б., Шенкман Б.С., Виноградова О.Л., Буравкова Л.Б., Орлов О.И.

Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

E-mail: ikozlovs@imbp.ru

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-5-10

XXXVIII ежегодный международный симпозиум по гравитационной физиологии (28 мая – 2 июня 2017 г.) организован по инициативе Международного общества по гравитационной физиологии (ISGP) и Института медико-биологических проблем РАН (ИМБП) при поддержке Федерального агентства научных организаций России, Российской академии наук и Российского фонда фундаментальных исследований.

В работе симпозиума приняло участие 119 исследователей из разных стран, в том числе наиболее многочисленными были делегации из России (58 участников), США (11 участников), Франции (10 участников), Германии (7 участников), Японии (4 участника) и Италии (3 участника). Активно участвовали в работе международного симпозиума более 40 студентов и аспирантов. Российские участники представляли 13 научных и образовательных организаций: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии», Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения РФ, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ижевская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный

медицинский университет» Минздрава России, НИИ Космической медицины ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России», Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина», Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Петрозаводский государственный университет», Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» (Биологический факультет) и Научный клинический центр ОАО «РЖД».

В соответствии с традициями были проведены 4 пленарные сессии: современные концепции гравитационной физиологии, (председатели Ч. Фуллер, М. Хеер); нейровестибулярные и сенсомоторные ответы на длительные космические полеты (КП) (председатели И. Козловская, М. Решке); перераспределение жидкости в КП (председатели М.-А. Кусто, О. Виноградова); профилактика в КП: искусственная гравитация (председатели П. Норск, О. Орлов).

Первый пленарный симпозиум под руководством председателя Международного общества по гравитационной физиологии Мартины Хеер и ее заместителя Чарльза Фуллера был посвящен 90-летию юбилею И.Б. Козловской. Симпозиум открылся вводными выступлениями Мартины Хеер и Олега Орлова, которые приветствовали участников конференции и пожелали успеха мероприятию. С первым докладом выступил Б.С. Шенкман, который остановился на истории развития классической концепции И.Б. Козловской о роли тонической системы и опорной афферентации в реализации действия гравитационных механизмов в двигательной системе млекопитающих. Эта концепция возникла в результате многолетних исследований двигательной

системы человека и животных на разных уровнях ее организации в условиях реальной и моделируемой невесомости. Ее основные положения были многократно подтверждены экспериментально. Именно она стала фундаментом для разработки многочисленных методов и средств профилактики в КП и неврологической реабилитации в клинике.

Во втором докладе Ч. Фуллер остановился на истории совместных российско-американских исследований на обезьянах в широко известной программе «Бион». Работа в этой программе дала толчок к целому ряду серьезных и продвинутых исследований вестибулярной системы, вегетативного обеспечения работы мозга, биологических ритмов, которые развивались в обеих странах. «Двигателем» программы космических исследований на приматах была И.Б. Козловская.

В докладе Ивонн Мунье из Франции подводился итог всей совокупности совместных работ российских и французских авторов, посвященных исследованию гравитационных механизмов в нервно-мышечной системе млекопитающих. Эти работы, начатые по инициативе И.Б. Козловской в рамках программы «Бион», продолжались уже в исследованиях на грызунах, выполнявшихся совместно с лабораторией Б.С. Шенкмана.

Представляющий на симпозиуме НАСА (США) Вильям Палоски в докладе рассказал о совместных российско-американских исследованиях системы моторного контроля, выполнявшихся в длительных экспедициях на орбитальных станциях «Мир» и МКС. В докладе профессора Мано из Японии рассматривался вопрос о развитии гравитационной физиологии в Японии. Особое внимание при этом докладчик уделял факту определяющего влияния на развитие этой научной дисциплины в Японии работ российских специалистов А.И. Григорьева, И.Б. Козловской и А.Д. Егорова. И.Б. Козловская в своем сообщении рассказала о сущности российской системы профилактики, обратив особое внимание на то, что развитие российской системы профилактики в КП – явилось результатом многолетних усилий большого коллектива физиологов, тренеров, врачей, разработавших комплекс физических упражнений и других средств, который оказался оптимальным для поддержания здоровья и работоспособности космонавтов в длительных экспедициях.

Обсуждение вклада школы И.Б. Козловской в развитие гравитационной физиологии в медицинскую реабилитологию было продолжено на втором пленарном заседании «Нейровестибулярные и сомоторные ответы на длительные КП».

В рамках этого пленарного заседания центральным явился доклад члена-корреспондента РАН Ю.П. Герасименко (в соавторстве с В.Р. Эджертоном и И.Б. Козловской), посвященный механизмам

контроля позы и локомоции в отсутствии супраспинального управления. На заседании также были заслушаны доклады о восстановлении вестибулярных и проприоцептивных входов после длительных КП (М. Решке, США), о вестибуловегетативных взаимосвязях у космонавтов (К. Танака, Япония), о международной программе исследования приматов в космосе (Е.А. Ильин, Б.А. Лапин), об использовании резистивных тренажеров в профилактических мероприятиях в условиях невесомости (Х. Чан, Австрия) и др.

Третье пленарное заседание было посвящено перераспределению жидкостных сред организма в условиях невесомости. В обсуждении этой важной для гравитационной физиологии и космической медицины проблемы приняли участие П. Норск из НАСА (США) и М.-А. Кусто из Университета г. Анже (Франция), обсудившие влияние перераспределения крови на системные показатели сердечно-сосудистой системы человека в полетных и модельных экспериментах, в контрольных условиях и при использовании различных способов профилактики. А.А. Андреев-Андриевский рассказал о влиянии размеров тела различных животных на перемещение жидкостей во время вывешивания.

Ярким событием симпозиума явился доклад д-ра М. Делпа из Государственного Университета Флориды (США), который поделился своим видением связи между перераспределением жидкости и мозговым кровообращением. Обзор исследований мозговых сосудов *in vivo* и *in vitro* у представителей различных видов животных в модельных экспериментах на Земле и в КП позволил д-ру Делпу определить значимость тех или иных способов моделирования гравитационной разгрузки, определить границы их применения. Приведенные д-ром Делпом данные можно суммировать следующим образом. В большей части исследований у человека в КП выявлялось увеличение мозгового кровотока. Однако в части исследований, было обнаружено уменьшение линейной скорости мозгового кровотока или его неизменность. Возможно, линейная скорость мозгового кровотока у человека увеличивается только в первый период полета. Ответ на вопрос, можно ли моделировать изменения мозгового кровотока в экспериментах на Земле, неоднозначен. Ряд исследователей отметили противоположные изменения мозгового кровотока во время антиортостатической гипокинезии (снижение) и полета (увеличение). Это позволило им высказать предположение, что изменения перфузии мозга в полете не удастся адекватно отразить в наземных моделях. Следующий вопрос, проанализированный автором – можно ли сравнивать данные, полученные на лабораторных животных в модельных экспериментах и в полете. Оказывается, результаты, полученные на вывешенных крысах и мышах, по большей части



Руководители Международного общества по гравитационной физиологии М. Хеер и Ч. Фуллер вручают премию им. Нело Пейса профессору Ольге Леонидовне Виноградовой



По результатам работы конкурсной комиссии было выбрано 5 победителей, 4 из которых (Евгения Лагерев, Оксана Кирюхина, Кристина Любимова, Татьяна Шигуева) являются аспирантами и сотрудниками ИМБП

отличаются от результатов, получаемых на мышах в КП. Мозговые артерии вывешенных крыс утолщаются, а артерии вывешенных и «полетных» мышей не обнаруживают больших структурных изменений. В мозговых артериях вывешенных крыс наблюдается увеличение вазоконстрикторных ответов, а у вывешенных мышей такой ответ отсутствует. И наконец, у полетных мышей констрикторные ответы уменьшены. У мышей, летавших на Шаттле и «Бионе-М1», были обнаружены различия в механическом ответе сосудов (растяжимость), не связанные, по-видимому, с факторами полета, отличными от микрогравитации (пол, длительность полета, концентрация CO₂). Снижение констрикторных ответов мозговых сосудов мышей в полете может быть одним из факторов, способствующих увеличению мозговой перфузии и, возможно, увеличению внутричерепного давления. Обнаруженное у мышей в КП снижение и констрикторных, и эндотелий-зависимых дилаторных ответов мозговых артерий может способствовать ухудшению регуляции мозгового кровотока. Возникает вопрос: можно ли моделировать изменения кровотока у человека в экспериментах на мышах. Ответ не обнадеживает: по-видимому, мыши не являются идеальной моделью для исследований изменений, происходящих в мозговых артериях человека в полете. Это происходит из-за малых размеров тела животных и практически отсутствующего у них перераспределения жидкости. Существующие наземные модели условий микрогравитации для крыс и мышей адекватны для моделирования изменений в некоторых областях сосудистого русла (брыжеечные сосуды), но не годятся для других, в частности – для мозгового кровотока. Ограничения для исследований мозгового кровотока в наземных животных моделях, по-видимому, могут распространяться и на АНОГ и «сухую» иммерсию. Очень важен общий вывод, следующий из сообщения д-ра Делпа: несмотря на ограничения имеющихся в настоящее время способов моделирования условий микрогравитации для грызунов, полученные с помощью этих модельных экспериментов знания чрезвычайно полезны для раскрытия механизмов действия механических (напряжение сдвига, напряжение, вызванное растяжением стенок) и химических (метаболиты) факторов, обеспечивающих адаптацию сосудов. Данные модельных экспериментов увеличивают наши возможности интерпретации сосудистых ответов, полученных у «полетных» животных. Обсуждение представленных на симпозиуме докладов прошло оживленно и продолжалось в кулуарах.

Четвертое пленарное заседание было посвящено исследованиям в области искусственной гравитации. Основной доклад о перспективах развития этой области знаний был сделан директором ГНЦ РФ – ИМБП РАН академиком О.И. Орловым.

Интересные данные представили исследователи из Японии и США.

В ходе симпозиума помимо пленарных было проведено 9 тематических секций. Секция «Скелетные мышцы» (председатели Б. Шенкман, Й. Риттвеггер, Л. Стивенс, И. Вихлянцев) состояла из 2 заседаний, на которых было представлено 5 докладов российских и 4 – зарубежных групп исследователей. Первое заседание было посвящено исследованиям с участием человека. В докладе Й. Риттвеггера (Германия) обсуждались первые предварительные результаты исследований биоптатов *m. soleus* 2 европейских астронавтов. Получены первые данные об изменении характеристик генной экспрессии и сигнальных белков после длительного КП на МКС. В работе коллектива из Лилльского университета (Л. Стивенс) сопоставлялись результаты, впервые полученные европейскими учеными при исследовании биоптатов *m. vastus lateralis* после 3-суточного пребывания испытуемых в условиях «сухой» иммерсии и результаты, полученные в экспериментах с вывешиванием крыс. Основные данные касались изоформного состава тропонинов. Результаты, полученные в экспериментах с «сухой» иммерсией группой авторов из Монпелье (группа профессора Анжель Шопард), в целом соответствуют результатам, ранее полученным в ИМБП. Однако ряд результатов этой группы показался аудитории неоднозначными, что вызвало оживленную дискуссию. Так, было подвергнуто серьезной критике предположение авторов о возможной денервационной природе эффектов «сухой» иммерсии. По мнению Л. Стивенс, требуют проверки их результаты, интерпретируемые как свидетельство отсутствия сдвига миозинового фенотипа.

На втором заседании рассматривались результаты, полученные при исследовании молекулярных механизмов мышечной пластичности в условиях разгрузки. Эти работы, как правило, проводятся на лабораторных грызунах с использованием известной модели антиортостатического вывешивания. В экспериментах с использованием этой модели, а также при анализе биоптатов *m. soleus* человека после 3 сут «сухой» иммерсии сотрудникам лаборатории Б.С. Шенкмана удалось обнаружить глубокое снижение активности ключевого энергосенсора мышечных волокон АМФ-активируемую протеинкиназу (АМПК) на раннем этапе гравитационной разгрузки. Показано, что это снижение активности приводит к глубоким сдвигам процессов регуляции белкового обмена и процессов генной экспрессии. В экспериментах группы авторов из Ижевской государственной медицинской академии (под руководством проф. И.Г. Брындиной) были выявлены глубокие изменения сфинголипидной сигнализации в камбаловидной мышце грызунов на раннем этапе разгрузки. Группа авторов из

лаборатории Б.С. Шенкмана (Т.М. Мирзоев и др.) проследила изменения анаболических сигнальных путей в камбаловидной мышце крысы на раннем этапе реадaptации после гравитационной разгрузки. Как оказалось, интенсификация белкового синтеза начинается уже через 12 ч после «возвращения на Землю», будучи связана с активацией сигнального пути mTOR.

В уникальных исследованиях коллектива лаборатории структуры и функции мышечных белков Института теоретической и экспериментальной биофизики в Пущино (И.М. Вихлянцев) впервые было показано, что как в условиях реальной (биоспутник «Бион-М1»), так и моделируемой невесомости наблюдается интенсивное фосфорилирование гигантского цитоскелетного белка титина, особенно выраженное в А-доме молекулы. Физиологическое значение обнаруженного феномена еще предстоит выяснить.

В целом, проведенная сессия показала существенный прогресс как в феноменологических исследованиях мышечной пластичности в условиях невесомости, так и в анализе молекулярных механизмов выявленных изменений. Ряд лабораторий при этом обращает внимание на изучение ранних этапов процесса разгрузки и ее триггерных механизмов.

Секция «Сенсомоторные исследования» (председатели Ю. Герасименко и Е. Томиловская) состояла из 2 заседаний, на которых было представлено 6 докладов российских и 2 – зарубежных групп исследователей. Основной круг обсуждаемых вопросов этой секции составили механизмы контроля произвольных движений, в частности – локомоции и позы в условиях сниженной гравитации. В докладе Е.С. Томиловской были представлены новые данные о биомеханических и электрофизиологических характеристиках локомоций, выполняемых в условиях КП. Два доклада группы проф. Л.Н. Корниловой были посвящены результатам широких исследований вестибулярной функции и зрительно-мануального слежения в КП и модельных условиях таких, как «сухая» иммерсия и антиортостатическая гипокинезия. Доклад А. Мейгала, представляющего Петрозаводский государственный университет, был посвящен исследованию эффектов гравитационной разгрузки на проявление неврологических симптомов болезни Паркинсона.

Секция «Нейронаука и поведение» под председательством Д. Сантуччи и В. Гулимовой была представлена 5 докладами зарубежных авторов и 1 докладом российской группы исследователей. Основное внимание в докладах уделялось проблемам поведенческой адаптации животных и человека к условиям КП и его моделей. Особый интерес вызвал доклад Ч. Фуллера о вкладе результатов приматологической программы биоспутников в развитие гравитационной физиологии.

На секции «Искусственная гравитация» и «Профилактика» под председательством С. Иваса и Е. Фоминой были представлены 5 докладов зарубежных и 3 доклада российских исследователей. Основное внимание докладчики уделяли проблемам предотвращения развития негативных изменений в организме человека и животных в КП и модельных условиях таких, как антиортостатическая гипокинезия. Основной акцент был сделан на таких средствах профилактики, как искусственная гравитация, вибрация и аксиальное нагружение. В докладах, посвященных разработке проблемы создания искусственной силы тяжести (ИСТ) применительно к осуществлению будущих межпланетных КП и созданию лунной базы, были представлены планы и задачи российских ученых по созданию ИСТ на основе ретроспективного анализа данных наземных исследований с 1963 по 1992 г., а также результатов экспериментальных работ по этой проблеме в 2014–2015 гг. на специальном устройстве для борьбы с неблагоприятным влиянием невесомости на организм человека – центрифуге короткого радиуса (ЦКР) – установке 4-го поколения, разработанной и введенной в эксплуатацию в ИМБП. Докладчики ознакомили аудиторию с результатами наземных исследований на ЦКР с участием мужчин и, впервые, женщин по поиску оптимальных режимов вращения на ЦКР, в том числе с отработкой перспективных и имеющихся бортовых методик мониторинга состояния испытуемых. Российскими учеными представлены планы совместных с РКК «Энергия» им. С.П. Королева перспективных работ по созданию макета ботового варианта ЦКР с последующими наземными испытаниями и, в дальнейшем, поставкой ее на орбиту в отдельном трансформируемом модуле.

Секции «Сердечно-сосудистая физиология» (председатели М. Дельп, Т. Мано) и «Респираторная физиология» (председатели В. Баранов, У. Хоффман) были представлены докладами 3 зарубежных и 6 российских групп исследователей.

Др. Делп и соавторы исследовали изменения микроархитектоники кости и эндотелий-зависимой вазодилатации у мышей линии C57black в результате вывешивания, радиационного облучения тела животного тяжелыми ионами (PO) и сочетанного воздействия того и другого. Показано, что вывешивание и PO по-разному влияют на микроархитектуру губчатой кости, при сочетанном воздействии происходит уменьшение объема кости относительно объема тела и снижение большинства показателей микроархитектоники. Эндотелий-зависимая вазодилатация не изменяется у вывешенных животных, но уменьшается у подвергнутых радиационному и сочетанному воздействию. Полученные результаты подтверждают гипотезу об участии сосудистого фактора в развитии ремоделирования скелета в

условиях моделируемой гравитационной разгрузки. В докладе французских авторов (Де Абрю и др.) рассматривалось влияние условий моделируемой микрогравитации (АНОГ) на вызванную с отолитовых и шейных рецепторов симпатическую активность у человека. Сделан вывод, что АНОГ снижает вызванный активацией отолитовых и тонических шейных рецепторов симпатический ответ, что приводит к уменьшению констрикции сосудов голени. А. Попова и соавторы обнаружили у вывешенных мышей линии C57black изменения (уменьшение) объема крови и содержания воды в тканях. Поскольку из-за малых размеров мышей у них при вывешивании практически отсутствует изменение гидростатического градиента давления, авторы сделали предположение, что изменения исследуемых показателей не зависят от размеров тела животных.

На секции «Клеточная биология, иммунология и омиксные исследования» (сопредседатели J. Love и Л.Б. Буравкова) была представлена американская программа изучения стволовых клеток на МКС (J. Love), обсуждены иммунологические аспекты длительных КП (М.П. Рыкова), проанализированы эффекты солепотребления на протеом мочи человека при длительной изоляции в гермообъекте (Л.Х. Пастушкова). Молодые ученые ГНЦ РФ – ИМБП РАН (Ратушный А.Ю. и Каширина Д.А.) доложили экспериментальные результаты по изменению функционального состояния мезенхимальных стволовых клеток человека и секрета эндотелиальных клеток при моделировании эффектов микрогравитации. Большое внимание на секции было уделено транскриптомным сдвигам в тканях

мышей в условиях длительного полета на МКС (Л.Б. Буравкова, М.С. Кузнецов, И.В. Огнева), а также характеристике костного мозга и соединительной ткани после полета на биоспутнике «Бион-М1» (Е.А. Маркина, Д.А. Атякшин). Участники заседания обсудили также методические возможности моделирования микрогравитации на культивируемых клетках и применение «омиксных» подходов для оценки механизмов влияния факторов КП.

В ходе симпозиума были проведены заседания руководства гравитационного общества, редакционной коллегии журнала *Gravitational Physiology*, рабочей группы Международной академии астронавтики по профилактике и рабочей группы Международной академии астронавтики по «сухой» иммерсии.

Профессору Е.А. Ильину и профессору О.Л. Виноградовой были вручены премии им. Нелло Пейса.

Поступила 21.11.2017

XXXVIII ANNUAL INTERNATIONAL GRAVITATIONAL PHYSIOLOGY MEETING

**Tomilovskaya E.S., Kozlovskaya I.B.,
Shenkman B.S., Vinogradova O.L.,
Buravkova L.B., Orlov O.I.**

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia).
2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 5–10

УДК 613:629.786+57.084.5

ЦЕНТРИФУГА КОРОТКОГО РАДИУСА КАК НОВОЕ СРЕДСТВО ПРОФИЛАКТИКИ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ЭФФЕКТОВ НЕВЕСОМОСТИ И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПЛАНЫ ПО РАЗРАБОТКЕ ПРОБЛЕМЫ ИСКУССТВЕННОЙ СИЛЫ ТЯЖЕСТИ ПРИМЕНИТЕЛЬНО К МЕЖПЛАНЕТНЫМ ПОЛЕТАМ

Орлов О.И., Колотева М.И.

Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

E-mail: milenakoloteva@mail.ru

Разработка проблемы создания на борту космического корабля искусственной силы тяжести (ИСТ) с использованием центрифуги короткого радиуса (ЦКР) – является составной частью работ по программе медицинского обеспечения будущих межпланетных пилотируемых космических полетов (КП). Совместно с традиционными средствами профилактики ИСТ на базе ЦКР призвана поддерживать здоровье и работоспособность космонавтов – обеспечить профилактику неблагоприятного воздействия невесомости и сократить период реадaptации после возвращения экипажа на Землю.

Проведен ретроспективный анализ данных наземных исследований (ИМБП, Россия, 1963–1992 гг.) по проблеме ИСТ с длительным вращением мужчин (21–45 лет) на специальных вращающихся стендах.

В 2015 г. в ИМБП проведены медицинские испытания на ЦКР 4-го поколения с участием 6 мужчин (21–35 лет) и впервые в эксперименте «Луна-2015» ЦКР была использована в группе 5 женщин-добровольцев (25–35 лет). Действующим фактором в испытаниях являлись перегрузки направления «голова – таз» (+Gz) до 1,5–2 ед. на уровне стоп. Вращения на ЦКР по тестовым режимам подтвердили возможность женщин переносить перегрузки +Gz при вращении на ЦКР. Выявлены также некоторые особенности реакций женского организма, по сравнению с мужчинами.

Ключевые слова: центрифуга короткого радиуса, искусственная сила тяжести, межпланетные космические полеты.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 11–18.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-11-18

Большой объем научных данных медицинского обеспечения деятельности экипажей на борту орбитальных комплексов «Мир» и Международной космической станции (МКС), накопленный в ГНЦ РФ – ИМБП РАН, убедительно свидетельствует о возможности длительной, вплоть до 1,5 лет, работы космонавтов в орбитальном полете. Однако

пребывание в невесомости приводит к детренированности организма, снижению его функциональных возможностей и работоспособности и это, как показали исследования, не зависит от продолжительности космического полета (КП) [1, 2]. Выявленные изменения реакций сердечно-сосудистой, костной, мышечной и других систем организма существенно повышают медицинские риски при возвращении на Землю после КП длительностью от 6 мес до 1 года. При этом значительно снижаются переносимость космонавтами перегрузок при спуске на Землю, ортостатическая устойчивость, физическая работоспособность космонавтов и их возможность к самостоятельной деятельности непосредственно после приземления, что требует посторонней помощи на месте посадки и проведения послеполетных реабилитационных мероприятий [3, 4]. Признаки детренированности сердечно-сосудистой системы космонавтов, вплоть до выраженных проявлений, на этапе возвращения на Землю и в раннем периоде реабилитации не зависят от длительности пребывания в невесомости [5].

Первые КП показали жизненную необходимость разработки и применения на борту орбитальных станций системы физической профилактики нарушений, вызываемых воздействием факторов КП. В настоящее время в длительных полетах на борту МКС используется российская система профилактики, включающая в качестве основного элемента физические тренировки. Эффективность физических тренировок убедительно доказана ранее в длительных КП на станциях «Мир» и МКС [6]. Однако несмотря на многолетнее развитие средств профилактики, эта система не позволяет полностью предотвратить изменения в деятельности физиологических систем. Профилактика неблагоприятного влияния невесомости определяется теми представлениями о механизмах формирования изменений в невесомости, которыми мы в настоящее время располагаем. Ключевым положением этих



Рис. 1. Положение испытуемой на консоли ложемента ЦКР до начала воздействия перегрузок «голова – таз»

представлений является применение профилактических воздействий на такие первичные пусковые эффекты невесомости, как снятие гидростатического давления крови, перераспределение жидких сред организма и снятие весовой нагрузки на костно-мышечный аппарат. Значительно более сложен выбор мер профилактики тех изменений, которые обусловлены нарушением деятельности афферентных систем в невесомости [7]. Некоторые профилактические воздействия, например, воздействие отрицательного давления на нижнюю половину тела, способствуя перераспределению крови к ногам, воспроизводят ощущения и некоторые изменения в организме, характерные для вертикальной позы человека в условиях жизни на Земле. Однако восполнить отсутствие гравитационных стимулов для специфических гравирецепторов, не прибегая к созданию искусственной силы тяжести (ИСТ) в полном объеме невозможно. Перераспределение жидкостных сред организма в невесомости вкупе с опорной и механической разгрузкой приводит к детренированности сердечно-сосудистой и мышечной систем. Следствием этого является резкое снижение работоспособности космонавтов. Одним из возможных средств, позволяющих восстанавливать «земную» картину распределения жидкостных сред организма и афферентации от проприорецепторов, является вращение на центрифуге короткого радиуса, т.е. создание в полете искусственной силы тяжести. Для практической реализации идеи создания ИСТ на борту межпланетного корабля в целях медицинского обеспечения длительных КП за пределами земной орбиты необходимо проведение целенаправленных комплексных наземных модельных исследований на ЦКР с перспективой разработки и создания бортового варианта центрифуги короткого радиуса действия (ЦКР) для апробации наземных результатов в орбитальных полетах. Первоочередной задачей является определение оптимальных режимов создания

ИСТ на ЦКР с точки зрения эффективности профилактики неблагоприятных эффектов невесомости, безопасности для экипажа и минимизации времени, требуемого для проведения профилактических мероприятий в полете [8, 9].

Цель данной работы – ретроспективный анализ результатов исследований с участием человека при его нахождении во вращающихся системах (1960–1990 гг.); исследование переносимости женщинами перегрузок величиной 1,5 и 2,0 ед. в направлении «голова – таз» (+Gz), создаваемых при вращении на ЦКР ИМБП до и после 8-суточного пребывания в условиях изоляции (эксперимент «Луна-2015»); предварительная проработка вопросов размещения бортового варианта

ЦКР в перспективном трансформируемом модуле космического комплекса.

Методика

ЦКР ИМБП нового поколения – полностью российская разработка, создавалась с учетом предыдущего опыта работы, а также мировых аналогов, она позволяет проводить все необходимые наземные исследования и тренировки и оснащена отечественным медицинским оборудованием, обеспечивающим постоянный контроль состояния испытуемого во время воздействия перегрузок. ЦКР позволяет решать весьма широкий спектр задач космического назначения и проводить все необходимые наземные исследования и тренировки. Важными особенностями данной центрифуги являются:

- возможность одновременного вращения 2 человек;
- выдвижные консоли, позволяющие изменять расстояние головы человека от оси вращения и создавать разные гравитационные градиенты (важно для получения адекватной гравитационной нагрузки на весь организм человека);
- использование специальной конструкции ложементов с изменяемой геометрией позволяет существенно сократить радиус ЦКР, что имеет значение при разработке бортового варианта ЦКР, где модуль может иметь ограниченные размеры по радиусу;
- возможность использования одновременно с вращением на ЦКР физических тренажеров (например, компактный велоэргометр); полностью закрытые от внешних оптокинетических воздействий кабины.

В 2015 г. проведены медицинские испытания на ЦКР ИМБП с участием 5 женщин-добровольцев (25–35 лет, 8-суточный эксперимент с изоляцией «Луна-2015»). ЦКР была использована

в группе испытуемых женщин впервые. Действующим фактором в испытаниях являлись перегрузки $+G_z$ величиной 1,5 и 2,0 ед. на уровне стоп.

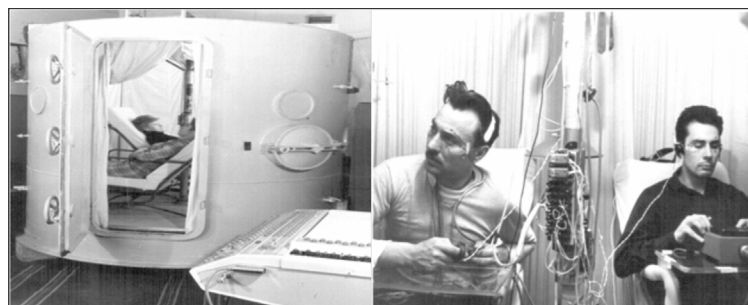
Допуск к вращениям всех испытуемых на ЦКР осуществлялся по критериям, принятым для космонавтов-профессионалов. Вращения женщин проводились независимо от фазы менструального цикла. Экспериментальные исследования по проекту «Луна-2015» одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 407 от 30.09.2015 г.).

До эксперимента женщины подвергались воздействию перегрузок дважды: во время ознакомительного и контрольного вращений. После эксперимента женщины испытывали воздействие перегрузок один раз. Каждое исследование на ЦКР проводилось в течение 1 рабочего дня. Между ознакомительным и контрольным вращением на ЦКР до начала эксперимента был перерыв 2 сут.

Для сравнительной оценки переносимости женщинами и мужчинами перегрузок, создаваемых вращением на ЦКР, использовались данные, полученные при вращении на ЦКР по аналогичным режимам перегрузок у 6 мужчин-добровольцев в возрасте от 21 до 35 лет. Ознакомительное и контрольное вращения на ЦКР у мужчин проводилось 1 раз. Между ознакомительным и контрольным вращением на ЦКР был перерыв 2 сут.

С помощью аппаратуры медицинского контроля во время вращений на ЦКР регистрировались: время сенсомоторной реакции на предъявляемые световые сигналы; электрокардиограмма (ЭКГ) в 5 отведениях (3 отведения по Нэбу и 2 однополюсных отведения VI и V5); частота сердечных сокращений (ЧСС); систолическое и диастолическое артериальное давление (АД) методом Короткова в сосудах плеча; сфигмограмма сосудов мочки уха с компрессией; систолическое АД в сосудах мочки уха с цифровой индикацией значения; пневмограмма с расчетом и цифровой индикацией частоты дыхания (ЧД). Регистрация физиологических показателей у испытуемых проводилась в покое (до и после вращений) и при воздействии перегрузок на ЦКР.

Все испытуемые размещались на ложементе ЦКР вдоль радиуса ЦКР головой к оси вращения в позе «лежа на спине» с привязными ремнями с вытянутыми ногами по обе стороны от корпуса велоэргометра. На ложементе консоли ЦКР вращался только один человек (рис. 1). Во время вращений ЦКР «шторки» кабины были опущены, таким образом, испытуемые были «изолированы» от дополнительных зрительных оптокинетических воздействий.



А



Б

Рис. 2. Исследование влияния на организм человека длительного пребывания во вращающейся системе.

А – MBK-1 и участники испытаний 1963 г.; Б – стенд «Орбита»

После окончания испытаний проводился осмотр кожных покровов испытуемых для выявления возможных петехиальных и иных кровоизлияний, связанных с действием перегрузок. Переносимость перегрузок оценивалась на основе анализа самочувствия испытуемых и их ощущений (зрительных расстройств, затруднений дыхания и речи, вестибуловегетативных реакций) с помощью опроса по специально разработанной анкете.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием непараметрических методов сравнения независимых групп – критерия Вилкоксона. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучению влияния на организм человека длительного (до 1 мес) пребывания во вращающейся системе посвящен ряд наземных исследований российских и зарубежных авторов [8, 9–13].

Эксперименты в медленно вращающейся камере (MBK-1) были проведены в СССР в 1960-е годы с постоянной угловой скоростью (рис. 2, А). Небольшие размеры кабины были рассчитаны на 2 испытуемых при минимальных возможностях перемещений и комфорта. Пребывание в MBK-1 ограничивалось одной неделей. Первые исследования показали, что пребывание во вращающейся системе отражалось на состоянии человека: с первых минут вращения

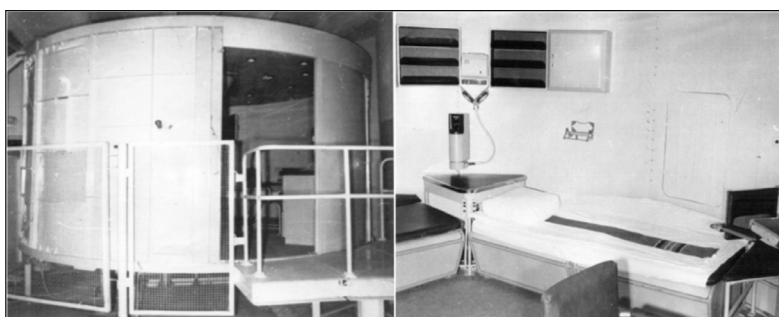


Рис. 3. Медленно вращающаяся система «Юпитер-2»

при движении головой возникали начальные проявления болезни движения (БД), через 1 ч наблюдались выраженные признаки БД вплоть до рвоты, а через 5–6 ч к имеющимся симптомам присоединялись сонливость, вялость и головная боль. Таким образом, вся симптоматика при ограниченных возможностях перемещений была достаточно выраженной уже при постоянной угловой скорости 1,8 об/мин [10].

Позже была введена в строй установка «Орбита», смонтированная на центрифуге диаметром 20 м. В жилой кабине в течение нескольких недель испытуемые могли вполне комфортно работать, жить и относительно свободно перемещаться (см. рис. 2, Б). В экспериментальных работах 1967–1972 гг. установлена возможность активного существования человека (до 1 мес) во вращающейся системе с постоянной угловой скоростью (до 6 об/мин).

Кабина стенда «Юпитер-1» была расположена на плече центрифуги АСЕА ИМБП. Эксперименты были проведены с участием 22 мужчин (22–40 лет) со скоростью 15,3 об/мин в течение 1–4 ч в условиях изменяющихся радиуса центра масс кабины и угла отклонения кабины от горизонта. При нарастании нагрузки от 1,0 до 2,0 ед. изменялись показатели, характеризующие переносимость вращения, вестибулярную реактивность и способность удерживать равновесие.

В 1989 г. в ИМБП был введен в эксплуатацию стенд «Юпитер-2» – автономная медленно вращающаяся система, которая обеспечивала возможности для активного и достаточно комфортного пребывания в ней одновременно 2 обследуемых в течение нескольких дней (рис. 3). Угловая скорость вращения составляла 6 об/мин.

Наличие связи проявления БД с двигательной активностью, регулируемой самими обследуемыми, влияло на степень выраженности симптоматики БД в зависимости от скорости вращения и исходной предрасположенности к БД [10, 14]. По сути, была разработана модель БД с использованием длительного вращения применительно к исследованиям эффективности фармакологических средств

профилактики и терапии ее космической формы [15–17, 19].

В результате проведенных работ была установлена принципиальная возможность пребывания человека во вращающемся с постоянной угловой скоростью объекте при сохранении работоспособности и отсутствии угрожающих здоровью нарушений. При угловых скоростях до 3 об/мин у большей части обследуемых практически не наступало нарушений общего состояния и работоспособности, но в диапазоне скоростей 3–6 об/мин на начальном этапе вращений возникали при-

знаки БД, зависящие от величины угловой скорости и индивидуальной вестибулярной устойчивости испытуемых. Таким образом, в наземных исследованиях было установлено, что фактор вращения с медико-биологических позиций не может быть препятствием к созданию ИСТ [10].

Наиболее реализуемым на данный момент с технической точки зрения средством для воспроизводства отсутствующих в условиях невесомости гравитационных стимулов может быть создание ИСТ путем использования на борту пилотируемой станции ЦКР.

В результате наземных исследований на ЦКР ИМБП предыдущего поколения (рис. 4) был решен вопрос о направлении действия перегрузок (вдоль продольной оси тела от головы к ногам) при вращении на ЦКР в КП. Только такое направление действия перегрузок восстанавливает практически исчезнувшее в невесомости гидростатическое давление крови, аналогично тому, которое испытывает человек при вертикальной позе в условиях земной силы тяжести. Также была доказана принципиальная возможность профилактики ряда неблагоприятных эффектов моделируемой невесомости с помощью периодического использования на ЦКР перегрузок от 1 до 2 G со 100%-ным гравитационным градиентом. Кроме того, вращения на ЦКР в сочетании с традиционными средствами профилактики были более эффективными, чем без них [8].

В экспериментальных исследованиях на ЦКР ИМБП нового поколения впервые приняли участие женщины. Анализ субъективных ощущений испытуемых (женщин и мужчин) по данным анкетирования не выявил существенных гендерных различий, за исключением психоэмоциональной составляющей восприятия воздействия. Женщины испытывали большее волнение по сравнению с мужчинами, особенно перед ознакомительными вращениями, более эмоционально описывали свои ощущения. Все субъективно перенесли воздействие перегрузок легко, самочувствие было хорошим, жалоб и замечаний не было.

В целом субъективные ощущения женщин и мужчин от перегрузок при ознакомительном вращении

можно сформулировать следующим образом: «Затруднений дыхания, речи, болевых ощущений, вестибулярных и иных нарушений не испытывали, при величине перегрузок 2 G на уровне стоп возникло кратковременно ощущение переворота в вертикальное положение».

Во время ознакомительных вращений при максимальных величинах перегрузок (1,5–2 G на уровне стоп) у всех испытуемых отмечены изменения физиологических показателей, которые не достигали критических значений. У женщин наблюдалась тенденция к более высоким значениям ЧСС и ЧД, а также статистически значимое ($p < 0,05$) увеличение систолического АД в сосудах плеча по сравнению с мужчинами, очевидно, за счет эмоционального напряжения.

Значения ЧСС у женщин до эксперимента в условиях изоляции были выше, чем после него, и достоверно ($p < 0,05$) выше, чем у мужчин на максимальной величине перегрузки. После изоляции этот показатель практически не отличался от аналогичных уровней у мужчин. Очевидно, что заключительное вращение в данной серии исследований для женщин уже не представлялось испытанием (по данным анкетирования), а скорее было интересным приключением (также субъективная оценка).

По показателю систолического АД в сосудах плеча при максимальном значении перегрузок (2 G на уровне стоп) у женщин фиксировались более высокие значения после эксперимента в условиях изоляции ($p < 0,05$). В то же время по сравнению с мужчинами этот показатель у женщин был достоверно ниже.

В исследованиях не наблюдалось критических изменений значений систолического АД в сосудах мочки уха, которое характеризует уровень кровенаполнения сосудов головного мозга и является контролем оттока крови от головы под воздействием перегрузок +Gz. Важным считается его критичное снижение с возможным появлением неблагоприятных симптомов, в том числе потери сознания испытуемыми. Все испытуемые в данных исследованиях чувствовали себя хорошо. Однако у мужчин отмечена закономерная тенденция к снижению систолического АД в сосудах мочки уха при увеличении значения перегрузок при максимальной ее величине 2 G, но с быстрым восстановлением до фонового уровня в периоде спада перегрузок. У женщин этот показатель на ЦКР до и после эксперимента с изоляцией существенно не изменялся, более того, после изоляции при перегрузке 2 G его значения практически соответствовали фоновым величинам.

Данные исследования подтвердили возможность женщин благоприятно переносить перегрузки наряду с мужчинами. Однако выявлены некоторые особенности реакции женского организма, которые по ряду физиологических показателей носили статистически достоверный характер.



Рис. 4. ЦКР ИМБП 1-го поколения: радиус – 1,7 м; 1 ложемент с расположением 1 испытуемого только в горизонтальном положении; максимальная величина перегрузок + 2 Gz на уровне стоп; ось вращения – на уровне переносицы; отсутствие кабины

В дальнейших исследованиях применительно к межпланетным полетам предстоит решить широкий круг вопросов, связанных с воздействием вращения на ЦКР на организм человека. Одним из основных этапов предполагается проведение исследований в наземных экспериментах с моделированием физиологических эффектов невесомости с применением ЦКР в качестве средства профилактики неблагоприятных эффектов как самостоятельно, так и в комплексе с традиционными средствами [9].

В наземных экспериментах необходимо разработать и стандартизировать эффективные режимы использования ЦКР, которые предусматривают поиск оптимальных соотношений радиуса ЦКР, величины перегрузки, скорости набора, длительности и периодичности вращений для профилактики отрицательных эффектов невесомости и критериев оценки состояния здоровья испытуемых [9, 18].

Исследования на ЦКР в 2015 г. определили также необходимость изучения гендерных особенностей реакции испытуемых при вращении на ЦКР. В процессе исследований возник вопрос о влиянии антропометрических параметров человека (рост и масса тела женщин были по группе меньше, чем у мужчин) на изменение физиологических показателей.

Важной задачей наземных исследований является разработка протоколов проведения модельных экспериментов («сухая» иммерсия, антиортостатическая гипокинезия и применение ЦКР в этих условиях как средства профилактики), протоколов

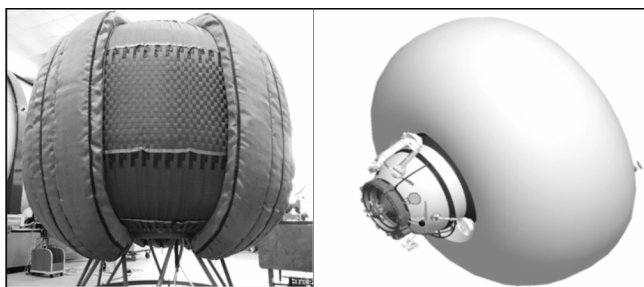


Рис. 5. Перспективный трансформируемый модуль, разработанный РКК «Энергия» им. С.П. Королева

выполнения функционально-нагрузочных тестов и критериев их оценки с точки зрения эффективности использования ЦКР.

Дальнейшим этапом работ по разработке проблемы ИСТ будет апробация и решение использования бортовой ЦКР в околоземных КП на орбитальной станции [9]. Возможно, потребуется время для уточнения и коррекции выбранных режимов в реальных условиях невесомости, а также с учетом индивидуальных особенностей членов экипажа. Эффективность ЦКР как средства профилактики неблагоприятных эффектов невесомости в орбитальных полетах будет являться основанием для ее использования в полетах вне земной орбиты [9].

Совершенно очевидно, что большой этап наземных исследований по разработке проблемы ИСТ должен идти параллельно с разработкой макета ботового варианта ЦКР с последующими наземными испытаниями и в дальнейшем поставкой действующего образца ЦКР на орбиту в отдельном модуле.

В Ракетно-космической корпорации «Энергия» им. С.П. Королева (РКК «Энергия» им. С.П. Королева) с 2012 по 2015 г. в рамках инициативного инвестиционного проекта проводились работы по исследованию и экспериментальной отработке технологии трансформируемых модулей (ТМ) (рис. 5). В результате были выбраны и сертифицированы материалы; изготовлены и экспериментально отработаны фрагменты оболочки; создан и испытан масштабный макет модуля. Подтверждена возможность создания трансформируемых модулей различного целевого назначения с улучшенными по сравнению с традиционными металлическими отсеками характеристиками.

При разработке предложений по созданию ТМ с ЦКР были рассмотрены различные варианты размещения центрифуги в составе модуля. Каждый вариант имеет свои преимущества и недостатки и требует детального анализа. В частности, в первом варианте предусмотрены удобство компоновки модуля, значительные зоны для размещения дополнительного медицинского оборудования и

складируемых грузов, а также безопасный проход через модуль при работающей центрифуге внутри центрального отсека. Существенными недостатками являются удаление головы человека от оси вращения на 1250 мм, что может существенно противоречить параметрам оптимального режима вращений.

Преимуществами второго варианта ТМ являются рекомендуемое удаление головы человека от оси вращения (до 500 мм) при этом обеспечивается большая зона размещения ЦКР в рабочем положении. Среди недостатков следует отметить усложнение силовой схемы несущего отсека (в нижней части потребуются использование подкрепляющих конструкций, обеспечивающих восприятие нагрузок при выведении и демонтируемых на орбите) и низкая сопротивляемость ТМ изгибающему моменту в рабочей конфигурации.

В целом определена принципиальная возможность создания ТМ средней размерности с ЦКР, где голова человека будет расположена вблизи от оси вращения. Технология трансформируемых модулей предоставляет уникальную возможность размещения в составе орбитального комплекса ЦКР с диаметром до 6,5 м (с перспективой увеличения). С учетом высокой значимости решения проблемы создания ИСТ для реализации перспективных пилотируемых программ, в том числе в интересах пилотируемой экспедиции на Марс, целесообразно развернуть работы по созданию ТМ с ЦКР в ближайшее время.

К реализации идеи межпланетных полетов необходимо приступить безотлагательно, так как создание научно-технического и технологического заделов с отработкой ключевых элементов перспективных средств медико-биологического обеспечения, включая создание элементов ИСТ для пилотируемых программ освоения Луны, Марса и других космических объектов дальнего космоса, потребует существенных интеллектуальных, материальных, временных и иных ресурсов. Создание нового средства профилактики неблагоприятных эффектов невесомости с помощью ЦКР и его использование в совокупности с другими средствами профилактики позволит эффективно бороться с детренированностью организма в условиях длительных КП, сохранит здоровье и работоспособность космонавтов, т.е. внесет существенный вклад в обеспечение безопасности экипажа.

Выводы

1. В результате наземных исследований по проблеме ИСТ с длительным вращением на специальных стендах была установлена принципиальная возможность существования человека во вращающемся с постоянной угловой скоростью объекте.

2. В исследованиях на ЦКР ИМБП предыдущего поколения определена возможность профилактики ряда неблагоприятных эффектов моделируемой невесомости с помощью ЦКР в сочетании с традиционными средствами профилактики.

3. В экспериментальных исследованиях на ЦКР ИМБП нового поколения («Луна-2015») показана дальнейшая необходимость целенаправленных исследований по изучению особенностей организма женщин применительно к переносимости перегрузок на ЦКР в модельных экспериментах.

4. Совместно со специалистами РКК «Энергия» им. С.П. Королева начато проектирование бортового варианта ЦКР для использования в составе перспективного трансформируемого модуля.

Исследования в эксперименте «Луна-2015» выполнены в рамках Сводного плана основных научно-исследовательских, испытательных и опытно-конструкторских работ ГНЦ РФ – ИМБП РАН на 2015 г. Тема 65.1 (№ Гос. Регистрации 01201370667).

Список литературы

1. Газенко О.Г. Человек в космосе // Косм. биол. 1984. Т. 18. № 1. С. 3–8.
Gazenko O.G. Man in space // Kosmicheskaya biologiya. 1984. V. 18. № 1. P. 3–8.
2. Григорьев А.И., Егоров А.Д. Длительные космические полеты // Человек в космическом полете. М., 1997. Т. III. Кн. 2. С. 368–447.
Grigoriev A.I., Egorov A.D. Long-duration space flights // Man in space flight. Moscow, 1997. V. III. P. 368–447.
3. Котовская А.Р., Виль-Вильямс И.Ф. Переносимость космонавтами перегрузок +Gx // Орбитальная станция «Мир». Космическая биология и медицина. Т. 1. Медицинское обеспечение длительных полетов. М., 2001. С. 500–551.
Kotovskaya A.R., Vil-Villiams I.F. The cosmonauts' tolerance of the accelerations + Gx // Orbital station «Mir». Space biology and medicine. V. 1. Medical supply for long-term space flights. Moscow, 2001. P. 500–551.
4. Котовская А.Р., Колотева М.И. Переносимость перегрузок космонавтами МКС // Международная космическая станция. Российский сегмент. М., Т. 1. 2011. С. 236–267.
Kotovskaya A.R., Koloteva M.I. The tolerance of the accelerations of the ISS cosmonaut // International Space Station. Russian segment. Moscow, 2011. V. 1. P. 236–267.
5. Котовская А.Р., Колотева М.И. Проявление детренированности сердечно-сосудистой системы человека на этапе возвращения на Землю после пребывания в невесомости // Авиакосм. и экол. мед. 2016. Т. 50. № 1. С. 13–16.
Kotovskaya A.R., Koloteva M.I. Development of the deconditioning of the cardiovascular system of man at the stage of returning to Earth after weightlessness // Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina. 2016. V. 50. № 1. P. 13–16.
6. Фомина Е.В., Лысова Н.Ю., Козловская И.Б. Профилактика неблагоприятного влияния невесомости // Космическая медицина и биология. М., 2013. С. 61–79.
Fomina E.V., Lysova N.Yu., Kozlovskaya I.B. Prevention of adverse effects of weightlessness // Space medicine and biology. Moscow, 2013. P. 61–79.
7. Козловская И.Б. Гравитация и позно-тоническая двигательная система // Авиакосм. и экол. мед. 2017. Т. 37. № 51. С. 5–21.
Kozlovskaya I.B. Gravitation and postural-tonic motor system // Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina. 2017. T. 37. № 51. P. 5–21.
8. Виль-Вильямс И.Ф., Котовская А.Р. Влияние на организм человека искусственной гравитации, создаваемой с помощью центрифуги. Положительные и отрицательные эффекты // Там же. 2003. Т. 37. № 2. С. 11–16.
Vil-Villiams I.F., Kotovskaya A.R. The influence of artificial gravity on the human body created with a centrifuge. Positive and negative effects // Ibid. 2003. V. 37. № 2. P. 11–16.
9. Котовская А.Р., Виль-Вильямс И.Ф., Лукьянюк В.Ю. Проблема создания искусственной силы тяжести с помощью центрифуги короткого радиуса для медицинского обеспечения пилотируемых полетов вне земной орбиты // Там же. № 5. С. 36–39.
Kotovskaya A.R., Vil-Villiams I.F., Lukyaniuk V.Yu. The problem of creating artificial gravity on short-radius centrifuge for medical support of manned flights outside the Earth's orbit // Ibid. № 5. P. 36–39.
10. Котовская А.Р., Шипов А.А., Виль-Вильямс И.Ф. Медико-биологические проблемы создания искусственной силы тяжести. М., 1996.
Kotovskaya A.R., Shipov A.A., Vil-Villiams I.F. Medical-biological problems of creating artificial gravity. Moscow, 1996.
11. Burton R.R., Meeker L.J. Physiologic validation of a short-arm centrifuge for space application // Aviat. Space Environ. Med. 1992. V. 63. P. 476–481.
12. Iwasaki K., Sasaki T., Hirayanagi K., Yajima K. Usefulness of daily +2Gz load as a counter-measure against physiological problems during weightlessness // Acta Astronaut. 2001. V. 49. № 3–10. P. 227–235.
13. Iwase S., Fu Q., Narita K., Morimoto E. et al. Effects of graded load of artificial gravity on cardiovascular functions in humans // Environ. Med. 2002. V. 46. № 1–2. P. 29–32.
14. Орлов О.И., Колотева М.И., Шипов А.А. Исследования на установках медленного вращения // Космическая медицина и биология. М., 2013. С. 562–569.
Orlov O.I., Koloteva M.I., Shipov A.A. Studies on slowly rotating facilities // Space biology and medicine. Moscow, 2013. P. 562–569.
15. Галле Р.Р. Количественная оценка клинических проявлений болезни движения // Косм. биол. и авиакосм. мед. 1981. Т. 15. № 3. С. 72–75.

Galle R.R. Quantitative evaluation of the clinical manifestations of motion sickness // *Kosmicheskaya biologiya i aviakosmicheskaya meditsina*. 1981. № 3. P. 72–75.

16. Галле Р.Р., Гусакова Г.Л., Сабаяев В.В., Галле Н.Н. Оценка эффективности фармакологических средств профилактики болезни движения // Там же. 1988. Т. 22. № 4. С. 90–94.

Galle R.R., Gusakova G.L., Sabaev V.V., Galle N.N. Evaluation of the effectiveness of pharmacological means of preventing motion sickness // *Ibid.* 1988. V. 22. № 4. P. 90–94.

17. Орлов О.И. Разработка экспериментальной модели влияния болезни движения на переносимость перегрузок // *Технологии живых систем*. 2008. Т. 5. № 1. С. 35–41.

Orlov O.I. Development of an experimental model of the impact of motion sickness on the tolerance of accelerations // *Tekhnologii zhivyykh sistem*. 2008. V. 5. № 1. P. 35–41.

18. Виль-Вильямс И.Ф. Основные подходы для выбора режимов применения центрифуги короткого радиуса в длительных космических полетах // *Авиакосм. и экол. мед.* 1993. Т. 27. № 5–6. С. 52–58.

Vil-Villiams I.F. The basic approach for selecting the mode of application of a short radius centrifuge long space flights // *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 1993. V. 27. № 5–6. P. 52–58.

19. Чук М.И. Изучение фармакологических средств терапии вестибуловегетативных расстройств // Там же. 1994. Т. 28. № 3. С. 11–14.

Chuk M.I. Study of pharmacological therapy of vestibular disorders // *Ibid.* 1994. V. 28. № 3. P. 11–14.

SHORT-ARM CENTRIFUGE AS A NEW COUNTERMEASURE TO THE ADVERSE EFFECTS OF MICROGRAVITY AND FORWARD PLANS OF WORK ON THE PROBLEM OF ARTIFICIAL FORCE OF GRAVITY IN CONTEXT OF EXPLORATION MISSIONS

Orlov O.I., Koloteva M.I.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 11–18

Work on the problem of designing a short-arm centrifuge (SAC) as an artificial gravity (AG) generator aboard spacecraft is an integral part of efforts on the medical program for future piloted space exploration missions. Along with the conventional countermeasures, AG will sustain health and performance of cosmonauts in the micro-g environment and reduce time of readaptation on return to Earth.

A retrospective analysis was performed of the data from the AG studies with male volunteers (aged 21–45 yrs.) subjected to long-term rotations at the IBMP centrifuging facilities in the period from 1963 to 1992.

In 2015, medical tests of a 4th generation SAC were conducted with participation of 6 male volunteers (21–35 y.o.), and 5 female volunteers (25–35 y.o.) for isolation study «Luna-2015». The volunteers were exposed to the factor of head-to-pelvis accelerations (+Gz) of 1.5–2.0 g to the foot. Test regimens tried on the female subjects reaffirmed their +Gz tolerance during rotation on SAC. However, some differences were noted in reactions of the female organism when compared with the male organism.

Key words: short-arm centrifuge, artificial force of gravity, space exploration missions.

Поступила 05.12.2017

УДК 612.213+613.693

ВНЕШНЕЕ ДЫХАНИЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИДКИХ СРЕД В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЫХАНИИ С ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМ СОПРОТИВЛЕНИЕМ НА ВДОХЕ В УСЛОВИЯХ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

Попова Ю.А.¹, Суворов А.В.¹, Зарипов Р.Н.¹, Дьяченко А.И.^{1, 2}

¹Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

²Институт общей физики РАН, Москва

E-mail: julija.popova@gmail.com

Данная работа посвящена изучению влияния дыхания под отрицательным давлением на вдохе (ДОДвд) на паттерн дыхания и распределение жидкости по регионам тела космонавта во время космического полета (КП). Метод ДОДвд рассматривается в качестве средства профилактики повышенного кровенаполнения головы в условиях невесомости. Кроме этого, одной из задач исследования являлась углубленная оценка функции внешнего дыхания в условиях длительного воздействия микрогравитации. В статье представлены результаты космического эксперимента, полученные у 8 российских космонавтов во время КП длительностью от 115 до 340 сут. Для ДОДвд использовали маску УДОД (ОАО НПП «Звезда»), давление в подмасочном пространстве составляло в большинстве измерений -20 см вод. ст. При использовании УДОД в течение 20 мин регистрировали частоту дыхания и колебания подмасочного давления, одновременно проводили биоимпедансометрию для оценки перераспределения жидкости по регионам тела. Достоверных различий в параметрах внешнего дыхания в течение периода наблюдения не обнаружено, за исключением ожидаемого увеличения длительности задержки дыхания в КП. У некоторых обследованных космонавтов отмечали относительное снижение жизненной емкости легких, а также параметров форсированного выдоха при обследовании на борту Международной космической станции и после посадки. В условиях применения ДОДвд выявлено статистически значимое уменьшение частоты дыхания. Не обнаружено статистически значимых различий в параметрах импеданса регионов головы и туловища при ДОДвд по сравнению с периодом свободного дыхания. Однако наблюдали существенное увеличение вариабельности показателей биоимпедансометрии при ДОДвд несмотря на то, что в большинстве наблюдений сдвиги средних величин импеданса в области головы колебались в относительно узком диапазоне. Дальнейшее проведение эксперимента и накопление большего количества наблюдений позволит дать принципиальную оценку эффективности применения маски УДОД с целью снижения кровенаполнения головы в условиях невесомости.

Ключевые слова: космический полет, микрогравитация, внешнее дыхание, отрицательное давление на вдо-

хе, биоимпедансный анализ, перераспределение жидкостей в организме.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 19–25.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-19-25

Функция внешнего дыхания космонавтов во время космических полетов (КП) различной продолжительности неоднократно исследовалась, начиная с первых полетов человека в космос. Были получены различные данные, которые в той или иной степени показывали изменения параметров внешнего дыхания, происходившие под воздействием главного фактора КП – невесомости. В ряде исследований показано, что во время КП у космонавтов наблюдается относительное снижение статических и динамических объемов легких, объемно-скоростных показателей форсированного выдоха, в частности, снижение жизненной емкости легких (ЖЕЛ), резервного объема вдоха при повышении резервного объема выдоха [1–4], тогда как в других исследованиях отмечали неизменность ЖЕЛ даже во время длительных полетов [5]. Таким образом, нельзя сделать однозначный вывод об изменениях функции внешнего дыхания во время КП, и этот вопрос остается актуальным, в особенности для будущих межпланетных КП.

Применение устройства для дыхания под отрицательным (по отношению к давлению в окружающем пространстве) давлением (ДОД) рассматривается в качестве средства профилактики кровенаполнения головы в условиях невесомости. В 1990-х гг. впервые был предложен метод коррекции гемодинамических расстройств в КП, основанный не на депонировании объемов циркулирующей крови в нижних конечностях, а на увеличении оттока жидкости от головы за счет снижения внутригрудного давления [6–8]. Сравнительная оценка некоторых методов для профилактики ортостатических расстройств при моделировании заключительного этапа КП показала выраженное уменьшение ортостатических негативных реакций и отсутствие синкопальных

эпизодов в результате тренировочного применения метода совместного использования пневмовакуумного костюма «Чибис» и ДОД [9]. Следует отметить, что в вышеприведенных исследованиях вследствие ДОД отрицательное внутриротовое давление поддерживалось в течение всего дыхательного цикла. Однако ограничения, связанные с использованием костюма «Чибис» в комбинации с ДОД в космических кораблях малого объема, требуют поиска других способов снижения внутригрудного давления у космонавтов. В связи с этим было предложено использовать отрицательное давление только в течение цикла вдоха (ДОДвд). По данным американских исследователей применение устройства для ДОДвд (на уровне разрежения в подмасочном пространстве -6 и -7 см вод. ст.) сопровождалось положительным гемодинамическим эффектом без изменений минутной вентиляции легких при коррекции моделированного сниженного венозного возврата [10–12]. Именно такой механизм использования устройства с ДОДвд был предложен авторами в качестве средства увеличения венозного возврата с лечебной целью в случаях ортостатического коллапса и при кровопотерях.

При использовании ДОДвд на уровне -20 см вод. ст. у здоровых обследуемых по полученным нами ранее данным в условиях антиортостатической гипокинезии наблюдается уменьшение количества внеклеточной жидкости головы при увеличении ее количества в туловище [13].

Целью нашего исследования являлось изучение влияния ДОДвд во время КП на паттерн дыхания и распределение жидкости по регионам тела космонавта. Поскольку исследование функционального состояния внешнего дыхания у космонавтов во время КП фактически является частью медицинского контроля на борту Международной космической станции (МКС), одной из задач эксперимента являлись измерение и оценка дыхательных объемов и скоростных характеристик дыхательных потоков во время выполнения тестов при спокойном и форсированном дыхании в условиях длительного воздействия микрогравитации.

Методика

Изучение влияния ДОДвд на паттерн дыхания и распределение жидкости по регионам в условиях КП проводили у 8 российских космонавтов в рамках космического эксперимента «УДОД» (научный руководитель – академик РАН, проф. В.М. Баранов). Программа эксперимента была одобрена Комиссией по биомедицинской этике, все обследуемые космонавты подписали Информированное согласие на участие в исследовании.

Название эксперимента обусловлено изучением применения устройства для дыхания под

отрицательным давлением (УДОД) (производства ОАО НПП «Звезда» Россия), которое представляет собой маску с подпружинным клапаном вдоха, обеспечивающего в течение всей продолжительности вдоха заданное отрицательное давление в ротовой полости на уровнях -5/-10/-15 и -20 см вод. ст. Уровень давления в подмасочном пространстве определялся для каждого космонавта индивидуально по переносимости инспираторного сопротивления в наземных условиях до начала КП. Как правило, большинство обследованных космонавтов уверенно справлялись с нагрузкой на вдохе на уровне -20 см вод. ст. как в наземных условиях, так и в условиях микрогравитации.

Для решения одной из задач исследования (оценки состояния дыхательной системы космонавта в длительном КП) при каждом исследовании предварительно до начала использования маски УДОД проводили оценку функции внешнего дыхания с использованием комплекса «Дыхание-1» (СКТБ «Биофизприбор», Россия) с регистрацией следующих параметров: частоты дыхательных движений (ЧД) и дыхательного объема (ДО) при спонтанном дыхании, минутного объема дыхания (МОД), ЖЕЛ, резервных объемов вдоха и выдоха (РОВд и РОВыд) и объемно-скоростных показателей форсированного выдоха (форсированной жизненной емкости (ФЖЕЛ), объема форсированного выдоха за 1-ю сек (ОФВ1), пиковой объемной скорости и т.д.), а также длительности максимальной волевой задержки дыхания на глубоком вдохе и глубоком выдохе. Комплекс аппаратуры «Дыхание-1» включает комбинированный блок формирования сигналов, торакальный и абдоминальный пояса с встроенными датчиками, калибратор, мундштук, одноразовые загубники, зажим на нос. Калибровку потока осуществляли с помощью шприца объемом 1 л, входящего в комплект.

По циклограмме эксперимента длительность дыхания через маску УДОД составляла 20 мин, в течение этого воздействия регистрировали параметры дыхания и распределение жидких сред организма. Для регистрации колебаний подмасочного (равного внутриротовому) давления и частоты дыхательных движений при использовании УДОД применяли аппаратуру «Дыхание-1». Для получения сведений о распределении жидкости по секторам и ее сдвигах при дыхании через маску УДОД использовали портативный биоимпедансометр «Спрут-2» [14], который с помощью 5 пар ЭКГ-электродов обеспечивал регистрацию импеданса отдельных регионов тела (руки, ноги, абдоминальная и торакальная части туловища, голова и шея). Электроды накладывали на лоб, внутренние и наружные поверхности предплечья и голени. Измерение электрической проводимости тканей тела методом импедансометрии проводили в течение 5 мин при спонтанном дыхании

(до одевания маски) и в течение всего периода дыхания через УДОД (осуществляли 4 последовательные записи импедансограммы длительностью по 5 мин каждая).

В пред- и послеполетном периодах исследования проводили в положении обследуемого сидя, в условиях КП – в состоянии относительного покоя не ранее чем через 1,5–2 ч после приема пищи до выполнения физических нагрузок. Циклограмма эксперимента включала проведение 2–3 сессий исследования до начала полета (одновременно космонавт обучался самостоятельному проведению эксперимента), 3 сессий во время КП (у 7 космонавтов) и 2 сессий после возвращения на Землю. По циклограмме у 6 космонавтов 1-я сессия исследования во время КП проводилась в период с 23-х по 35-е сутки, 2-я – с 80-х по 100-е сутки, 3-я – со 135-х по 157-е сутки. У 1 космонавта при длительности КП 115 сут: на 21, 55 и 98-е сутки соответственно. У члена экипажа «годовой» (340 сут) экспедиции в течение КП было проведено 6 сессий эксперимента: на 32, 97, 155, 209, 270 и 328-е сутки полета.

Полученные значения измеренных параметров дыхания (объемы и скорости дыхательных потоков, величины импеданса) обрабатывали автоматически с использованием специальных программ. Значения ЖЕЛ, ФЖЕЛ и показателей форсированного выдоха приводили к стандартным условиям BTPS и сравнивали с индивидуальными должными величинами, после чего определяли процент от должной с использованием формул, принятых в клинической практике [15]. Для автоматического расчета жидкостных объемов на основе измеренных величин импеданса регионов в программу обработки дополнительно вводили антропометрические параметры обследуемого космонавта (масса, рост, окружности и длины отдельных сегментов тела).

Статистическую обработку данных проводили с применением метода главных компонент и дисперсионного анализа в программе Statistica 8.0.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных у 8 космонавтов данных в ходе проведения исследований функции внешнего дыхания до, во время КП и после приземления показал отсутствие достоверных различий в объемно-скоростных параметрах внешнего дыхания. Однако следует отметить, что у некоторых космонавтов отмечали относительное снижение параметров форсированного выдоха во время КП и после приземления, при этом, большинство из них были индивидуальными по степени выраженности для каждого обследованного. Также наблюдали тенденцию к снижению ЖЕЛ во время КП, но она не выходила за пределы физиологической нормы здорового человека. Аналогичные данные были получены

в более ранних исследованиях функции внешнего дыхания [1]. Величины ЖЕЛ, выраженные в процентах от индивидуальных должных значений, зарегистрированные на 28–35-е сутки на борту МКС у обследованных космонавтов, снижались в среднем по группе на 5–6 % по сравнению с предполетным уровнем. У 2 космонавтов 1-я сессия исследований во время КП проведена на 21–23-е сутки полета. Следует отметить, что у 1 из них ЖЕЛ снижалась на 5 % как и у 6 других космонавтов, а у 2-го – на 12 %, хотя и оставалась в пределах физиологической нормы, что свидетельствует об индивидуальных механизмах адаптации к воздействию факторов КП. Исследования, проведенные американскими учеными во время полетов «Скайлэб» выявили снижение ЖЕЛ примерно на 10 % у 4 обследованных [16]. Последующие исследования во время полетов «Спейслэб» не выявили никаких изменений в ЖЕЛ [17] (что, вероятнее всего, обусловлено особенностями атмосферы), хотя другие исследования демонстрировали незначительное снижение (примерно на 8 %) [4]. Анализ показателей паттерна спонтанного дыхания не выявил существенных изменений в уровнях МОД во время исследований на борту МКС, вместе с тем, в некоторых исследованиях наблюдали небольшое снижение этого параметра за счет урежения дыхания [1]. В данной работе установлено, что во время полета у 3 космонавтов возрастает $PO_{вд}$ и уменьшается $PO_{выд}$, что связано, по всей видимости, с изменением конфигурации грудной клетки в условиях микрогравитации: грудная клетка находилась в состоянии некоторого вдоха. У 2 космонавтов было отмечено снижение $PO_{выд}$ за счет небольших увеличений DO и $PO_{вд}$, а у 1 космонавта наблюдали значительное снижение ЖЕЛ за счет $PO_{вд}$, тогда как у другого космонавта изменения отсутствовали. Исследования некоторых ученых говорят об отсутствии изменений в $PO_{выд}$ во время полета по сравнению с предполетными данными [5]. Значение ФЖЕЛ во время КП у всех 8 обследованных космонавтов оставалось в пределах физиологической нормы. Однако у части космонавтов во время КП было выявлено относительное снижение других объемно-скоростных показателей. Некоторые данные литературы также подтверждают отсутствие изменений во ФЖЕЛ во время КП [5]. Анализ ЧД показал тенденцию к урежению дыхания у большинства космонавтов во время КП по сравнению с предполетными данными. Следует обратить внимание на то, что при предполетных сессиях исследования у обследованных космонавтов значения ЖЕЛ выше на 10 %, ФЖЕЛ – на 9 % и OFV_1 – на 4 % по сравнению со среднестатистическими величинами здорового человека.

Исследования задержки дыхания у 7 космонавтов на вдохе и выдохе показали ожидаемое [3] и достоверное ($p < 0,01$ и $p = 0,012$ соответственно)

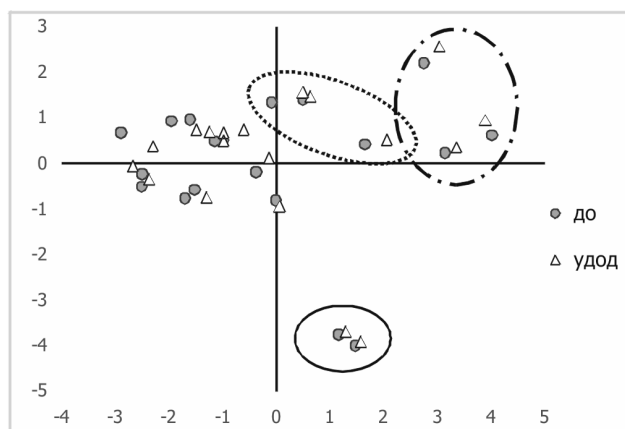


Рис. 1. Распределение дисперсий величин импеданса R5 по осям главных компонент.

Окружностями выделены зоны дисперсий измеренных величин у 3 космонавтов, «отделившихся» от основной группы (при этом окружность со сплошной линией отражает дисперсии величин космонавта, полученные на 270-е и 328-е сутки КП)

увеличение времени задержки дыхания во время КП по сравнению с фоновыми значениями в среднем по группе на 33,2 с (на 41,1 %) на вдохе и на 8 с (24,3 %) на выдохе. После окончания полета длительность задержки дыхания возвращалась к исходному уровню.

Применение для дыхания маски УДОД (при уровне дополнительного сопротивления на вдохе -20 см вод. ст.) показало достоверное снижение ЧД (в среднем по группе у обследованных космонавтов) с 8,9 до 7,2 циклов/мин ($p > 0,05$). При этом у некоторых космонавтов при сопротивлении -20 см вод. ст. ЧД снижалась менее выражено относительно других обследованных при дыхании с сопротивлением -15 и -10 см вод. ст., что также свидетельствует об индивидуальных особенностях адаптации организма. У 1 космонавта при дыхании с сопротивлением на вдохе -20 см вод. ст. ЧД даже возросла.

При анализе данных в качестве биоимпедансных показателей предполагаемого перераспределения жидкости (признаков оттока крови от головы) при дыхании через УДОД были выбраны величины активного сопротивления при токе на частотах 5 и 50 кГц (R5 и R50 соответственно) по отдельным регионам. Активное сопротивление на низкой частоте (5 кГц) обусловлено электрической проводимостью внеклеточной жидкости, в то время как на частоте 50 кГц переменный электрический ток проходит сквозь мембраны клеток, а измеряемое активное сопротивление обусловлено как внеклеточной, так и внутриклеточной жидкостью [18]. В анализ включены величины, зарегистрированные в течение свободного дыхания и в период 10–15 мин

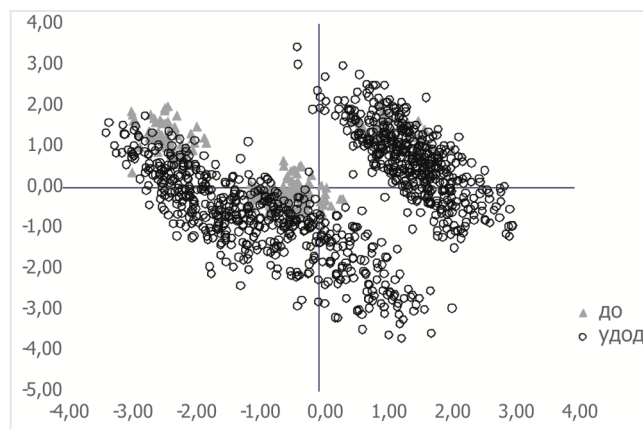


Рис. 2. Распределение дисперсий величин импеданса R5 и R50 (по регионам «голова», «туловище») по осям главных компонент у 1 из обследуемых космонавтов

дыхания через маску УДОД (к 5–10-й минуте непрерывного дыхания с сопротивлением, как правило, космонавт адаптируется к дыханию через маску и измеряемые параметры характеризуются достаточной стабильностью).

При использовании метода главных компонент [19] для оценки параметров импеданса по отдельным регионам на низких частотах (R5) установлено, что во время дыхания через УДОД величины сопротивления R5 сохраняются в области фоновых значений, т.е. в том же индивидуальном «поле» для каждого обследуемого (рис. 1). При этом можно отметить индивидуальные отличия дисперсий параметров R5 у отдельных космонавтов даже в условиях покоя без инспираторной нагрузки (выделено на рисунке окружностями). Применение дисперсионного анализа не выявило статистически значимых различий средних значений R5 по всем регионам при дыхании с дополнительным сопротивлением по сравнению с периодом свободного дыхания. Однако с использованием критерия Левена (оценки однородности дисперсий) установлен значимый прирост дисперсии параметров сопротивления области головы и туловища (как на частотах 5, так и 50 кГц) при дыхании через маску УДОД по сравнению со свободным дыханием в покое ($p < 0,05$). Характерное распределение дисперсий до и во время использования УДОД представлено в качестве примера у 1 из космонавтов на рис. 2. Аналогичное увеличение variability величин сопротивления области головы и туловища (измеренного на частоте 20 кГц), отражающее колебания внутригрудного давления в течение дыхательного цикла, ранее было отмечено нами при применении УДОД у здоровых добровольцев в условиях антиортостатической гипокинезии [13].

Оценка изменений объема внеклеточной жидкости (ВКЖ) области головы (выраженных в процентах

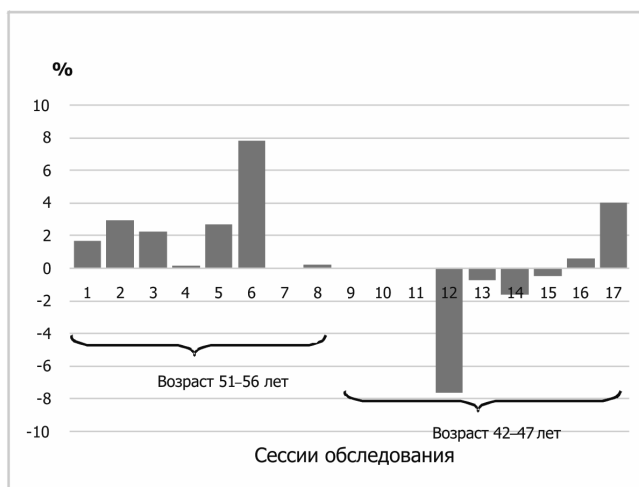


Рис. 3. Относительные изменения средних объемов ВКЖ головы при дыхании через маску УДОД (в % к фоновому уровню) в условиях КП.

Обозначение сессий обследования по группе обследуемых космонавтов представлено в сквозном порядке

к величинам при спокойном, свободном дыхании) показала разнонаправленную динамику, связанную с возрастом обследованных (рис. 3). Установлено, что колебания содержания ВКЖ в данном регионе при применении инспираторной нагрузки не превышали 8 %, при этом у более возрастных космонавтов динамика сдвига этого параметра была в сторону увеличения, у остальных в большинстве наблюдений – объем ВКЖ практически не изменялся, у 1 из космонавтов при выполнении одного из сеансов дыхания объем ВКЖ уменьшился на 7,6 %. Вместе с тем такое снижение данного показателя может оказать существенное влияние на внутричерепное давление, являющееся основным патогенетическим фактором, обуславливающим клинические проявления перераспределения крови в условиях микрогравитации и измерение которого позволит, в перспективе, уточнить эффективность применения маски УДОД.

Характер разнонаправленной динамики объема ВКЖ в области головы и шеи может быть обусловлен индивидуальной перестройкой паттерна дыхания (при проведении некоторых сеансов на борту МКС незначительное увеличение объема ВКЖ головы наблюдалось при тенденции к гипервентиляции во время применения маски). С другой стороны, отсутствие выраженного оттока жидкости от головы при использовании дыхания с дополнительным сопротивлением на вдохе может быть связано с небольшим перераспределением жидкости в краиниальном направлении и с исходным преимущественным перераспределением крови из области ног в область живота [20]. Для уточнения направленности и выраженности возможных изменений

относительно перераспределения крови при использовании дыхания с сопротивлением в настоящее время продолжается накопление данных для последующего анализа большей по размеру выборки обследуемых.

Выводы

1. Во время КП под воздействием микрогравитации наблюдаются тенденции к снижению легочных объемов и емкостей, а также изменения паттерна дыхания и его регуляции. Полученные данные демонстрируют выраженную индивидуальную направленность, что свидетельствует о необходимости дальнейшего исследования функции внешнего дыхания в условиях длительных КП.

2. По предварительным результатам ДОДв при разнице давлений -20 см вод. ст. в условиях микрогравитации сопровождается незначительными сдвигами средних уровней импеданса и соответственно объема внеклеточной жидкости области головы с выраженными индивидуальными различиями.

3. Применение маски УДОД вызывает значимое возрастание колебаний величин импеданса головы и туловища, что отражается в увеличении дисперсий этих параметров, обусловленных перепадами внутригрудного давления в фазы вдоха и выдоха.

Авторы выражают благодарность космонавтам, принимавшим участие в исследовании, а также сотрудникам ПАО «РКК «Энергия» им. С.П. Королева», Центра управления полетами ФГУП ЦНИИМаш, ФГБУ «НИИ ЦПК им. Ю.А. Гагарина» и коллегам из ГНЦ РФ – ИМБП РАН В.С. Седлецкому, В.И. Колесникову и к.м.н. Д.Р. Хуснутдиновой за техническую поддержку.

Работа выполнена в рамках плана фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН при поддержке контракта с Федеральным государственным унитарным предприятием «Центральный научно-исследовательский институт машиностроения» (ФГУП ЦНИИМаш) по теме ОКР «МКС (Наука)».

Список литературы

1. Баранов В.М. Газоэнергообмен человека в космическом полете и модельных исследованиях // Проблемы космической биологии. Т. 75. М., 1993.

Baranov V.M. Human gas and energy exchange in space flight and simulation research // Problemy kosmicheskoy biologii. V. 75. Moscow, 1993.

2. Баранов В.М., Котов А.Н., Тихонов М.А. Исследования вентиляторной функции легких и биомеханики дыхания в длительных космических полетах //

Орбитальная станция «Мир». Т. 2. Медико-биологические эксперименты. М., 2002. С. 17–24.

Baranov V.M., Kotov A.N., Tikhonov M.A. Investigation of pulmonary ventilation and biomechanics of respiration in long-term space flights // Orbital station «Mir». V. 2. Medical and biological experiments. Moscow, 2002. P. 17–24.

3. Баранов В.М., Попова Ю.А., Суворов А.В. и др. Исследование регуляции и биомеханики дыхания в условиях космического полета // Космическая биология и медицина. Т. 2. Медико-биологические исследования на российском сегменте МКС. Воронеж, 2011. С. 72–92.

Baranov V.M., Popova Yu.A., Suvorov A.V. et al. The study of regulation and biomechanics of respiration in space flights // Space biology and medicine. V. 2. Medical and biological studies on Russian segment of ISS. Voronezh, 2011. P. 72–92.

4. Paiva M., Estenne M., Engel L.A. Lung volumes, chest wall configuration and pattern of breathing in microgravity // J. Appl. Physiol. (1985). 1989. V. 67. № 4. P. 1542–1550.

5. Prisk G.K., Fine J.M., Cooper T.K., West J.B. Vital capacity, respiratory muscle strength, and pulmonary gas exchange during long-duration exposure to microgravity // Appl. Physiol. (1985). 2006. V. 101. № 2. P. 439–447.

6. Тихонов М.А., Баранов В.М., Дегтярев В.А. и др. Способ коррекции кровонаполнения сосудистой системы головы в условиях невесомости. Авторское свидетельство № 1690673 от 15.11.1991.

Tikhonov M.A., Baranov V.M., Degtyarev V.A. et al. A method to correct blood filling of head vascular system in microgravity. USSR patent № 1690673 of 15.11.1991.

7. Тихонов М.А., Котов А.Н., Реушкин В.Н. и др. Респираторные и сердечно-сосудистые механизмы гипобарической коррекции антиортостатического перераспределения региональных объемов крови // Авиакосм. и экол. мед. 2003. Т. 37. № 2. С. 51–59.

Tikhonov M.A., Kotov A.N., Reushkin V.N. et al. Respiratory and cardiovascular mechanisms of hypobaric correction of the head-down redistribution of local blood volumes // Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina. 2003. V. 37. № 2. P. 51–59.

8. Донина Ж.А., Баранов В.М., Александрова Н.П., Ноздрачев А.Д. Дыхание и гемодинамика при моделировании физиологических эффектов невесомости. СПб., 2013.

Donina Zh.A., Baranov V.M., Aleksandrova N.P., Nozdrachev A.D. Respiration and hemodynamics under simulated microgravity. St. Petersburg, 2013.

9. Баранов В.М., Демин Е.П., Котов А.Н. и др. Сравнительная оценка эффективности некоторых методов профилактики ортостатических расстройств при моделировании заключительного этапа космического полета // Авиакосм. и экол. мед. 2003. Т. 37. № 4. С. 17–23.

Baranov V.M., Demin E.P., Kotov A.N. et al. Comparative evaluation of several methods preventing orthostatic disorders during simulation of the end of space-mission factors // Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina. 2003. V. 37. № 4. P. 17–23.

10. Convertino V.A., Ratliff D.A., Ryan K.L. et al. Hemodynamics associated with breathing through an inspiratory impedance threshold device in human volunteers // Crit. Care Med. 2004. V. 32. № 9. P. S381–S386.

11. Convertino V.A., Cooke W.H., Lurie K.G. Inspiratory resistance as a potential treatment for orthostatic intolerance and hemorrhagic shock // Aviat. Space Environ. Med. 2005. V. 76. № 4. P. 319–325.

12. Convertino V.A., Parquette B., Zeihr J. et al. Use of respiratory impedance in prehospital care of hypotensive patients associated with hemorrhage and trauma: a case series // J. Trauma Acute Care Surg. 2012. V. 73. P. S54–S59.

13. Семенов Ю.С., Дьяченко А.И., Попова Ю.А. и др. Реакция сердечно-сосудистой системы человека на дыхание с дополнительным отрицательным давлением во время вдоха в условиях 15-часовой антиортостатической гипокинезии // Авиакосм. и экол. мед. 2017. Т. 51. № 3. С. 22–30.

Semenov Yu.S., Dyachenko A.I., Popova Yu.A. et al. Reaction of the human cardiovascular system to respiration with additional negative pressure at breath during 15-hour head-down hypokinesia // Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina. 2017. V. 51. № 3. P. 22–30.

14. Носков В.Б., Николаев Д.В., Смирнов А.В. и др. Прибор для неинвазивного определения состава тела человека в условиях космического полета // Мед. техника. 2014. № 4. С. 40–43.

Noskov V.B., Nikolaev D.V., Smirnov A.V. et al. A device for noninvasive determination of human body composition under spaceflight conditions // Meditsinskaya tekhnika. 2014. № 4. P. 40–43.

15. Клемент Р.Ф., Лаврушин А.А., Котегов Ю.М. и др. Инструкция по применению формул и таблиц должных величин основных спирографических показателей. Л., 1986.

Klement R.F., Lavrushin A.A., Kotegov Yu.M. et al. Instructions for application of formulas and tables of expected spirometric values. Leningrad, 1986.

16. Sawin C.F., Nicogossian A.E., Rummel J.A. et al. Pulmonary function evaluation during the Skylab and Apollo-Soyuz missions // Aviat. Space Environ. Med. 1976. V. 47. № 2. P. 168–172.

17. Michels D.B., West J.B. Distribution of pulmonary ventilation and perfusion during short periods of weightlessness // J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol. 1978. V. 45. P. 987–998.

18. Николаев Д.В., Смирнов А.В., Бобринская И.Г., Руднев С.Г. Биоимпедансный анализ состава тела человека. М., 2009.

Nikolaev D.V., Smirnov A.V., Bobrinskaya I.G., Rudnev S.G. Bio-impedance analysis of human body composition. Moscow, 2009.

19. Носовский А.М., Соловьева З.О., Ильин В.К. Применение метода главных компонент для оценки однородности результатов исследований микрофлоры обследуемых в условиях «сухой» иммерсии // Биомед. радиоэлектроника. 2012. № 2. С. 42–47.

Nosovsky A.M., Solovieva Z.O., Ilyin V.K. Application of a principal component analysis for an estimation of uniformity of results of researches of microflora surveyed in conditions «dry» immersion // Biomeditsinskaya radioelektronika. 2012. № 2. P. 42–47.

20. Носков В.Б., Ничипорук И.А., Васильева Г.Ю., Смирнов Ю.И. Состав тела человека при длительном пребывании в невесомости // Авиакосм. и экол. мед. 2015. Т. 49. № 1. С. 19–25.

Noskov V.B., Nichiporuk I.A., Vasilieva G.Yu., Smirnov Yu.I. Human body composition during extended stay in microgravity // Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina. 2015. V. 49. № 1. P. 19–25.

Поступила 27.09.2017

THE LUNG FUNCTION AND FLUID DISTRIBUTION IN HUMANS UNDER NEGATIVE INSPIRATORY PRESSURE BREATHING IN SPACEFLIGHT

Popova Yu.A., Suvorov A.V., Zaripov R.N., Dyachenko A.I.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 19–25

The application of the negative pressure breathing (NPB) device is examined as preventive means for blood

redistribution in microgravity. The aim of our study is to investigate the effects of inspiratory NPB (NPBin) on breathing pattern and body fluid distribution in cosmonauts during spaceflight. In addition, before NPBin the detailed estimation of lung function (volumes and flows, breath-hold time) was carried out. The experiment was performed on 8 cosmonauts on the ground, during spaceflight and after landing. The special mask UDOD («Zvezda», Russia) was used for NPBin at inspiratory impedance at -20 cm H₂O for 20 min. Breathing rate, mask pressure fluctuations and impedance in head, body and limbs were measured before and during NPBin. The obtained data analysis showed that there were no significant differences in lung volumes and flows, the breath-hold time was expectedly increased in microgravity. However, some examined cosmonauts had a small decrease of forced expiration parameters and vital capacity on ISS board and after landing. The NPBin resulted in significant decrease of breathing rate. However, no statistically significant changes in body and head impedance compared with tidal breathing were observed. Nevertheless, the greatly increased variability of investigated impedance parameters was demonstrated during NPBin exposure, but the impedance shifts in head region were about narrow range in the most measurements. To date, the experiment continues to accumulate more observations for principled estimation of NPB mask as a countermeasure of blood shifts in spaceflight.

Key words: spaceflight, microgravity, lung ventilation, inspiratory negative pressure breathing, bioimpedance, fluid shifts.

УДК 577.2.04

КОСМИЧЕСКИЙ ЭКСПЕРИМЕНТ «ФЕНИКС»: ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИТОГИ

Алчинова И.Б.^{1,3}, Яковенко Е.Н.^{1,3}, Кушин В.В.², Иноземцев К.О.², Карганов М.Ю.^{1,3}, Баранов В.М.¹

¹Научно-исследовательский институт космической медицины ФНKC специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий, Федеральное медико-биологическое агентство России, Москва

²Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

³Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва

E-mail: alchinovairina@yandex.ru

Повреждение генетического аппарата клеток в условиях космического полета (КП) происходит главным образом в результате воздействия излучения. Целью космического эксперимента «Феникс» является изучение эффектов длительного космического полета на генетический аппарат и выживаемость лиофилизированных лимфоцитов человека и клеток костного мозга (ККМ) мыши. Биологические образцы были уложены в 12 пеналов «Биоэкология», которые распределили по 3 контейнерам. Каждый пенал был оснащен пассивным дозиметром космического излучения. Контейнеры были доставлены на Международную космическую станцию (МКС) в ноябре 2014 г. и установлены в модулях «Пирс», «Поиск» и «Звезда». Ампулы с образцами наземного контроля и фоновые дозиметры остались в лаборатории. Три пенала (по одному из каждого модуля) были возвращены на Землю через 7 мес, остальные возвращали каждые 6 мес. Соотношение доз в модулях «Звезда», «Поиск» и «Пирс» составило 1 : 2 : 3 соответственно. Предварительный анализ привел к предположению, что влияние вторичных частиц на биологические структуры сопоставимо с эффектами космического излучения. Различия в биологических эффектах коррелировали с величинами доз (в зависимости от отсека МКС). Во всех случаях пики для образцов из модуля «Пирс» сдвигаются вправо по отношению к образцам из модулей «Звезда» и «Поиск». Это свидетельствует о формировании более мелких фрагментов ДНК. Двойное окрашивание после регидратации с использованием люминесцентных красителей бромистого этидия (некроз) и акридинового оранжевого (визуализация живых клеток и, в частности, окрашивание апоптотных клеток) выявило клетки в разных физиологических состояниях.

Ключевые слова: космическое излучение, разрыв ДНК, космические модули, пассивный дозиметр.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 26–30.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-26-30

Общепринято считать, что повреждение генетического аппарата клеток в условиях космического полета (КП) происходит главным образом в

результате воздействия космического излучения смешанного состава. Непрямые эффекты радиационного воздействия в водно-эквивалентных средах составляют до 80–90 % от общего количества повреждений в клетках эукариот и прокариот. Эти эффекты обуславливают инактивацию и гибель клеток.

Целью эксперимента «Феникс» является изучение эффектов длительного КП на генетический аппарат и выживаемость лиофилизированных лимфоцитов человека и клеток костного мозга (ККМ) мыши. Эксперимент проводился на борту Российского сегмента Международной космической станции (МКС).

Методика

Герметично запечатанные ампулы с лимфоцитами человека и ККМ мыши были уложены в 12 пеналов «Биоэкология», которые распределили по 3 контейнерам. Каждый пенал был оснащен датчиком температур и пассивным дозиметром космического излучения.

Контейнеры были доставлены на МКС в ноябре 2014 г. и установлены в модулях «Пирс», «Поиск» и «Звезда» на панелях № 436, 103 и 103 соответственно. Ампулы с образцами наземного контроля и фоновые дозиметры остались в лаборатории. Три пенала (по одному из каждого модуля) были возвращены на Землю после 199-суточного облучения.

Методы подготовки и анализа лимфоцитов человека и ККМ мыши. Лимфоциты выделяли из цельной крови здоровых доноров центрифугированием в градиенте плотности. Клетки костного мозга мыши были выделены в соответствии с модифицированным методом [1]. Концентрацию клеток доводили до 1×10^6 в 100 мкл, этот объем суспензии был помещен в ампулы и лиофилизирован [2, 3]. На всех этапах жизнеспособность клеток оценивали помощью красителя трипанового синего.

Выделение ДНК. Леофилизированные клетки были регидратированы в 150 мкл фосфатно-солевого буферного раствора. Для разрушения клеточной

мембраны к пробам добавляли сахарозный буфер. Образцы инкубировали в течение 10 мин и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин (центрифуга Eppendorf 5702R, Германия). Супернатант сливали и осадок ресуспендировали в 400 мкл буфера для протеиназы К, добавляли 20 мкл 10 % SDS. После 5 мин инкубации добавляли 5 мкл маточного раствора протеиназы К с концентрацией 20 мг/мл (конечная концентрация – 250 мкг/мл). Инкубировали с протеиназой К в течение ночи при 37 °С. По окончании инкубации добавляли 400 мкл забуференного фенола и выделяли согласно общепринятой методике [4]. Осадок высушивали при комнатной температуре до исчезновения запаха спирта и растворяли ДНК в ТЕ-буфере (в течение ночи). Концентрацию и чистоту выделенной ДНК оценивали при измерении оптической плотности (ОП) полученного раствора. На спектрофотометре Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, США) измеряли поглощение образца при 260 нм по сравнению с поглощением ТЕ-буфера. Пробы выравнивали по количеству содержащейся ДНК.

Электрофорез ДНК в 1%-ном агарозном геле. Электрофорез в 1%-ном агарозном геле проводили с целью выявления и разделения фрагментов ДНК [4]. При разделении в геле прямо отслеживалось положение ДНК, так как полосы ДНК в геле окрасили флуоресцирующим и интеркалирующим в ДНК красителем – бромистым этидием в низкой концентрации. В лунки под слой буфера внесли смесь, состоящую из 1,0 мкл 0,25%-ного раствора красителя бромфенолового синего (БФС) на 50%-ном глицерине и 5,0 мкл пробы. Электрофорез проводили в течение 20 мин, ток 35 мА. Результаты процесса разделения при электрофорезе наблюдали с помощью трансиллюминатора (Biogene, Россия).

После возвращения на Землю клетки анализировали с использованием различных красителей: бромистого этидия (некроз) и акридинового оранжевого (визуализация живых клеток и, в частности, окрашивание апоптозных клеток), трипанового синего (живые клетки), Hoechst (форма ядра и наличие бактериальной флоры), окраски по Романовскому – Гимзе (структура клеток, ядра).

Дозиметрия космического излучения. Пассивные дозиметры, состоящие из твердотельного трекового детектора (ТТД) CR-39™ Tastrak (TASL Ltd., Бристоль, Великобритания) и термолюминесцентного детектора (ТЛД) LiF:Mg,Ti (93 % ⁷Li и 7 % ⁶Li)

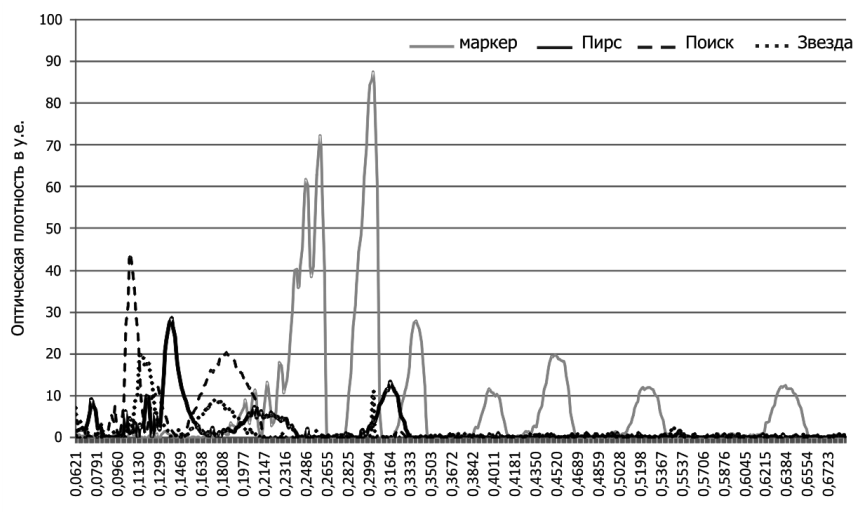


Рисунок. Данные денситометрии электрофорез ДНК из ККМ мыши.

По оси абсцисс – пройденная дистанция, по оси ординат – оптическая плотность

типа ДТГ-4 (Росатом, Россия), применялись в эксперименте для измерений спектров линейной передачи энергии (ЛПЭ) и доз [5].

Обработка ТТД и анализ треков. Пластины Tastrak травилась в 6 N растворе NaOH при 70 °С в течение 6 ч. Линейная скорость травления (V_b) при данных условиях составила $1,35 \pm 0,06$ мкм·ч⁻¹ [6]. Это значение хорошо согласуется с результатом, описанным в работе [8]. После химического травления детекторы сканировали вручную в 2-D и 3-D [6] на оптическом микроскопе Carl Zeiss® AxioScope.A1, оснащенном цифровой фотокамерой. Различные геометрические параметры были измерены, и для каждого отдельного трека была рассчитана чувствительность детектора: $V = V_t / V_b$, где V_t – скорость травления в треке.

Треки длиннопробежных частиц с углами падения, близкими к 90°, были обработаны в соответствии с так называемым классическим методом. В данном случае диаметры входной части трека и значение толщины стравленного слоя используются для нахождения чувствительности V . Чувствительности V были пересчитаны в ЛПЭ с применением калибровочной функции [7]. Нижний порог регистрации по ЛПЭ для детектора составил ~7,5 кэВ/мкм (H₂O).

Косые треки были обработаны в соответствии с процедурой, впервые описанной в работе [8]. Диаметры входного эллипса трека и его полная проекция, равно как и радиус закругления на конце (для перетравленных треков) были использованы для вычислений чувствительности V . Затем калибровочная функция [6] использовалась для расчета соответствующих значений ЛПЭ.

Таблица

Дозы космического излучения, измеренные в пенах «Биоэкология»

Детекторы		Отсек МКС		
		«Пирс»	«Поиск»	«Звезда»
ТЛД	D ^a , мкГр/сут	693 ± 70	492 ± 40	271 ± 15
ТТД	D ^b , мкГр/сут	115 ± 2 ^e	30 ± 2 ^e	39 ± 2 ^e
	H ^b , мкЗв/сут	988 ± 36 ^e	399 ± 28 ^e	456 ± 33 ^e
	Q ^b	8,6 ± 0,4	13,2 ± 1,2	11,8 ± 1,1
	D ^c , мкГр/сут	24 ± 2	10 ± 2	16 ± 2
	H ^c , мкЗв/сут	365 ± 31	171 ± 25	257 ± 30
Комбинация	D ^d , мкГр/сут	729 ± 70 ^e	505 ± 40 ^e	287 ± 15 ^e
	H ^d , мкЗв/сут	1602 ± 79 ^e	874 ± 49 ^e	705 ± 36 ^e
	Q ^d	2,20 ± 0,24	1,73 ± 0,17	2,45 ± 0,18

Примечание. ^a – поглощенная доза, измеренная с помощью ТЛД (не корректирована); ^b – дозовые величины ТТД в области ЛПЭ > 10 кэВ/мкм (H₂O); ^c – дозовые величины, приписанные ядерным фрагментам в области ЛПЭ > 10 кэВ/мкм (H₂O); ^d – суммарные значения доз, полученные объединением данных ТЛД и ТТД по методу [16]. В расчетах использовалась функция Q (ЛПЭ), регламентированная МКРЗ в публикации № 60; ^e – сумма первичных и вторичных.

Треки длиннопробежных частиц рассматривались как первичные. Треки, наблюдавшиеся в реакциях ядерной фрагментации, и одиночные треки короткопробежных частиц были отнесены к группе короткопробежных вторичных частиц.

Полученные суммарные спектры ЛПЭ включают в себя первичные и вторичные события. Обработка трековой информации, построение спектров ЛПЭ и вычисление мощностей доз выполнялись в программе, разработанной в среде MatLab®. Спектры ЛПЭ для вторичных частиц и соответствующие им дозовые величины рассчитывались отдельно.

Отжиг ТЛД. Измерения термолюминесцентных сигналов проводились на ТЛД-считывателе HARSHAW-3500. Последующий анализ данных ТЛД выполнялся в программе Windows Radiation Evaluation and Management System. При отжиге ТЛД использовались следующие параметры [9]: предварительный нагрев при +50 °С; диапазон нагревания детектора +50 ... +300 °С; скорость нагрева детектора 4 °С/с; полное время отжига 63 с; диапазон для интегрирования +150 ... +250 °С.

Результаты и обсуждение

Выживаемость клеток и повреждение ДНК. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью теста изоляции трипановым синим. Морфология лимфоцитов человека и ККМ мыши была проанализирована после окрашивания по Романовскому – Гимзе. МТТ-тест показал наличие митохондриальной активности клеток после проведения регидратации [10].

ДНК выделяли из клеток и анализировали с помощью электрофореза с последующей денситометрией [11]. Четыре зоны (см. рисунок) отражали

наиболее выраженные различия между биологическими образцами из разных пеналов. В материале из модулей «Поиск» и «Пирс» пики плотности соответствовали значениям 1500–2000 bp маркера ДНК (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). В образцах из модулей «Звезда» и «Поиск» были зафиксированы пики в 15 000 bp. Во всех случаях пики для образцов из модуля «Пирс» сдвигались вправо по отношению к образцам из модулей «Звезда» и «Поиск». Это свидетельствует о формировании более мелких фрагментов ДНК. Аналогичные результаты были получены и для лимфоцитов человека.

Двойное окрашивание с использованием люминесцентных красителей бромистого этидия (некроз) и акридинового оранжевого (визуализация живых клеток и, в частности, окрашивание апоптозных клеток) выявило клетки в разных физиологических состояниях. Стандартные методы для оценки целостности ядер не выявили никаких видимых повреждений.

Дозиметрия. Относительно высокий поток частиц с ЛПЭ < 100 кэВ/мкм (H₂O) наблюдается в модуле «Пирс» предположительно из-за более тонкой защиты отсека. Измеренный поток вторичных частиц превышает поток первичного компонента в области ЛПЭ > 100 кэВ/мкм во всех 3 модулях МКС. Измеренный поток вторичных частиц на 1–2 порядка больше, чем поток длиннопробежных частиц с ЛПЭ 100–600 кэВ/мкм. Экспериментальные результаты хорошо согласуются с данными литературы [12–16].

Мощности доз, измеренные с помощью пассивных детекторов, приведены в таблице.

Вклад ядерных фрагментов (D^c и H^c) в суммарные поглощенную D^d и эквивалентную H^d дозы

изменяется в пределах 2,0–5,6 % и 19,6–36,5 % соответственно, что хорошо согласуется с результатами, полученными ранее [14].

Наблюдаемый эффект фрагментации ДНК зависит от мощности дозы в отсеке. Более мелкие фрагменты ДНК были образованы в модуле «Пирс» из-за высоких доз облучения от всех компонентов космического излучения. И наоборот, фрагменты большего размера были образованы в модулях «Поиск» и «Звезда» из-за сравнительно невысоких мощностей доз.

Выводы

1. Предварительные результаты КЭ «Феникс» показывают хорошую выживаемость ядер лимфоцитов человека и клеток костного мозга мышей после 199-суточного КП, когда поглощенные и эквивалентные дозы изменялись в диапазонах 57–145 МГр и 140–319 мЗв соответственно.

2. Степень фрагментации ДНК зависела от дозы. Более мелкие фрагменты ДНК были обнаружены в образцах, облученных на модуле «Пирс», где мощности доз были максимальными.

Авторы выражают благодарность Ресурсному центру Курчатовского комплекса НБИКС-технологий, НИЦ «Курчатовский институт» за подготовку гелей и обработку изображений. Авторы благодарны доктору Дж.К. Палфалви (МТА ЕК, Будапешт, Венгрия) за полезные обсуждения.

Часть данной работы была выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности НИЯУ «МИФИ» (договор № 02.а03.21.0005).

Дозиметрическое сопровождение космического эксперимента «Феникс» обеспечивалось в рамках договора о НТС № 3–16 между НИЯУ «МИФИ» и НИИ космической медицины.

Список литературы

1. STEMCELL Technologies Inc., Video Tutorial Isolating of MSCs from Mouse Compact Bone, access: https://www.youtube.com/watch?v=Dnvq_wM22fI.
2. Loi P. et al. Freeze-dried somatic cells direct embryonic development after nuclear transfer // PLoS One. 2008. V. 3. № 8. P. e2978.
3. Natan D., Nagler A., Arav A. Freeze-drying of mononuclear cells derived from umbilical cord blood followed by colony formation // Ibid. 2009. V. 4. № 4. P. e5240.
4. Sambrook J. et al. Molecular cloning: a laboratory manual. 1989. Ed. 2.
5. Benton E.R., Benton E.V., Frank A.L. Passive dosimetry aboard the «Mir» Orbital Station: internal measurements // Rad. Measurements. 2002. V. 35. № 5. P. 439–455.

6. Inozemtsev K.O., Kushin V.V. Comparative analysis of CR-39 sensitivity for different sets of measurable track parameters // Ibid. 2016. V. 91. P. 44–49.

7. Szabó J., Pálfalvi J.K. Calibration of solid state nuclear track detectors at high energy ion beams for cosmic radiation measurements: HAMLET results // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. 2012. V. 694. P. 193–198.

8. Henke R.P., Benton E.V. On geometry of tracks in dielectric nuclear track detectors // Nuclear Instruments and Methods. 1971. V. 97. № 3. P. 483–489.

9. Иноземцев К.О. и др. Измерение доз и спектров линейной передачи энергии космического излучения внутри биологического спутника «Биюн-М1» // Авиакосм. и экол. мед. 2015. Т. 49. № 2. С. 16–22.

- Inozemtsev K.O. et al. Measurement of space radiation doses and linear energy transfer spectra inside biological satellite «Bion-M1» // Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina. 2015. V. 49. № 2. P. 16–22.

10. Медведева Ю.С., Яковенко Е.Н., Алчинова И.Б. Оценка радиационно-индуцированного апоптоза в клетках костного мозга и сдвигов в составе плазмы крови мышей после экспозиции на субмагнитосферной орбите (биоспутник «Биюн-М1») // Патогенез. 2016. Т. 14. № 2. С. 38–42.

- Medvedeva Yu.S., Yakovenko E.N., Alchinova I.B. Evaluation of radiation-induced apoptosis in bone marrow cells and shifts in the blood plasma of mice after exposure to a sub-magnetospheric orbit («Bion-M1» biosatellite) // Patogenez. 2016. V. 14. № 2. P. 38–42.

11. Freeman S.E., Thompson B.D. Evaluation of densitometry data using interactive computer graphics: application to DNA agarose gels // Inter. J. Bio-Med. Computing. 1988. V. 22. № 2. P. 121–133.

12. Benton E.R. et al. Secondary particle contribution to LET spectra on LDEF // Rad. Measurements. 1996. V. 26. № 6. P. 793–797.

13. Cucinotta F.A. et al. Effects of target fragmentation on evaluation of LET spectra from space radiations: Implications for space radiation protection studies // Ibid. P. 923–934.

14. Kushin V.V. Measurement of LET distribution and absorbed dose from secondary particles on board the spacecraft // Rad. Protection Dosimetry. 2010. V. 141. № 2. P. 199–204.

15. Kodaira S. et al. Analysis of radiation dose variations measured by passive dosimeters onboard the International Space Station during the solar quiet period (2007–2008) // Rad. Measurements. 2013. V. 49. P. 95–102.

16. Hajek M. et al. Convolution of TLD and SSNTD measurements during the BRADOS-1 experiment onboard ISS (2001) // Ibid. 2008. V. 43. № 7. P. 1231–1236.

Поступила 17.10.2017

THE «PHOENIX» SPACE EXPERIMENT: PRELIMINARY RESULTS

**Alchinova I.B., Yakovenko E.N., Kushin V.V.,
Inozemtsev K.O., Karganov M.Yu.,
Baranov V.M.**

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia).
2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 26–30

Damage of genetics apparatus of cells in space flight conditions is primarily due to radiation impact. Indirect effects of radiations (mediated by water) constitute 80–90 % of the total damaging in eukaryotes and prokaryotes, and largely determine cell inactivation. The aim of «Phoenix» experiment is to obtain new data on effects of long term space flight on the genetic apparatus and viability of dried human lymphocytes and mouse bone marrow cells (BMC). The cell concentration was adjusted to 1×10^6 per 100 μ l. This volume of the cell suspension was transferred into vials and lyophilized. Cell viability was evaluated by trypan blue exclusion test. The morphology of human lymphocytes and mouse BMC was analyzed after Romanowsky – Giemsa staining. MTT assay showed the presence of mitochondrial activity of cells after rehydration. Sealed vials with human lymphocytes and

mouse BMC were packed in 12 «Bio-ecology» boxes arranged at 3 containers. Each box was equipped with passive space radiation dosimeter. The containers were delivered to ISS in November 2014 and installed in «Pirs», «Poisk» and Service modules. Control vials with cells and travel background dosimeters were stored at the laboratory. Three boxes (one from each module) were returned to the Earth in 7 months. Others were retrieved every 6 months.

The ratio of doses in spacecraft compartments was 1 : 2 : 3 in Service, «Poisk» and «Pirs» modules relatively. The preliminary analysis of nuclear fragmentation events led to the conclusion, that impact of secondary particles on biological structures can be comparable with effects coursed by heavy nucleus of galactic cosmic rays. The difference in biological effects correlates with the dose values (depends on the ISS compartment). In all cases the peaks for samples from «Pirs» module were shifted to the right relative to the samples from Service and «Poisk» modules (that indicates the formation of smaller DNA fragments). Double staining with fluorescent dyes ethidium bromide (necrosis) and acridine orange (visualizing live cells and specifically staining apoptotic cells) revealed cells in different physiological states.

Key words: cosmic radiation, DNA breakage, space modules, passive dosimeter.

УДК 612.085.4

РОЛЬ ЗРИТЕЛЬНОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ В КОНТРОЛЕ ВЕРТИКАЛЬНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ЧЕЛОВЕКА ДО И ПОСЛЕ 5-СУТОЧНОЙ «СУХОЙ» ИММЕРСИИ

Амирова Л.Е., Шишкин Н.В., Китов В.В., Савеко А.А., Томиловская Е.С., Козловская И.Б.

Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

E-mail: lyubove.dmitrieva@gmail.com

Цель работы – исследование роли зрительной обратной связи при выполнении задач поддержания вертикальной стойки после пребывания в условиях, моделирующих физиологические эффекты невесомости.

В исследовании приняло участие 20 молодых мужчин-добровольцев. В качестве модели микрогравитации в работе использовали «сухую» иммерсию (СИ), воспроизводящую в полной мере свойственное невесомости устранение опорных и физических нагрузок. Стабилографические обследования проводили дважды до начала иммерсии, в первые 30 мин после завершения иммерсионного воздействия и на 2-е сутки периода восстановления.

Результаты исследования выявили сразу же после завершения СИ увеличение всех исследуемых стабилографических показателей при стойке с открытыми глазами – амплитуда колебаний тела во фронтальной и сагиттальной плоскостях увеличивалась на 30–35 %, средняя скорость перемещения центра давления возрастала на 10 %, на 50 % увеличивались значения площади эллипса. При выполнении вертикальной стойки без зрительной обратной связи после СИ наблюдались 2 разнонаправленных типа изменений позной устойчивости: у одних наблюдалось увеличение коэффициента Ромберга на 43 %, а у других напротив, наблюдалось снижение на 37 %. На 2-е сутки периода восстановления исследуемые значения возвращались к фоновому уровню.

Ключевые слова: «сухая» иммерсия, вертикальная устойчивость, стабилография, зрительная обратная связь.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 31–37.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-31-37

В гравитационном поле Земли тело человека никогда не находится в состоянии абсолютного покоя. В основе многокомпонентного постурального обеспечения лежит анализ центральной первичной интеграции большого количества сенсорной информации и управление множеством команд, каждая из которых направлена на решение своей подзадачи. При этом все сигналы сравниваются, суммируются и обрабатываются с учетом уже накопленного опыта

от различных сенсорных систем – вестибулярной, зрительной, проприоцептивной, что и позволяет поддерживать заданную позу – сохранять сложившиеся взаимные расположения сегментов тела и противостоять внешним возмущениям [1].

В невесомости гравитационный вектор исчезает, соответственно снимается задача удержания тела в вертикальной позиции. При переходе к невесомости у космонавтов формируется флексорная позы установка, обусловленная снижением тонуса мышц-экстензоров [2, 3], и подавлением их электромиографической активности, в то время как в фазы перегрузок электромиографическая активность повышается [4]. В условиях невесомости сформированный и закрепленный на Земле сенсорный комплекс, в котором каждая сенсорная система имеет определенное место и вносит свой вклад в организацию моторного контроля, распадается: опорные сигналы отсутствуют, проприоцептивная афферентация, в связи с атонией экстензоров существенно снижена, сигналы от отолитов искажены [5]. Относительно сохранной при этом остается лишь информация, поступающая от зрительного анализатора.

Известно, что даже после полетов небольшой длительности у космонавтов наблюдаются существенные нарушения позной устойчивости [6–11]. Данное явление обуславливается развитием нарушений в деятельности скелетно-мышечной и сердечно-сосудистой систем, развивающихся вследствие отсутствия в условиях микрогравитации привычных для Земли локомоторных и постуральных нагрузок.

Постурографические обследования космонавтов после коротких и длительных космических полетов (КП) выявили выраженные изменения стабилографических характеристик позы, увеличение электромиографической активности постуральных мышц и удлинение периода восстановления стабильности позы после возмущений, выводящих тело из состояния равновесия [6, 12]. Нарушения позы при этом существенно усугублялись при увеличении длительности полета [6], свидетельствуя о том, что восприимчивые к отсутствию гравитации

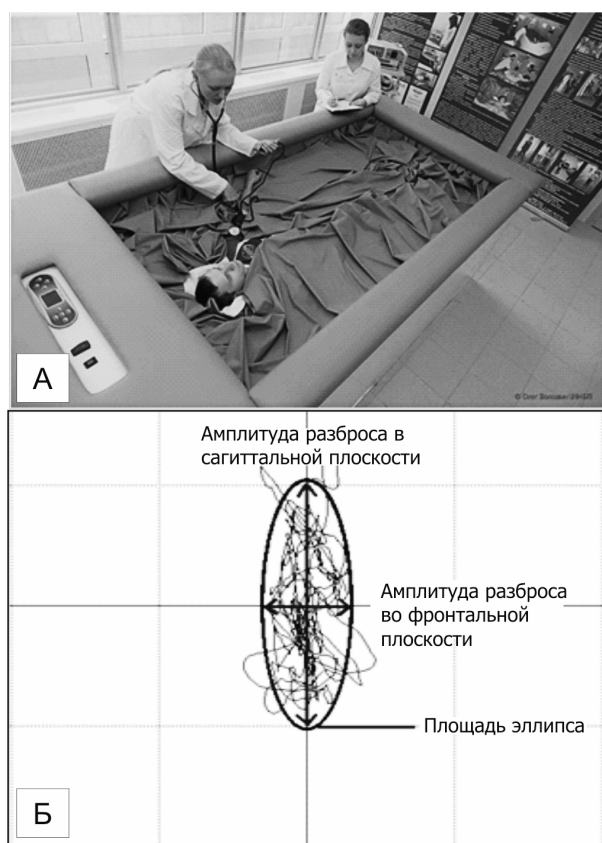


Рис. 1. А – общий вид иммерсионной ванны с помещенным в нее испытуемым. Б – пример статокинезиограммы испытуемого и анализируемые параметры

механизмы поддержания вертикальной устойчивости обладают функцией памяти.

Снижение позной устойчивости наблюдается также после пребывания человека в условиях наземных моделей невесомости, таких как гипокнезия и иммерсионное погружение [13]. После воздействия «сухой» иммерсии (СИ) обследуемые, как правило, отмечают затруднения в поддержании равновесия, ощущение неуверенности стойки в вертикальном положении. У многих при стоянии регистрируется тремор мышц ног. В пробе с нанесением возмущений, отклоняющих тело от вертикали, пороговые значения возмущений резко снижаются, а амплитуды отклонений увеличиваются, нередко возникающие даже при незначительных касаниях закрепленной на груди пластины вызывают позные коррекционные реакции [13].

Факт прямого участия зрения в контроле позы не вызывает сомнений, однако механизмы его участия до сих пор остаются предметом исследования. Предполагается, что центральное и периферическое зрение выполняют функционально разные и взаимодополняющие задачи в обеспечении позных регуляций: центральное зрение вовлечено в контроль колебаний в переднезаднем направлении,

а периферическое – в боковом [14–16]. Согласно данным авторов работы [17], формирование мышечных команд, корректирующих вертикальную позу, лучше отлажено под зрительную афферентацию, чем под проприоцептивную и вестибулярную. Это положение подтверждается экспериментальными данными, свидетельствующими о том, что в нормальных условиях при отсутствии зрительной афферентации имеет место значительное ухудшение параметров вертикальной стойки [17–19].

При переходе к невесомости роль зрительной информации возрастает [10, 20]. Это положение справедливо и для характеристик позных реакций после завершения космических полетов. Согласно данным ряда авторов, у космонавтов в первые дни после возвращения на Землю исследования вертикальной стойки выявили отчетливое увеличение вклада в ее регуляцию зрительной и соматосенсорной информации [12, 21]. Увеличение роли зрительной информации в поддержании вертикальной позы при нарушениях работы других сенсорных входов отмечается и в клинических исследованиях [22].

Исходя из сказанного, представлялось важным определить влияние выключения зрительной обратной связи при выполнении задач поддержания вертикальной стойки после пребывания в условиях, моделирующих эффекты невесомости.

Методика

В качестве модели в работе использовали «сухую» иммерсию, воспроизводящую в полной мере свойственное невесомости устранение опорных и физических нагрузок. Установка «сухой» иммерсии представляет собой ванну с водой размером 256 × 148 × 110 см, к бортам которой прикреплена тонкая и прочная водонепроницаемая ткань (рис. 1, А). Размеры последней в несколько раз превосходят зеркало воды, так что человек, погружаемый в ванну, не соприкасается с водой и с бортами, будучи отделен от них свободноплавающей водонепроницаемой тканью. Длительность непрерывного иммерсионного воздействия в эксперименте составляла 5 сут, в течение которых ежедневно 15–30 мин отводилось для гигиенических процедур. Все добровольцы получали стандартное питание и не были ограничены в потреблении воды.

В исследовании приняло участие 20 молодых мужчин-добровольцев, возраст которых составил $26,4 \pm 6,4$ года, рост – $1,76 \pm 0,041$ м, масса тела – $69,7 \pm 7,3$ кг, индекс массы тела – $22,5 \pm 1,9$ кг/м². Все участники были ознакомлены с условиями эксперимента и дали письменное Информированное согласие на участие в нем. Все исследования проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрены биоэтической комиссией ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

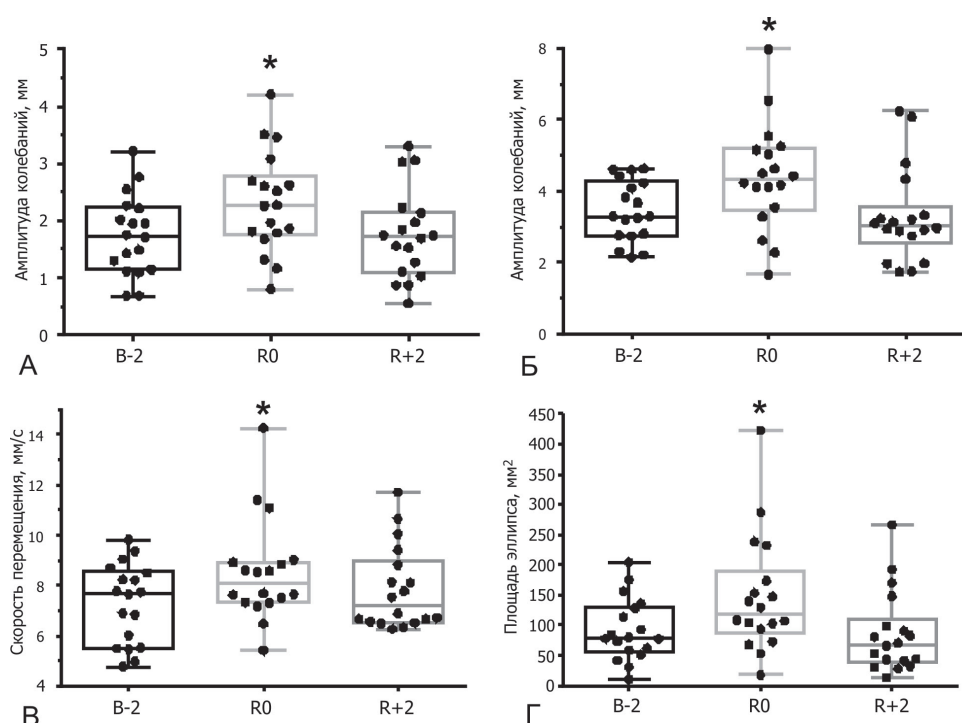


Рис. 2. Стабилографические показатели при стойке с открытыми глазами.

А – амплитуда колебаний ЦД во фронтальной плоскости; Б – амплитуда колебаний ЦД в сагиттальной плоскости; В – скорость перемещения центра давления; Г – площадь эллипса.

По оси ординат: А и Б – амплитуда колебаний ЦД в мм; В – скорость перемещения ЦД в мм/с; Г – площадь в мм². По оси абсцисс: В-2 – 2-е сутки перед воздействием; R0 – день завершения СИ; R+2 – 2-е сутки периода восстановления. Данные представлены в процентном значении в виде медианы, минимума и максимума с 25 и 75 % процентиллями; * – $p \leq 0,05$ по сравнению с фоновыми значениями

Стабилографическое тестирование проводили дважды до погружения, непосредственно после окончания иммерсионного воздействия и на 2-е сутки периода восстановления. При проведении первого обследования испытуемые сами выбирали комфортную для себя позу со слегка разведенными ногами (европейская стойка): эта поза воспроизводилась во всех дальнейших исследованиях. До начала теста испытуемым давалась инструкция «стоять спокойно и ровно», сфокусировав взгляд перед собой. По условиям теста испытуемые вставали на стабилоплатформу из положения лежа, стояли в течение 1 мин с открытыми глазами (ГО), а затем с 1-й минуты – с глазами закрытыми (ГЗ).

При обработке статокинезиограммы (СКГ) анализировали (см. рис. 1, Б.):

- амплитуду колебаний центра давления (ЦД) во фронтальной и сагиттальной плоскостях;
- среднюю скорость перемещения ЦД, представленную отношением длины пути ЦД ко времени исследования:

$$V_{\text{перемещ.ЦД}} = \frac{L_{\text{цд}}}{T_{\text{исследования}}},$$

где $V_{\text{перемещ.ЦД}}$ – средняя скорость перемещения центра давления, $L_{\text{цд}}$ – длина пути, пройденного центром давления, $T_{\text{исследования}}$ – время исследования;

– площадь эллипса СКГ – показатель, описывающий 90 % поверхности, занимаемой статокинезиограммой, отражающий площадь опоры испытуемого за время обследования;

– коэффициент Ромберга (КР) – выраженное в процентах отношение площади эллипса при стойке с закрытыми глазами к площади эллипса при стойке с открытыми глазами, отражающее вклад зрения в поддержание вертикальной устойчивости и рассчитываемое по формуле

$$KP = \frac{S_{\text{эл ГЗ}} \times 100\%}{S_{\text{эл ГО}}},$$

где КР – коэффициент Ромберга, $S_{\text{эл ГЗ}}$ – площадь эллипса при стойке с глазами закрытыми, $S_{\text{эл ГО}}$ – площадь эллипса при стойке с глазами открытыми.

Для регистрации показателей устойчивости использовали стабилоплатформу «Стабилан-01» (ОБК «Ритм», Россия) с частотой дискретизации 50 Гц.

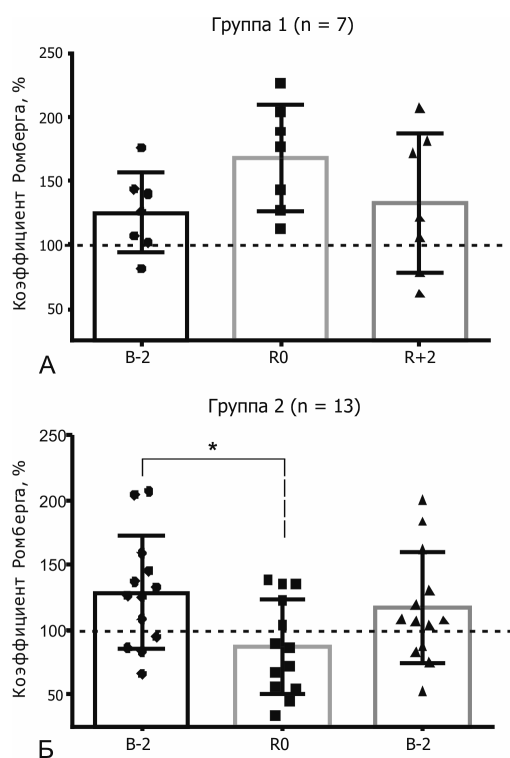


Рис. 3. Значения коэффициента Ромберга в 2 группах испытуемых до и после 5-суточного иммерсионного воздействия: А – группа 1; Б – группа 2.

По оси ординат процентное отношение площади эллипса при стойке с закрытыми глазами к площади эллипса при стойке с глазами открытыми. По оси абсцисс: B-2 – 2-е сутки перед воздействием; R0 – день завершения СИ; R+2 – 2-е сутки периода восстановления. Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение; * – $p \leq 0,05$ по сравнению с фоном. Пунктирной линией отмечено 100 %, к которым приравнивались значения при открытых глазах

Статистическую обработку данных проводили в программной среде GraphPad Prism 6 с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Бонферрони. Графики, на которых показаны абсолютные значения, представлены в виде медианы, минимума и максимума с 25 и 75 перцентилями. Графические материалы, представленные в процентном изменении показателей, показаны в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Результаты и обсуждение

Стабилометрические показатели при стойке с открытыми глазами

В фоне, до погружения в иммерсию медианное значение разброса колебаний во фронтальной плоскости составляло в группе 1,7 мм. После воздействия СИ амплитуда колебаний увеличивалась до

2,3 мм (рис. 2, А). На 2-е сутки периода восстановления значения амплитуды колебаний возвращались к исходным.

Амплитуда колебаний в сагиттальной плоскости до иммерсии существенно превосходила таковую во фронтальной, достигая 3,2 мм (см. рис. 2, Б). После завершения СИ амплитуда колебаний была увеличенной на 32 %, достигая величин 4,3 мм и возвращаясь к исходному уровню (3,3 мм) на 2-е сутки периода восстановления.

То же было справедливо и для скорости перемещения ЦД при стойке с открытыми глазами (см. рис. 2, В), которая в фоновом исследовании составляла 7,7 мм/с, сразу же после иммерсионного воздействия достоверно увеличивалась на 10 %, достигнув 8,1 мм/с и на 2-е сутки периода восстановления была несколько ниже исходных значений, составив 7,2 мм/с.

Площадь эллипса (см. рис. 2, Г) во время стойки с открытыми глазами после СИ увеличивалась более, чем на 50 % (118,9 мм²) и также возвращалась к исходным значениям на 2-е сутки периода восстановления.

Стабилометрические показатели при стойке с закрытыми глазами

В ходе анализа после воздействия моделируемой микрогравитации при стойке с закрытыми глазами были обнаружены 2 разнонаправленных типа изменений характеристик позной устойчивости. По наблюдаемым изменениям испытуемые подразделились на 2 группы.

В ходе фоновое обследование площадь опоры после закрытия глаз в обеих группах увеличивалась, в среднем на 25–30 %. После завершения СИ у испытуемых, вошедших в группу 1 (7 человек), коэффициент Ромберга по сравнению с фоновыми значениями увеличивался в среднем на 43 % (рис. 3, А). У испытуемых, входящих во 2-ю группу (13 человек), напротив КР достоверно уменьшался в среднем на 37 % по сравнению с фоном (см. рис. 3, Б). На 2-е сутки периода восстановления коэффициент Ромберга в обеих группах вновь возвращался к фоновым значениям.

То же было справедливо и для других параметров стабиллографической стойки. В группе 1 сразу же после завершения СИ при закрытых глазах амплитуды колебаний во фронтальной ($0,3 \pm 0,8$ мм) и сагиттальной ($0,04 \pm 1,4$ мм) плоскостях увеличивались. То же было справедливо и для скоростей перемещения ЦД ($1,4 \pm 2,4$ мм/с) и площадей эллипсов (53 ± 53 мм²).

В группе 2 значения данных параметров уменьшались сразу же после иммерсии. Амплитуда колебаний во фронтальной плоскости снижалась на 6 ± 7 мм, а в сагиттальной снижение составило 9 ± 9 мм. Средняя скорость перемещения ЦД

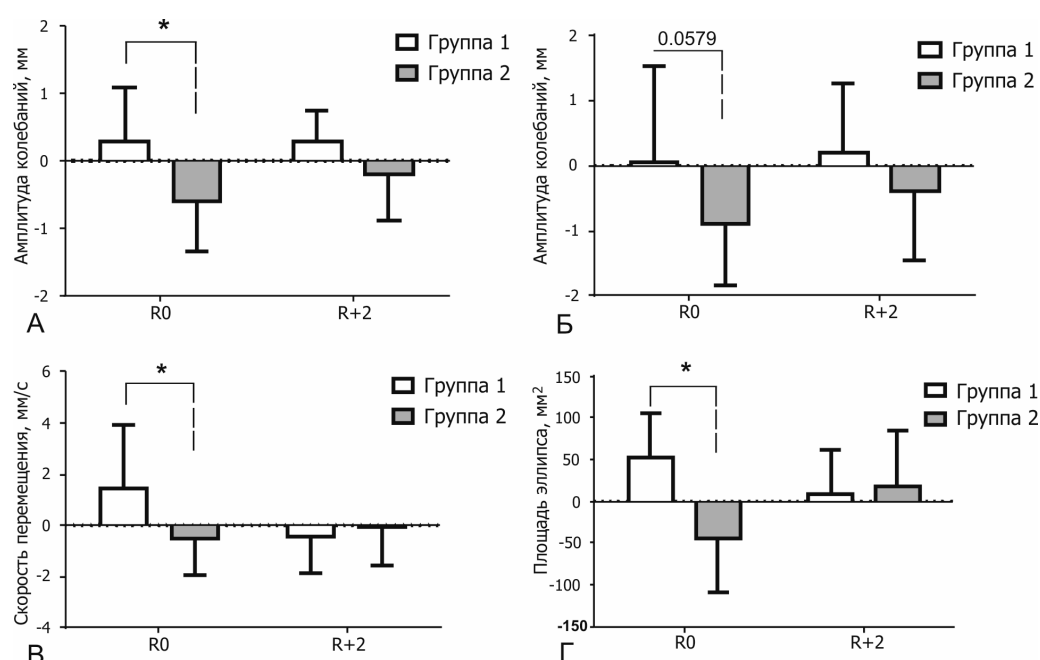


Рис. 4. Изменение вклада зрительной системы в стабилизацию стойки в 2 группах испытуемых после 5-суточного иммерсионного воздействия: А – амплитуда колебаний ЦД во фронтальной плоскости; Б – амплитуда колебаний ЦД в сагиттальной плоскости; В – средняя скорость перемещения ЦД; Г – площадь эллипса.

Данные представлены в виде средних значений $\pm$ стандартное отклонение; параметры СТГ, полученные при стойке с закрытыми глазами, делились на параметры, полученные при глазах открытых. Изменения показаны относительно фоновых значений; * – $p \leq 0,05$ при сравнении между группами

снижалась на $0,5 \pm 1,3$ мм/с. Площадь эллипса снижалась на 43 ± 66 мм². В период восстановления происходило увеличение исследуемых стабилеографических параметров с сохранением высокой вариабельности группы (рис. 4).

Как следует из результатов исследования, после 5-суточного пребывания в иммерсии вертикальная устойчивость человека снижалась. Эти результаты согласуются с данными большинства исследовавших данный феномен авторов [6–10]. Вместе с тем результаты исследований параметров СТГ при выключении зрительной обратной связи оказались неожиданными. У 13 из 20 испытуемых при закрытых глазах улучшался показатель стабильности вертикальной стойки после пребывания в условиях «сухой» иммерсии.

После КП большинство авторов отмечали увеличение коэффициента Ромберга, свидетельствующее о снижении вертикальной устойчивости и об увеличении вклада зрительной информации в ее поддержание [10]. Вместе с тем исследователи отмечали тенденции к некоторому улучшению параметров вертикальной стойки при выключении зрительной обратной связи у пожилых людей [23, 24]. По мнению авторов работы [24], этот результат мог быть связан со снижением у пожилых людей ингибирующих влияний зрительной системы на систему поддержания равновесия. На возможность

того, что при усложнении постральной задачи у людей с дефицитом соматосенсорной чувствительности зрительные сигналы могут дестабилизировать стойку, указывал также автор работы [25]. Инвертированный коэффициент Ромберга был отмечен у пациентов, страдающих детским церебральным параличом [26]. Авторы связывают этот феномен с тем, что при данном заболевании вестибулярная и проприоцептивная системы могут брать на себя ведущую роль в управлении позой. В нашем случае отмеченная стабилизация также может быть результатом усложнения задачи вследствие сенсорного рассогласования и описанного ранее снижения порогов опорных раздражений в условиях микрогравитации [6].

По данным авторов работы [27] показано, что в параболическом полете имеет место унификация двигательной стратегии – для контроля вертикальной ориентации тела все испытуемые вне зависимости от того, на какую информацию – зрительную или проприоцептивную, они опирались как на референтную в нормальных условиях, использовали преимущественно визуальную систему отсчета.

В этом плане вызывают интерес также данные, представленные в работе [28], авторы не наблюдали у здоровых испытуемых в ходе нескольких экспериментальных срезов однонаправленного увеличения или уменьшения значений коэффициента

Ромберга. Объясняется это тем, что при стойке на ровной устойчивой горизонтальной поверхности имеет место избыточность сенсорной информации [29], которая позволяет испытуемым использовать с успехом менее устойчивую стратегию поддержания вертикальной позы. Вместе с тем, при заболеваниях, затрагивающих позную регуляцию, значения коэффициента Ромберга могут быть более повторяемы [30]. Эти наблюдения могут согласовываться с результатами, полученными в данной работе – пониженный коэффициент Ромберга после воздействия СИ у группы 2 может обуславливаться завышенными стабิโลграфическими значениями в фоновом исследовании при стойке с открытыми глазами.

Выводы

Опорная разгрузка во время «сухой» иммерсии приводит к изменению постуральных характеристик, в основе которых лежат сложные межсенсорные взаимодействия. После моделируемой микрогравитации у части испытуемых происходило увеличение коэффициента Ромберга, а у части – уменьшение. Разнонаправленные реакции могут быть связаны как с завышенными фоновыми значениями у части испытуемых, так и с разными стратегиями поддержания позной устойчивости.

Работа поддержана грантом РФФИ, проект 16-29-08320 ОФИ_м.

Список литературы

1. Black F.O., Wall C. 3rd, Nashner L.M. Effects of visual and support surface orientation references upon postural control in vestibular deficient subjects // *Acta Otolaryngol.* 1983. V. 95. № 3–4. P. 199–201.
2. Козловская И.Б., Григорьева Л.С., Гевлич Г.И. Сравнительный анализ влияния невесомости и ее моделей на скоростно-силовые свойства и тонус скелетных мышц человека // *Косм. Биол. и авиакосм. мед.* 1984. Т. 18. № 6. С. 22–26.
3. Kozlovskaya I.B., Grigor'eva L.S., Gevlich G.I. Comparative analysis of the effect of weightlessness and its model on the velocity-strength properties and tonus of human skeletal muscles // *Kosmicheskaya biologiya i aviakosmicheskaya meditsina.* 1984. V. 18. № 6. P. 22–26.
4. Schneider S., Peipsi A., Stokes M., Knicker A., Abeln V. Feasibility of monitoring muscle health in microgravity environments using Myoton technology // *Med. Biol. Eng. Comput.* 2015. V. 53. № 1. P. 57–66.
5. Davey N.J., Rawlinson S.R., Nowicky A.V. et al. Human corticospinal excitability in microgravity and hypergravity during parabolic flight // *Aviat. Space Environ. Med.* 2004. V. 75. № 4. P. 359–363.

5. Kozlovskaya I.B., Barmin V.A., Kreidich Yu.V., Repin A.A. The effects of real and simulated microgravity on vestibulo-oculomotor interaction // *Physiologist.* 1985. V. 28. № 6. P. 51–56.
6. Kozlovskaya I.B., Kreidich Yu.V., Oganov V.S., Koserenko O.P. Pathophysiology of motor functions in prolonged manned space flights // *Acta Astronaut.* 1981. V. 8. № 9–10. P. 1059–1072.
7. Grigoriev A.I., Egorov A.D. General mechanisms of the effect of weightlessness on the human body // *Adv. Space Biol. Med.* 1992. V. 2. P. 1–42.
8. Paloski W.H., Reschke M.F., Black F.O. et al. Recovery of postural equilibrium control following spaceflight // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992. V. 656. P. 747–754.
9. Reschke M.F., Bloomberg J.J., Harm D.L. et al. Posture, locomotion, spatial orientation, and motion sickness as a function of space flight // *Brain Res. Rev.* 1998. V. 28. № 1–2. P. 102–117.
10. Speers R.A., Paloski W.H., Kuo A.D. Multivariate changes in coordination of postural control following spaceflight // *J. Biomech.* 1998. V. 31. № 10. P. 883–889.
11. Саенко Д.Г., Артамонов А.А., Козловская И.Б. Характеристика позных коррекционных ответов до и после длительных космических полетов // *Физиология человека.* 2011. Т. 37. № 5. С. 91–99.
12. Saenko D.G., Artamonov A.A., Kozlovskaya I.B. Characteristics of postural corrective responses before and after long-term spaceflight // *Fiziologiya cheloveka.* 2011. V. 37. № 5. P. 91–99.
13. Cohen H.S., Kimball K.T., Mulavara A.P. et al. Posturography and locomotor tests of dynamic balance after long-duration spaceflight // *J. Vestib. Res.* 2012. V. 22. № 4. P. 191–196.
14. Saenko D.G., Miller T.F., Melnik K.A. et al. Acute effects of dry immersion on kinematic characteristics of postural corrective responses // *Acta Astronaut.* 2016. V. 121. P. 110–115.
15. Stoffregen T.A. Flow structure versus retinal location in the optical control of stance // *J. Exp. Psychol. Hum. Percept. Perform.* 1985. V. 11. P. 554–565.
16. Warren W.H., Kurtz K.J. The role of central and peripheral vision in perceiving the direction of self-motion // *Percept. Psychophys.* 1992. V. 51. P. 443–454.
17. Agostini V., Sbrillini A., Cavallini C. et al. The role of central vision in posture: Postural sway adaptations in Stargardt patients // *Gait Posture.* 2016. V. 43. P. 228–233.
18. Сметанин Б.Н., Кожина В.Г., Попов А.К. Поддержание вертикальной позы человека в условиях виртуального зрительного окружения // *Физиология человека.* 2009. Т. 35. № 2. С. 54–59.
19. Smetanin B.N., Kozhina G.V., Popov A.K. Human upright posture control in a virtual visual environment // *Fiziologiya cheloveka.* 2009. V. 35. № 2. P. 54–59.
20. Ivanenko Y.P., Levik Y.S., Talis V.L., Gurfinkel V.S. Human equilibrium on unstable support: the importance of feet-support interaction // *Neurosci. Lett.* 1997. V. 235. № 3. P. 109–112.

19. Wood S.J., Paloski W.H., Clark J.B. Assessing sensorimotor function following ISS with computerized dynamic posturography // *Aerosp. Med. Hum. Perform.* 2015. V. 86. № 12. P. A45–A53.

20. Mechtcheriakov S., Berger M., Molokanova E. et al. Slowing of human arm movements during weightlessness: the role of vision // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2002. V. 87. P. 576–583.

21. Strzalkowski N.D., Lowrey C.R., Perry S.D. et al. Selective weighting of cutaneous receptor feedback and associated balance impairments following short duration space flight // *Neurosci. Lett.* 2015. V. 592. P. 94–98.

22. Horak F.B., Kluzik J., Hlavacka F. Velocity dependence of vestibular information for postural control on tilting surfaces // *J. Neurophysiol.* 2016. V. 116. № 3. 1468–1479.

23. Prieto T.E., Joes B., Hoffmann R.G. et al. Measures of postural steadiness: differences between healthy young and elderly adults // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1996. V. 43. № 9. P. 956–966.

24. Fujita T., Nakamura S., Ohue M. et al. Effect of age on body sway assessed by computerized posturography // *J. Bone Miner. Metab.* 2005. V. 23. № 2. P. 152–156.

25. Kim K.M., Kim J.S., Grooms D.R. Stroboscopic vision to induce sensory reweighting during postural control // *J. Sport Rehabil.* 2017. P. 1–11.

26. Никитюк И.Е., Мошонкина Т.Р., Щербакowa Н.А. и др. Влияние локомоторной тренировки и функциональной электромиостимуляции на постуральные функции у детей с тяжелыми формами ДЦП // *Физиология человека.* 2016. Т. 42. № 3. С. 37–46.

Nikityuk I.E., Moshonkina T.R., Shcherbakova N.A. et al. Vliyanie lokomotornoj trenirovki i funktsional'noj jelektromiostimuljacji na postural'nye funkcie u detej s tjazhelymi formami DCP // *Fiziologiya cheloveka.* 2016. V. 42. № 3. P. 37–46.

27. Chabeauti P.Y., Vaugoyeau M., Assaiante C. Is vertical postural orientation in weightlessness correlated with the subjects' perceptual typology? // *Gait Posture.* 2010. V. 32. № 4. P. 586–591.

28. Tjernström F., Björklund M., Malmström E.M. Romberg ratio in quiet stance posturography-test to retest reliability // *Gait Posture.* 2015. V. 42. № 1. P. 27–31.

29. Diener H.C., Dichgans J. On the role of vestibular, visual and somatosensory information for dynamic postural control in humans // *Prog. Brain Res.* 1988. V. 76. P. 253–262.

30. Lacour M., Barthelemy J., Borel L. et al. Sensory strategies in human postural control before and after unilateral vestibular neurectomy // *Exp Brain Res.* 1997. V. 115. № 2. P. 300–310.

Поступила 28.11.2017

THE ROLE OF VISUAL FEEDBACK IN THE CONTROL OF HUMAN VERTICAL STABILITY BEFORE AND AFTER 5-DAY «DRY» IMMERSION

Amirova L.E., Shishkin N.V., Kitov V.V., Saveko A.A., Tomilovskaya E.S., Kozlovskaya I.B.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 31–37

The aim of the study was to assess the role of visual feedback in performing tasks of vertical posture maintenance after exposure to simulated microgravity.

The study involved 20 young male volunteers. As a model of microgravity, was the «dry» immersion (DI) that reproduces the elimination of support and physical loads was used. Postural tests were performed twice before the exposure to DI during the first 30 minutes after its completion and on the second day of the recovery period.

The results of the study revealed the increase in all the postural parameters studied with the stand with the eyes open immediately after the completion of the DI. The amplitude of body oscillations in the frontal and sagittal planes increased by 30–35 %, the average velocity of the center of pressure increased by 10 %, the values of ellipse area increased by 50 %. Two different types of changes in postural stability were observed after DI, when performing a vertical stance without visual feedback: in some of the subjects, the Romberg ratio increased by 43 %, while in others, it decreased by 37 %. On the second day of the recovery period the values returned to the background level.

Key words: «dry» immersion, vertical stability, stabilography, visual feedback.

УДК 612.766.1

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ХОДЬБЫ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОЙ ПО ВЕЛИЧИНЕ ГРАВИТАЦИОННОЙ НАГРУЗКИ НА ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНЫЙ АППАРАТ

Шпаков А.В.¹, Воронов А.В.²

¹НИИ космической медицины ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА России, Москва

²Федеральный научный центр физической культуры и спорта, Москва, Россия

E-mail: avshpakov@gmail.com

В исследовании приняли участие 24 человека: 15 мужчин, 9 женщин. Они выполняли ходьбу на беговой дорожке в темпе 90 шагов/мин при различной гравитационной нагрузке на опорно-двигательный аппарат: 100, 38 и 16 % массы тела, характерной для нахождения человека на Земле, Марсе и Луне. Регистрировали и анализировали кинематические параметры и опорные реакции ходьбы, электромиография мышц ног. Изменение гравитационной нагрузки на опорно-двигательный аппарат производили методом вертикального вывешивания.

Ключевые слова: локомоции, видеоанализ движений, вертикальное вывешивание, электромиография, углы в суставах, опорные реакции, гравитационная нагрузка.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 38–47.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-38-47

Исследование кинематических и электромиографических характеристик, а также опорных реакций локомоций человека является одним из ключевых направлений в комплексной диагностике функционального состояния опорно-двигательного аппарата человека не только в условиях пониженной гравитационной нагрузки, но и в различных областях профессиональной деятельности [1, 2].

Цель исследования – оценка влияния пониженной гравитационной нагрузки на опорно-двигательный аппарат (ОДА) человека.

Методика

В исследовании приняли участие 24 человека: 15 мужчин и 9 женщин. Испытуемым в ходе исследования предлагалось выполнить локомоторный тест на беговой дорожке H/P/Cosmos Mercury 4.0, который включал ходьбу в темпе 90 шагов/мин при различных условиях гравитационной нагрузки на ОДА:

– 100 % массы тела испытуемого (ходьба-1G), весовая нагрузка на ОДА соответствует земным условиям;

– 38 % массы тела испытуемого (ходьба-0,38G), весовая нагрузка соответствует нахождению человека на поверхности Марса;

– 16 % массы тела испытуемого (ходьба-0,16G), весовая нагрузка соответствует нахождению человека на поверхности Луны.

Массу тела испытуемых перед исследованием каждого вида ходьбы определяли с использованием тензометрических платформ Kistler, установленных под полотном беговой дорожки. Изменение и регулирование гравитационной нагрузки на ОДА проводили путем вертикального вывешивания с использованием системы H/P/Cosmos-Airwalk, состоящей из воздушного компрессора, рамной конструкции и специального жилета.

Динамические и подометрические характеристики ходьбы регистрировали тензометрическими платформами Kistler. Электромиографические и биомеханические параметры ходьбы регистрировали с помощью 8-канального электромиографа «СпортЛаб», входящего в состав системы видеоанализа движений «Видеоанализ-3D Биософт». Запись видеоизображения и электромиограммы синхронизирована, что позволяет проводить анализ биомеханической информации с точностью 1 мс [3]. Частота регистрации электромиограммы – 1000 Гц, видеосигнала – 90 Гц. Электромиограмма аппаратно была отфильтрована в диапазоне 15–500 Гц и программно обработана в следующей последовательности: фильтрация механограммы, инвертирование, сглаживание скользящим средним с окном 100 мс. Анализ биомеханической информации проводили в границах двойного шага левой ноги. Время двойного шага рассчитывали от постановки стопы на опору до следующей постановки одноименной стопы на опору. Время каждого двойного шага приводили к 100 % и рассматривали электромиографические и кинематические показатели в относительно временных точках двойного шага. Конечным показателем при анализе электромиографической активности была амплитуда интегрированной электромиограммы



Рис. 1. Положение нижних конечностей в цикле двойного шага от контакта правой стопы до контакта правой стопы [5]

(А-мах). При исследовании кинематических характеристик анализировали угловые перемещения в тазобедренном, коленном, голеностопном суставах левой ноги. При анализе динамических и подометрических характеристик рассчитывали и оценивали следующие показатели:

- *Время двойного шага* – время от постановки стопы на опору до следующей постановки стопы на опору той же ноги.
- *Длина двойного шага* – расстояние, измеренное от постановки стопы на опору до следующей постановки на опору одной ноги.
- *Время одиночной опоры* – время от постановки стопы на опору до отрыва стопы при отталкивании одной ноги.
- *Время двойной опоры* – временной отрезок, в течение которого обе стопы касаются опоры.
- *Первый пик реакции опоры* – абсолютная максимальная приложенная сила для каждой стопы (нормировали на массу тела испытуемых).
- *Минимальная сила в фазе срединной опоры* – величина опорной реакции в фазе срединной опоры. Минимальная сила опорной реакции между передним и задним толчками (нормировали на массу тела испытуемых).
- *Второй пик реакции опоры* – максимальная сила во время отталкивания (нормировали на массу тела испытуемых).
- *Индекс нарастания силы в фазе переднего толчка* – величина наклона нарастания силы, взятая от 10 до 90 % силы переднего толчка.
- *Индекс снижения силы в фазе заднего толчка* – величина наклона снижения силы, взятая от 90 до 10 % силы заднего толчка.

Анализ результатов данного исследования проводили в несколько этапов:

1. Сравнительная оценка профилей электромиографической активности мышц голени и бедра во время ходьбы при различных величинах гравитационной нагрузки на ОДА.

2. Оценка А-мах мышц голени и бедра при ходьбе во время ходьбы при различных режимах гравитационной нагрузки на ОДА.

3. Оценка величины угловых перемещений в суставах ног при различных режимах гравитационной нагрузки на ОДА.

4. Оценка динамических и подометрических характеристик.

Результаты и обсуждение

Согласно данным литературы [4, 5], цикл двойного шага определяется как интервал между 2 последовательными «вхождениями» одного из повторяющихся событий (фазы, моменты) при ходьбе. Хотя любое событие может быть выбрано, чтобы определить цикл походки, но, как правило, удобно использовать тот момент, при котором одна нога контактирует с опорой первой (первоначальный контакт, фаза переднего толчка). Если цикл двойного шага начинается с первоначального контакта с опорой правой стопы, то цикл будет продолжаться до тех пор, пока правая нога не будет контактировать с опорой снова. Для левой ноги проходит точно такая же серия событий, но смещенными по времени наполовину цикла. Для анализа ходьбы используются следующие термины для определения основных событий цикла двойного шага (рис. 1):

1. Пяточный контакт при постановке стопы на опору.

2. «Прислоение» подошвенной поверхности стопы к опоре.

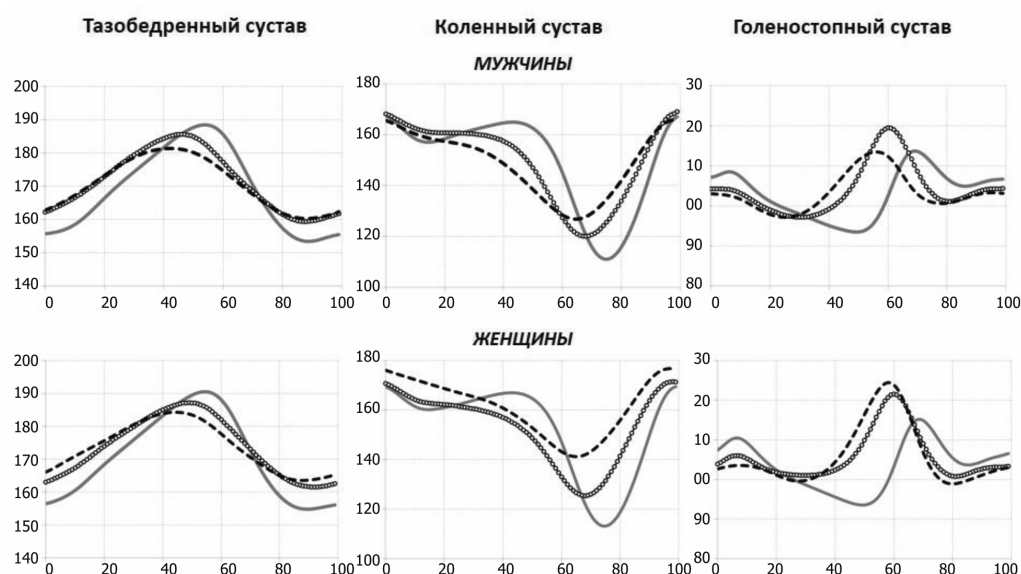


Рис. 2. Электромиографический профиль мышц голени при ходьбе в темпе 90 шагов/мин на беговой дорожке при различном уровне гравитационной нагрузки на опорно-двигательный аппарат.

Здесь и на рис. 3: по оси абсцисс – время двойного шага в %; по оси ординат – амплитуда ЭМГ в мкВ

3. Момент «вертикали» в фазе срединной опоры.

4. Момент отрыва пятки от опоры (начало отталкивания).

5. Момент отрыва стопы, а именно большого пальца от опоры (завершение отталкивания). Данное положение стопы разграничивает фазы опоры и маха.

6. Момент прохождения маховой стопы маховой ноги в плоскости опорной стопы.

7. Пяточный контакт при постановке одноименной стопы на опору (следующего шагового цикла).

Эти 7 событий разделяют цикл двойного шага на 7 положений нижней конечности, 4 из которых происходят в опорный период (1–4) и 3 – в период маха (5–7).

Электромиографический профиль мышц нижних конечностей при ходьбе. Оценивали и сравнивали периоды максимальной и минимальной активности отдельных мышц в цикле двойного шага. Профили электромиографической активности мышц голени во время ходьбы при различных величинах гравитационной нагрузки на ОДА представлены на рис. 2.

При нормальной ходьбе (ходьба-1G, или ходьба при 100 % массы тела испытуемого) в темпе 90 шагов/мин профиль электромиографической активности (ЭМГ-активности) флексора голеностопного сустава *m. tibialis anterior* имеет 2 максимума. Первый из них приходится на самое начало цикла двойного шага – постановка стопы на опору, что составляет 0–5 % времени двойного шага. В эту фазу происходит сгибание в голеностопном суставе и А-мах

может достигать величины в 180–200 мкВ. Затем происходит полный контакт подошвенной поверхности стопы с опорой и ЭМГ-активность *m. tibialis anterior* снижается до 15–20 мкВ. Второй максимум *m. tibialis anterior* наблюдается при переносе ноги в период маха. Во временном выражении это составляет 75–85 % времени двойного шага, когда происходит незначительное сгибание голеностопного сустава и А-мах достигает 110–130 мкВ. Минимальное значение ЭМГ-активности *m. tibialis anterior* регистрируется на временном отрезке 15–50 % времени двойного шага. При измененной гравитационной нагрузке на ОДА, составляющей 38 и 16 % массы тела соответственно, профиль ЭМГ-активности *m. tibialis anterior* отличается от ходьбы-1G меньшей А-мах в момент постановки стопы на опору, более плавным снижением ЭМГ-активности при переходе от постановки стопы в момент полного контакта подошвенной поверхности стопы с опорой. Увеличение ЭМГ-активности при переходе к отталкиванию во время ходьбы-0,38G и ходьбы-0,16G происходит значительно быстрее, чем при ходьбе-1G. Второй максимум ЭМГ-активности *m. tibialis anterior* в отличие от нормальной ходьбы значительно возрастает до 170–190 мкВ.

Для экстензоров голеностопного сустава *m. soleus* и *m. gastrocnemius medialis* период максимальной активности проявляется в фазе заднего толчка (интервал между 45–55 % от времени двойного шага). А-мах для *m. soleus* может составлять 120–140 мкВ, для *m. gastrocnemius medialis* – 200–220 мкВ. Уменьшение ЭМГ-активности *m. soleus* и *m. gastrocnemius medialis* после завершения

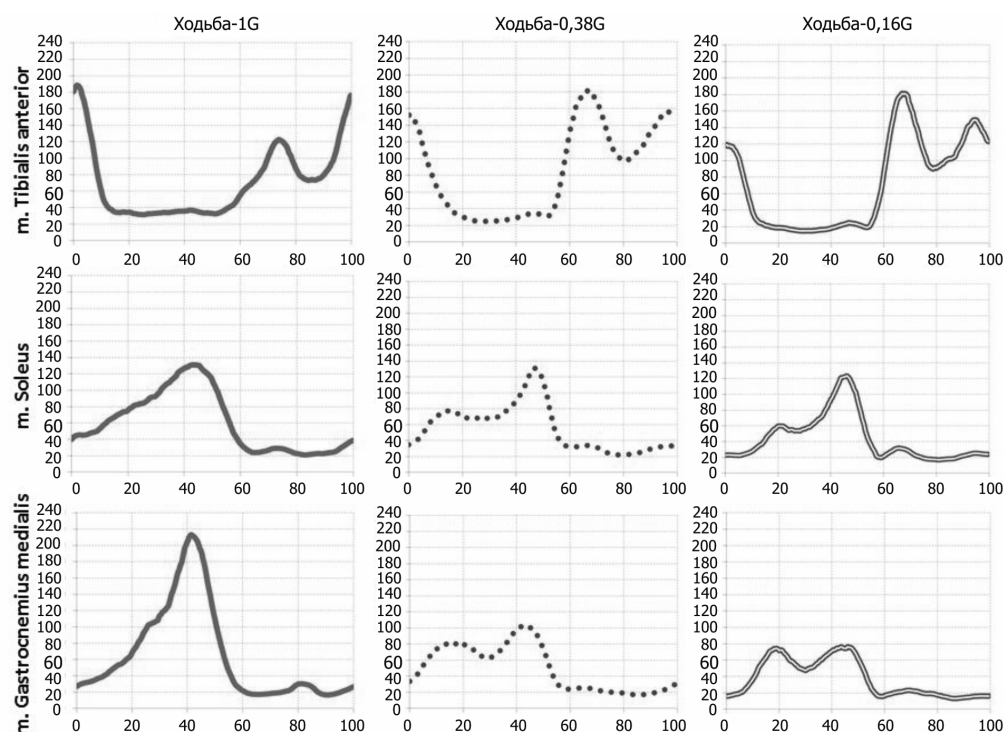


Рис. 3. Электромиографический профиль мышц бедра при ходьбе в темпе 90 шагов/мин на беговой дорожке при различном уровне гравитационной нагрузки на опорно-двигательный аппарат

отталкивания происходит до 15–25 мкВ. Затем ЭМГ-активность *m. soleus* остается неизменной на всем протяжении безопорного периода и до начала следующего шагового цикла. В профиле ЭМГ-активности *m. gastrocnemius medialis* в период маха (55–100 % от времени двойного шага) наблюдается еще одно незначительное увеличение, которое обусловлено сгибанием коленного сустава. Двухсуставная *m. gastrocnemius medialis* принимает участие не только в разгибании голеностопного сустава при отталкивании, но и в сгибании коленного сустава при переносе ноги. Указанное увеличение ЭМГ-активности *m. gastrocnemius medialis* наблюдается приблизительно за 15–20 % до окончания периода маха. Во время ходьбы-0,38G и ходьбы-0,16G отличительными особенностями ЭМГ-активности *m. soleus* по сравнению с ходьбой-1G является меньшая величина А-мах, а также более быстрое увеличение во время отталкивания и быстрое снижение в завершающей фазе отталкивания.

Профили электромиографической активности мышц бедра во время ходьбы при различных величинах гравитационной нагрузки на ОДА представлены на рис. 3.

Мышцы передней поверхности бедра *m. vastus lateralis* и *m. rectus femoris* при нормальной ходьбе в темпе 90 шагов/мин наибольшую нагрузку испытывают при постановке стопы на опору, когда происходит перенос веса тела на опорную ногу.

Следовательно, максимальная ЭМГ-активность для данных мышц регистрируется в самом начале цикла двойного шага (примерно 0–10 % времени двойного шага) и составляет около 30–40 мкВ для *m. vastus lateralis* и около 20–25 мкВ для *m. rectus femoris*. При переходе к моменту «вертикали» ЭМГ-активность как *m. vastus lateralis*, так и *m. rectus femoris* снижается до 5–10 мкВ. Так как темп ходьбы в нашем исследовании соответствует средней скорости ходьбы человека в повседневной жизни (около 4,5 км/ч) и не является высоким, мышцы передней поверхности бедра не принимают активного участия в выполнении отталкивания. Соответственно и ЭМГ-активность *m. vastus lateralis* и *m. rectus femoris* значительно не возрастает. Дальнейшее возрастание ЭМГ-активности *m. vastus lateralis* и *m. rectus femoris* наблюдается уже в самом завершении цикла двойного шага (85–100 % времени шага), что обусловлено переносом ноги и разгибанием в коленном суставе для подготовки к следующему шагу. Величина ЭМГ-активности *m. biceps femoris caput longus* при нормальной ходьбе в начале двойного шага составляет около 50–60 мкВ, которая снижается до 15–20 мкВ на временном отрезке 15–50 % времени двойного шага. Во время отталкивания ЭМГ-активность мышцы возрастает до 25 мкВ. При переносе ноги в фазе маха (Swing phase) ЭМГ-активность *m. biceps femoris caput longus* возрастает с 10–15 мкВ во время отрыва ноги от опоры до

Таблица 1

Максимальная амплитуда ЭМГ (мкВ) мышц голени во время ходьбы на беговой дорожке при различной гравитационной нагрузке на опорно-двигательный аппарат

	Мужчины							
	Tibialis anterior				Soleus			
	1G	0,38G	0,16G	1G	0,38G	0,16G	1G	Gastrocnemius medialis
Постановка стопы	216,3 ± 99,8	184,4 ± 89,8	163,1 ± 50,2	26,4 ± 8,7	22,5 ± 7,1	20,7 ± 7,5	23,8 ± 10,8	26,2 ± 12,7
Отталкивание	25,9 ± 10,2	22,3 ± 8,0	17,9 ± 11,0	120,0 ± 42,3	100,2 ± 38,2	61,4 ± 29,4	233,6 ± 104,8	113,5 ± 47,9
Перенос ноги	109,8 ± 51,3	91,6 ± 49,3	94,3 ± 48,6	17,1 ± 6,3	14,7 ± 3,6	14,5 ± 3,8	15,6 ± 6,5	18,8 ± 11,4
	Женщины							
	Tibialis anterior				Soleus			
	1G	0,38G	0,16G	1G	0,38G	0,16G	1G	Gastrocnemius medialis
Постановка стопы	180,6 ± 55,3	152,0 ± 50,4	119,5 ± 75,7	39,8 ± 12,5	34,8 ± 13,0	23,0 ± 15,6	26,8 ± 8,8	33,5 ± 13,8
Отталкивание	36,8 ± 10,3	33,7 ± 13,8	24,6 ± 14,4	131,4 ± 37,0	130,2 ± 75,8	122,5 ± 88,1	212,6 ± 84,7	101,7 ± 71,2
Перенос ноги	122,2 ± 49,6	179,3 ± 65,3	178,8 ± 108,6	28,7 ± 16,6	33,3 ± 13,9	29,5 ± 20,0	20,1 ± 7,0	24,4 ± 8,8

Таблица 2

Максимальная амплитуда ЭМГ (мкВ) мышц бедра во время ходьбы на беговой дорожке при различной гравитационной нагрузке на опорно-двигательный аппарат

	Мужчины							
	m.vastus lateralis				m. rectus femoris			
	1G	0,38G	0,16G	1G	0,38G	0,16G	1G	m. biceps femoris caput longus
Постановка стопы	57,9 ± 28,0	14,1 ± 5,2	14,8 ± 8,0	38,1 ± 9,5	13,8 ± 3,2	13,3 ± 3,6	53,9 ± 21,3	63,2 ± 44,0
Отталкивание	12,9 ± 5,8	13,3 ± 3,5	14,0 ± 4,4	15,0 ± 6,0	18,1 ± 5,6	19,2 ± 6,3	11,0 ± 3,1	14,4 ± 5,8
Перенос ноги	11,8 ± 4,5	11,4 ± 3,4	15,2 ± 7,2	14,0 ± 6,1	13,5 ± 3,0	13,8 ± 3,7	12,7 ± 4,0	13,9 ± 6,2
	Женщины							
	m.vastus lateralis				m. rectus femoris			
	1G	0,38G	0,16G	1G	0,38G	0,16G	1G	m. biceps femoris caput longus
Постановка стопы	40,6 ± 24,3	14,7 ± 5,5	14,1 ± 2,9	28,1 ± 8,2	17,4 ± 8,4	85,9 ± 60,3	60,9 ± 50,3	64,8 ± 47,7
Отталкивание	14,8 ± 4,8	14,2 ± 6,4	15,7 ± 2,7	20,9 ± 20,9	22,0 ± 13,9	21,5 ± 6,0	26,8 ± 18,9	15,8 ± 6,0
Перенос ноги	10,3 ± 2,7	14,4 ± 3,7	12,7 ± 3,4	11,7 ± 3,7	16,9 ± 7,6	16,4 ± 7,5	11,5 ± 1,5	14,7 ± 3,6

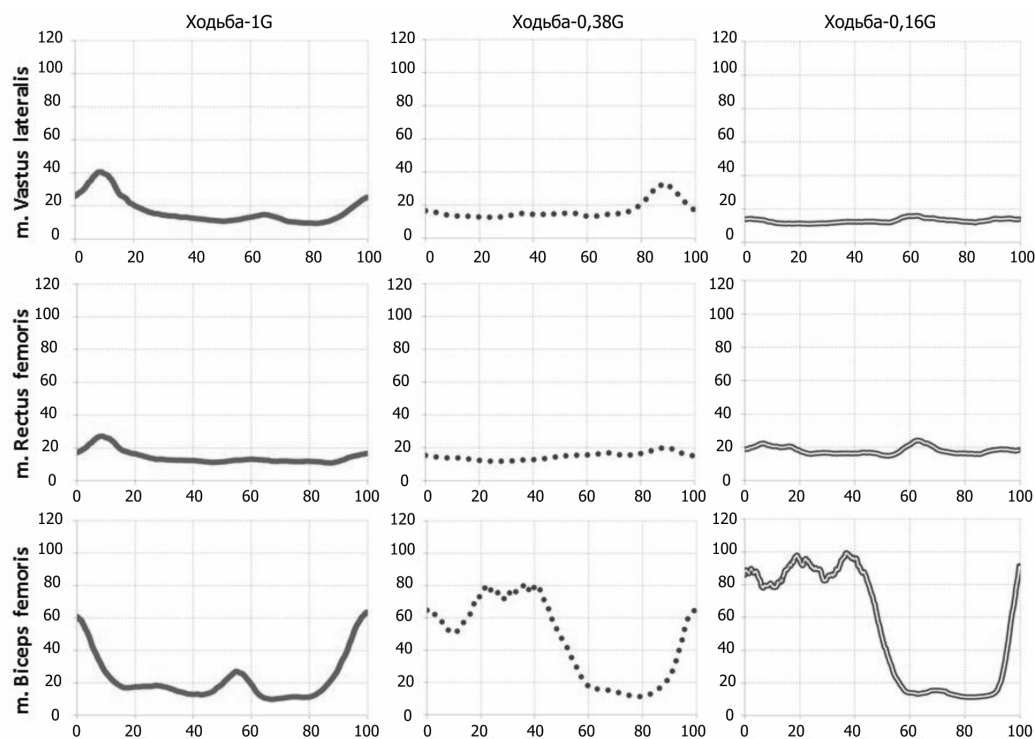


Рис. 4. Кинематические профили углов в суставах нижней конечности при ходьбе в темпе 90 шагов/мин на беговой дорожке при различном уровне гравитационной нагрузки на опорно-двигательный аппарат.

По оси абсцисс – время двойного шага в %; по оси ординат – величина угла в градусах. Ходьба-1G обозначена сплошной линией серого цвета, ходьба-0,38G – черной линией с круглым маркером, ходьба-0,16G – пунктирной линией

55–65 мкВ при выносе ноги вперед и начале следующего шага.

Во время ходьбы с измененной гравитационной нагрузкой профили ЭМГ-активности мышц бедра несколько изменяются. Так, если рассматривать профили *m. vastus lateralis* и *m. rectus femoris* при ходьбе-0,38G, то можно наблюдать полное отсутствие пика ЭМГ-активности при постановке стопы на опору в отличие от ходьбы при 100%-ной весовой нагрузке (ходьба-1G). Незначительно возрастает ЭМГ-активность разгибателей коленного сустава только в безопорной фазе при переносе ноги (80–90 % времени двойного шага). При «разгруженной» ходьбе происходит изменение в профиле ЭМГ-активности *m. vastus lateralis* и *m. rectus femoris*, которые отличаются от нормальной ходьбы. Наибольшее проявление ЭМГ-активности этих мышц наблюдается во время отталкивания (период 55–65 % от времени двойного шага). Более выраженные отличия при ходьбе с пониженной гравитационной нагрузкой на ОДА были выявлены при сравнительном анализе профилей ЭМГ-активности *m. biceps femoris caput longus*. В отличие от ходьбы-1G, при ходьбе-0,38G и ходьбе-0,16G значительно возрастает ЭМГ-активность на всем протяжении опорной фазы (0–40 % времени двойного шага). Это связано с тем, что при уменьшении гравитации

основная нагрузка переходит от мышц голени к мышцам, действующим в тазобедренном суставе, т.е. ходьба превращается в плавание [7].

Максимальная электромиографическая активность мышц нижних конечностей при ходьбе. Показатели максимальной амплитуды ЭМГ мышц голени в группах мужчин и женщин представлены в табл. 1. Как в группе мужчин, так и в группе женщин основная «работа» в момент постановки стопы на опору выполняется мышцей-флексором голеностопного сустава *m. tibialis anterior*. Об этом свидетельствуют показатели амплитуды ЭМГ. Возрастание амплитуды ЭМГ *m. tibialis anterior* в момент постановки стопы на опору обусловлено сгибанием в голеностопном суставе. Экстензоры голеностопного сустава активного участия в данной фазе двойного шага не принимают и соответственно амплитуда *m. soleus* и *m. gastrocnemius medialis* минимальна (см. рис. 2). При ходьбе с пониженной нагрузкой на ОДА амплитуда *m. tibialis anterior* уменьшается по сравнению с ходьбой-1G на 15 % (ходьба-0,38G) и на 25 % (ходьба-0,16G) среди мужчин. Среди женщин уменьшение величины амплитуды при ходьбе-0,38G составляет также 15 %, а при ходьбе-0,16G амплитуда ЭМГ уменьшается значительно больше, чем у мужчин и составляет 33 % по сравнению с нормальной ходьбой (см. табл. 1).

В фазе заднего толчка основную нагрузку выполняют экстензоры *m. soleus* и *m. gastrocnemius medialis*, так как происходит подошвенное сгибание голеностопного сустава. При этом наибольшая роль принадлежит *m. gastrocnemius medialis*. Аналогично *m. tibialis anterior* амплитуда *m. soleus* и *m. gastrocnemius medialis* при ходьбе в условиях пониженной нагрузки на ОДА снижается. Для *m. soleus* это уменьшение составляет 17 и 48 % при ходьбе-0,38G и ходьбе-0,16G соответственно среди мужчин. У женщин амплитуда *m. soleus* изменяется при данных способах ходьбы значительно меньше – до 1 % при ходьбе-0,38G и до 7 % при ходьбе-0,16G. Ходьба при 38%-ной весовой нагрузке обусловила снижение амплитуды ЭМГ *m. gastrocnemius medialis* на 52 %, ходьба при 16%-ной весовой нагрузке – на 64 %.

В периоде маха происходит увеличение амплитуды ЭМГ флексора *m. tibialis anterior* и почти полное исчезновение ЭМГ-активности экстензоров *m. soleus* и *m. gastrocnemius medialis*. Также присутствует разнонаправленный характер изменения амплитуды ЭМГ у мужчин и женщин. Если в группе мужчин наблюдается снижение ЭМГ-активности *m. tibialis anterior* при переносе ноги на 17 % при ходьбе-0,38G и 14 % при ходьбе-0,16G, то в женской группе, напротив, происходит увеличение ЭМГ-активности *m. tibialis anterior* на 22 и 39 % соответственно. ЭМГ-активность *m. soleus* и *m. gastrocnemius medialis* в фазе маха при ходьбе с пониженной нагрузкой на ОДА по сравнению с ходьбой нормальной существенно не изменяется.

Показатели максимальной амплитуды ЭМГ мышц бедра в отдельных фазах двойного шага представлены в табл. 2.

При постановке стопы на опору во время ходьбы со 100%-ной весовой нагрузкой основную роль выполняют разгибатели коленного сустава *m. vastus lateralis* и *m. rectus femoris*, так как вес тела переносится на опорную ногу. Это происходит одинаково в группах мужчин и женщин. При снижении весовой нагрузки происходит и снижение ЭМГ-активности данных мышечных групп, причем весьма значительное.

Амплитуда ЭМГ *m. vastus lateralis* в группе мужчин снижается одинаково на 75 % при ходьбе-0,38G и при ходьбе-0,16G. В группе женщин несколько меньшее изменение – на 64 %, но также одинаково для 2 типов ходьбы. Амплитуда ЭМГ *m. rectus femoris* при ходьбе в измененных условиях изменяется аналогичным образом – снижение ЭМГ-активности при выполнении ходьбы в условиях 38 и 16 % весовой нагрузки. В остальных фазах двойного шага профиль ЭМГ *m. vastus lateralis* и *m. rectus femoris* не меняется (рис. 3).

Амплитуда ЭМГ *m. biceps femoris caput longus*, при постановке стопы на опору в начале цикла

двойного шага значительно не изменяется, несмотря на уменьшение весовой нагрузки на ОДА. Наоборот, в отличие от мышц передней поверхности бедра, для мышц задней поверхности происходит увеличение ЭМГ-активности при снижении весовой нагрузки. Для группы мужчин оно составляет 17 % для ходьбы-0,38G и 8 % для ходьбы-0,16G. В женской группе увеличение амплитуды ЭМГ *m. biceps femoris caput longus* при ходьбе со сниженной весовой нагрузкой на ОДА достигало 6 и 40 % для ходьбы-0,38G и ходьбы-0,16G соответственно. В фазе маха различий ЭМГ-активности *m. biceps femoris caput longus* между нормальной ходьбой и ходьбой со снижением весовой нагрузки выявлено не было.

Кинематический анализ ходьбы. Результаты анализа углов в суставах ног представлены на рис. 4 и в табл. 3.

Анализ углов в суставах ног при ходьбе с различной гравитационной нагрузкой на ОДА выявил наличие изменений суставной кинематики при уменьшении нагрузки на ОДА, как в группе мужчин, так и в группе женщин.

При ходьбе с уменьшенной гравитационной нагрузкой на ОДА угол в тазобедренном суставе в момент постановки стопы на опору увеличивался статистически достоверно по сравнению с нормальной ходьбой (при 100 % массы тела испытуемого). Во время отталкивания происходило уменьшение угла в тазобедренном суставе, причем наиболее выраженное при ходьбе-0,16G. Период маха (перенос ноги) характеризовался увеличением угловых перемещений в тазобедренном суставе, которое было наиболее достоверно выражено при ходьбе-0,16G. Вышеописанные изменения кинематики тазобедренного сустава при различных уровнях гравитационной нагрузки на ОДА были выявлены при анализе экспериментальных данных как в группе мужчин, так и в группе женщин (см. табл. 3).

В коленном суставе в группе мужчин при постановке стопы на опору при ходьбе-0,38G и ходьбе-0,16G изменений угловой кинематики не обнаружено (см. рис. 4). Также не было изменений по сравнению с нормальной ходьбой и во время отталкивания. Снижение гравитационной нагрузки на ОДА приводило к уменьшению сгибания в коленном суставе при переносе ноги: $111 \pm 5^\circ$ при ходьбе-1G и $127 \pm 6^\circ$ при ходьбе-0,16G. В группе женщин при постановке стопы на опору коленный сустав выпрямляется на 7° ($176 \pm 8^\circ$) по сравнению с ходьбой-1G ($169 \pm 5^\circ$). При переносе ноги угол в коленном суставе изменялся аналогично мужской группе, но с более выраженными и достоверными изменениями по сравнению с нормальной ходьбой (сгибание коленного сустава до $141 \pm 27^\circ$).

Изменения кинематики голеностопного сустава в обеих группах были однонаправленными. При снижении гравитационной нагрузки на ОДА основные

Таблица 3

Величины углов в суставах нижних конечностей во время ходьбы на беговой дорожке при различной гравитационной нагрузке на опорно-двигательный аппарат

	Мужчины								
	Тазобедренный сустав			Коленный сустав			Голеностопный сустав		
	1G	0,38G	0,16G	1G	0,38G	0,16G	1G	0,38G	0,16G
Постановка стопы	156 ± 4	162 ± 2*	163 ± 2*	167 ± 4	168 ± 3	166 ± 5	107 ± 5	104 ± 7	103 ± 7
Отталкивание	188 ± 2	186 ± 3	181 ± 4*	156 ± 5	156 ± 6	153 ± 8	114 ± 6	119 ± 5	113 ± 9
Перенос ноги	154 ± 3	159 ± 3	160 ± 3*	111 ± 5	120 ± 4*	127 ± 6*	105 ± 4	101 ± 5	101 ± 6
	Женщины								
	Тазобедренный сустав			Коленный сустав			Голеностопный сустав		
	1G	0,38G	0,16G	1G	0,38G	0,16G	1G	0,38G	0,16G
Постановка стопы	156 ± 1	163 ± 2*	166 ± 3*	169 ± 5	171 ± 4	176 ± 8	107 ± 6	104 ± 5	103 ± 8
Отталкивание	190 ± 3	187 ± 6	184 ± 5	162 ± 4	155 ± 8*	162 ± 16	115 ± 7	122 ± 13	124 ± 5
Перенос ноги	155 ± 2	162 ± 3	164 ± 3*	113 ± 3	125 ± 5*	141 ± 27*	104 ± 4	101 ± 6	99 ± 5

Примечание. * – достоверные изменения показателей при ходьбе-0,16G, ходьбе 0,38G по сравнению с нормальной ходьбой-1G (p < 0,05).

Таблица 4

Параметры двойного шага и опорные реакции во время ходьбы на беговой дорожке при различной гравитационной нагрузке на опорно-двигательный аппарат (представлены данные по группе мужчин)

Показатели	Ходьба-1G	Ходьба-0.38G	Ходьба-0.16G
<i>Показатели двойного шага</i>			
Время двойного шага, с	1,34 ± 0,07	1,38 ± 0,13	1,34 ± 0,13
Длина двойного шага, см	121,0 ± 5,9	122,8 ± 11,7	128,6 ± 11,5
Время одиночной опоры, с	0,88 ± 0,05	0,77 ± 0,08	0,73 ± 0,09
Время двойной опоры, с	0,19 ± 0,02	0,10 ± 0,04	0,10 ± 0,02
Соотношение ОПОРА : МАХ, %	65:35	55:45	54:46
<i>Опорные реакции</i>			
Первый пик реакции опоры*, %	100,3 ± 5,1	109,0 ± 19,5	204,6 ± 60,9
Сила реакции опоры во время отталкивания*, %	80,7 ± 3,9	92,3 ± 18,1	160,1 ± 35,6
Второй пик реакции опоры*, %	74,9 ± 6,7	85,6 ± 19,6	157,0 ± 36,7
<i>Контакт стопы с опорной поверхностью</i>			
Индекс нарастания силы в фазе переднего толчка, у.е.	3766,9 ± 429,5	2126,8 ± 802,9	2020,8 ± 733,5
Индекс снижения силы в фазе заднего толчка, у.е.	1635,7 ± 633,0	484,8 ± 123,4	379,5 ± 75,5

Примечание. Показатели, отмеченные *, нормировали на массу тела испытуемых.

изменения углов голеностопного сустава происходили во время отталкивания и переносе ноги в фазе маха (см. рис. 4).

Параметры двойного шага и опорные реакции. Показатели тензометрических платформ были разделены на 3 группы:

1. Показатели, характеризующие двойной шаг.
2. Опорные реакции при ходьбе.

3. Показатели, характеризующие контакт стопы с опорной поверхностью (полотном беговой дорожки).

Показатели 1-й группы меньше всего подверглись изменениям при ходьбе со сниженной гравитационной нагрузкой на ОДА. Время и длина двойного шага при ходьбе-0,38G и ходьбе-0,16G почти не менялись. Показатели времени одиночной и двойной опоры при снижении гравитационной нагрузки снижались.

При этом время двойной опоры при ходьбе-0,38G и ходьбе-0,16G по сравнению с нормальной ходьбой сократилось в 2 раза (табл. 4).

Соотношение опорного и безопорного периодов двойного шага в процентном соотношении при нормальной ходьбе составляло 65 : 35. При снижении гравитационной нагрузки на ОДА наблюдали изменение данного показателя до 55 : 45 и до 54:46 при ходьбе-0,38G и ходьбе-0,16G соответственно.

Во 2-й группе увеличились все показатели – максимальная приложенная сила, сила реакции опоры во время отталкивания и сила реакции опоры в фазу срединной опоры. Наибольшее увеличение почти на 200 % по сравнению с нормальной ходьбой было выявлено при ходьбе-0,16G. Это довольно неожиданный результат, так как логично было бы ожидать при снижении гравитационной (весовой) нагрузки и снижения опорных реакций при ходьбе. Возможно, ответ на данный вопрос будет получен в наших последующих исследованиях в данной области.

Показатели, характеризующие контакт стопы с опорной поверхностью уменьшались параллельно уменьшением гравитационной нагрузки. Снижение индекса нарастания силы в фазе переднего толчка указывает на более медленную постановку стопы на опору, а уменьшение индекса снижения силы в фазе заднего толчка свидетельствует о снижении скорости выполнения отталкивания.

Выводы

1. Изменение гравитационной (весовой) нагрузки на опорно-двигательный аппарат методом вертикального вывешивания существенно изменяет моторный паттерн ходьбы человека, что отражается на экстремумах и форме профилей электромиограммы мышц голени и бедра в цикле двойного шага. Изменения наиболее выражены для опорных фаз *m. soleus*, *m. gastrocnemius medialis* и *m. tibialis anterior*, которые, по-видимому, являются ведущими мышечными группами при выполнении ходьбы в темпе 90 шагов/мин. В опорных фазах ЭМГ-активность этих мышц снижается при ходьбе с весовой нагрузкой 38 и 16 % от массы тела. В периоде маха электрическая активность *m. tibialis anterior* не зависит от весовой нагрузки (см. рис. 2).

2. Сравнение профилей ЭМГ-активности мышц голени и бедра при ходьбе с различной гравитационной нагрузкой на опорно-двигательный аппарат позволяет заключить следующее. Ходьба при весовой нагрузке 38 и 16 % от массы тела обуславливает изменения как величины амплитуды ЭМГ мышц, так и максимальной и минимальной активности мышц в цикле двойного шага. Из наиболее значимых отличий среди мышц голени следует отметить возрастание ЭМГ-активности *m. tibialis anterior* при переносе ноги в периоде маха, более медленное

достижение максимального пика ЭМГ *m. soleus*, а также почти двукратное снижение амплитуды ЭМГ *m. gastrocnemius medialis* во время выполнения отталкивания. При ходьбе с нагрузкой 38 и 16 % от массы тела в опорном периоде двойного шага зарегистрирована минимальная ЭМГ-активность *m. vastus lateralis* и *m. rectus femoris* при высокой амплитуде *m. biceps femoris caput longus* (см. рис. 3).

3. Возрастание амплитуды *m. biceps femoris caput longus* (разгибателя тазобедренного сустава) связано с тем, что при уменьшении весовой нагрузки основная работа совершается не в голеностопном и коленном суставах, а тазобедренном. Это означает, что моторный паттерн ходьбы в «невесомости» становится похожим на паттерн плавания [7].

4. Снижение гравитационной нагрузки на опорно-двигательный аппарат ОДА до величин, соответствующих 38 и 16 % массы тела, приводит к значительным изменениям кинематических характеристик ходьбы. Уменьшение угла в тазобедренном суставе и увеличение угла в голеностопном суставе во время отталкивания при измененной гравитации свидетельствует о неполном разгибании толчковой ноги и, следовательно, приводит к снижению эффективности отталкивания по сравнению с нормальной ходьбой при нагрузке, равной 100 % массы тела. Возможно, это является «приспособительной» перестройкой непривычной для человека ходьбы в условиях вывешивания и снижения гравитационной нагрузки. Увеличение угла в коленном суставе (т.е. уменьшение сгибания) при переносе ноги также является следствием перестройки «внешней» структуры локомоций (ходьбы) в условиях снижения гравитационной нагрузки. С этим же связано и увеличение сгибания в голеностопном суставе для обеспечения подъема стопы над опорной поверхностью. Подобные изменения кинематики голеностопного сустава регистрировались рядом авторов при обследовании космонавтов и астронавтов после длительных космических полетов [6] и в клинической практике [8].

Авторы выражают благодарность испытуемым, принявшим участие в данном исследовании, а также сотрудникам НИИ космической медицины ФНKC ФМБА России за помощь в проведении исследования.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 16-34-60070.

Список литературы

1. Витензон А.С., Скоблин А.А., Алексеенко И.Г. Исследование биомеханической и иннервационной структуры ходьбы у больных сколиозом II–III степени // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.И. Пирогова. 2007. № 1. С. 35–43.

Vitenzon A.S., Skoblin A.A., Alekseenko I.G. Study of biomechanic and innervation structure of walking in patients with II-III degree of scoliosis // Vestnik travmatologii i ortopedii imeni N.I. Priorova. 2007. № 1. P. 35–43.

2. Wibawa A.D., Verdonschot N., Halbertsma J.P.K. et al. Musculoskeletal modeling of human lower limb during normal walking, one-legged forward hopping and side jumping: Comparison of measured EMG and predicted muscle activity patterns // J. Biomech. 2016. V. 49. Is. 15. P. 3660–3666.

3. Шпаков А.В., Воронов А.В. Изучение влияния моделированной невесомости и лунной гравитации на биомеханические параметры ходьбы человека // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2016. Т. 102 № 10. С. 1253–1264.

Shpakov A.V., Voronov A.V. Study of influence of simulated weightlessness and lunar gravity to biomechanical parameters of human walking // Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal imeni I.M. Sechenova. 2016. V. 102 № 10. P. 1253–1264.

4. Birch I., Vernon W., Walker J., Young M. Terminology and forensic gait analysis // Sci. and Justice. 2015. № 55. P. 279–284.

5. Whittle M.W. Gait Analysis: An Introduction. Oxford, London. 2014.

6. Miller C.A., Peters B.T., Brady R.R. et al. Change in toe clearance during treadmill walking after long-duration spaceflight // Aviat. Space and Environ. Med. 2010. V. 81. № 10. P. 919–928.

7. Воронов А.В. Скоростно-силовые свойства мышц человека при спортивных локомоциях: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2004.

Voronov A.V. Speed-strength properties of human muscles in sporting locomotions: Autoreferat dissertatsii ... doctora biologicheskikh nauk. Moscow, 2004.

8. Alcock L., Galna B., Lord S., Rochester L. Characterisation of foot clearance during gait in people with early Parkinson's disease: Deficits associated with a dual task // J. Biomech. 2016. V. 49. Is. 13. P. 2763–2769.

Поступила 12.10.2017

PECULIARITIES OF HUMAN WALKING UNDER DIFFERENT LEVEL OF GRAVITATIONAL LOADING ON MUSCULOSKELETAL SYSTEM

Shpakov A.V., Voronov A.V.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 38–47

Fifteen men and nine women participated as volunteers the investigation. They performed a walking on treadmill at the pace of 90 steps/minute with different gravitational loading on the musculoskeletal system: 100 % of body weight, 38 % and 16 % of body weight, typical for of human walking on the surface of Earth, Mars and Moon. During walking the kinematic parameters, ground reaction force and EMG-activity of the leg muscles were recorded and analyzed. The change in the gravitational loading on musculoskeletal system was carried out by the method of vertical body suspension.

Key words: locomotion, video analysis of movements, vertical suspension, electromyography, the angles of the joints, ground reaction force, gravitational load.

УДК 612.766

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛОКОМОТОРНЫХ ТРЕНИРОВОК НА БОРТУ МЕЖДУНАРОДНОЙ КОСМИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ВЕЛИЧИН ОПОРНЫХ РЕАКЦИЙ

Фомина Е.В.^{1, 2, 3}, Савинкина А.О.¹, Лысова Н.Ю.¹

¹Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва

²Московский педагогический государственный университет

³Российский университет дружбы народов, Москва

E-mail: fomin-fomin@ya.ru

*В соответствии с концепцией о триггерной роли опорной афферентации в развитии гипогравитационного двигательного синдрома сопоставлена интенсивность стимуляции опорного входа в ходе космической миссии с глубиной послеполетных изменений в нейромышечной системе. В исследовании приняли участие 10 космонавтов. Оценка сохранности нейромышечного статуса космонавтов после космического полета проводилась на основе изучения электромиографического ответа *m. soleus* при ходьбе по жесткой опоре. Выполнен анализ относительного объема беговых тренировок и величин опорных реакций при активном и пассивном режимах работы бегущей дорожки БД-2 в условиях длительного космического полета. Выявлены значительные индивидуальные различия в величинах опорных реакций в зависимости от режима работы БД-2. Впервые показано, что применение физических тренировок во время космического полета с учетом наибольших индивидуальных величин опорных реакций способствовало максимальному сохранению нейромышечного статуса космонавтов. Преимущественное использование тренировок с меньшими величинами опорных реакций способствовало значительному повышению амплитуды электромиограммы *m. soleus* в тесте, выполнявшемся на 3-и и 10-е сутки после завершения космического полета.*

Ключевые слова: длительный космический полет, микрогравитация, опорные реакции, физическая работоспособность, нейромышечный статус, профилактика.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 48–52.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-48-52

В настоящее время ведется поиск предикторов эффективности средств и методов профилактики, нивелирующих негативные эффекты невесомости и обеспечивающих сохранение физической работоспособности человека после длительного космического полета (КП) [1–4]. Многолетние исследования нейромышечных нарушений в двигательной системе, возникающих после пребывания в условиях

сниженной гравитации и опорной разгрузки, позволили сформулировать концепцию о триггерной роли фактора снижения опорной афферентации в развитии гипогравитационного двигательного синдрома [5–9]. Данный синдром характеризуется атонией, атрофией, снижением выносливости и силовых способностей мышц [10].

В соответствии с предложенной И.Б. Козловской концепцией одним из физиологических механизмов предотвращения неблагоприятного влияния невесомости на мышечный аппарат может являться обеспечение необходимого уровня афферентного притока с рецепторов опоры [5–7]. Иначе говоря, эффективность профилактических мероприятий в двигательной системе определяется величиной опорных реакций, достигаемых членами экипажей на Международной космической станции (МКС) во время выполнения физических упражнений.

Основным средством в российской системе профилактики гипогравитационных нарушений являются локомоторные тренировки на бегущей дорожке БД-2 [10]. Локомоторные тренировки обеспечивают адекватную стимуляцию сенсорных входов и нагрузку на мышечную и сердечно-сосудистую системы, создавая при этом необходимость удержания позы в сочетании с ударными воздействиями на опорно-двигательный аппарат [3, 6, 11]. Эксперименты, проведенные в условиях реальной и моделируемой невесомости, показали, что локомоторная тренировка высокой интенсивности является наиболее эффективным средством профилактики негативного влияния микрогравитации [2, 8].

Согласно ранее полученным на МКС данным, наибольшие и сопоставимые с наземными значениями величины опорных реакций наблюдаются во время длительного КП только при выполнении беговых тренировок [1]. Одновременно была показана значительная зависимость величин развиваемых опорных реакций от индивидуальных особенностей стратегии локомоций космонавтов [12, 13]. Однако

изучение величин опорных реакций на борту МКС проводилось указанными авторами без связи эффективности применявшихся профилактических мероприятий с определяемым после полета уровнем физической работоспособности и нейромышечным статусом космонавта [1, 12–14]. Учитывая это обстоятельство, в данной работе проверялась гипотеза о связи послеполетных изменений физиологической стоимости ходьбы с индивидуальными величинами опорных реакций при выполнении локомоторных тренировок. Целью исследования явилось сопоставление интенсивности стимуляции опорного входа в ходе космической миссии с глубиной послеполетных изменений в нейромышечной системе космонавтов.

Методика

В исследовании проведен анализ послеполетных изменений амплитудных характеристик электромиограммы (ЭМГ) *m. soleus* при выполнении локомоций в зависимости от применяемых во время полета тренировок и индивидуальных особенностей величин опорных реакций. В эксперименте приняли участие 10 космонавтов (9 мужчин и 1 женщина в возрасте 45 ± 7 лет, массой 83 ± 8 кг при длительности космических миссий 170 ± 12 сут).

Для определения сохранности нейромышечного статуса космонавтов и эффективности применявшихся на МКС физических упражнений после завершения полета в рамках теста «Локомоции» исследовали амплитуду ЭМГ *m. soleus* при выполнении ходьбы. Тест, выполнявшийся за 60–30 сут до КП и на 3-и и 10-е сутки после его завершения, включал ходьбу по жесткой опоре с темпом 90 шагов/мин; ходьба выполнялась пятикратно по 2–4 двойных шага. ЭМГ регистрировалась с использованием электромиографа MegaWin ME 6000 (Mega Electronics Ltd, Финляндия) поверхностными одноканальными Ag/AgCl электродами диаметром 30 мм, располагавшимися вдоль мышечного брюшка посередине между моторной зоной и сухожилием. Анализировался прирост величины интегрированной амплитуды ЭМГ после КП по сравнению с фоновыми данными.

Для сопоставления физических тренировок, выполненных каждым космонавтом в ходе КП, из объема локомоторных тренировок были выбраны все участки бега при активном (моторизированном) и пассивном (немоторизированном) режимах перемещения полотна бегущей дорожки. Вычислялась дистанция (в метрах) и процент бега при каждом режиме работы БД-2.

Величины вертикальной составляющей опорных реакций измерялись на борту МКС с частотой опроса 100–120 Гц с помощью тензодатчиков регистрации давления (модель МСЗА-6, АМТИ, США),

установленных под полотном бегущей дорожки БД-2. Среди локомоторных тренировок, выполненных на БД-2 на протяжении всего КП, для каждого космонавта случайным образом были выбраны 30 тренировочных сессий. В дальнейший анализ вошли выделенные в данных сессиях участки бега при активном и пассивном режимах передвижения полотна бегущей дорожки. Первичная обработка данных осуществлялась с использованием специально разработанного программного обеспечения. Каждая тренировка автоматически разбивалась на участки бега с постоянными скоростью и величиной осевой нагрузки отдельно для активного и пассивного режимов работы бегущей дорожки. В начале каждого участка на основе поиска локальных экстремумов выбирался непрерывный сегмент записи, состоящий из 10 пар шагов. В качестве показателя максимального значения величины вертикальной составляющей опорных реакций рассчитывалось среднее арифметическое 20 максимумов опорных реакций. В среднем для каждого космонавта было проанализировано 222 ± 26 сегментов записи (160 ± 40 при активном режиме, 62 ± 35 при пассивном режиме передвижения полотна БД-2) с величиной осевой нагрузки $53,20 \pm 7,35$ кг и скоростью бега $9,56 \pm 2,88$.

Статистическую обработку данных выполняли в программе SPSS 21.0. Данные были проанализированы количественно и качественно с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни, коэффициента корреляции Спирмена и методов описательной статистики.

Исследование было одобрено Комиссией по биоэтической этике при ГНЦ РФ – ИМБП РАН. Все участники эксперимента в соответствии с Хельсинкской декларацией подписали Информированное согласие на участие в эксперименте.

Результаты и обсуждение

Показано, что разница между активным и пассивным режимами по величинам опорных реакций у отдельных космонавтов варьировала от $-7,75$ до $12,84$ кг и в среднем составила $0,29$ кг (таблица). Это свидетельствовало о значительных индивидуальных различиях в величинах опорных реакций при данных режимах работы бегущей дорожки и отсутствии общей тенденции направления изменения величин опорных реакций при переходе от активного режима работы БД-2 к пассивному.

Увеличение максимальной амплитуды ЭМГ *m. soleus* на 3-и послеполетные сутки было тем меньше, чем больше у космонавта была разница между опорными реакциями в активном и пассивном режимах ($p = 0,019$). За весь период КП в активном режиме передвижения полотна БД-2 космонавты в среднем работали $85,25 \pm 9,33$ % от

Таблица

Показатели послеполетных изменений амплитуды электромиограммы *m. soleus*, доли пассивного и активного режима в объеме беговых тренировок и индивидуальных особенностей максимальных величин опорных реакций

Космонавты	Разница по величине максимальных опорных реакций между активным и пассивным режимами (кг)	Объем бега за весь полет при различных режимах работы БД-2 (%)		Изменение максимальной амплитуды ЭМГ <i>m. soleus</i> (%от фона)	
		Пассивный	Активный	R + 3	R + 10
A	12,84 \$ ***	4,00 @	96,00 \$	-10,07 @	-13,07 @
B	0,59	15,96	84,04	-7,24 @	7,24
C	-0,16 #	29,55 \$	70,45 @	2,27	-11,36 @
D	3,12 ***	22,05	77,95	4,76	4,76
E	6,99 \$ *	10,30	89,70	7,82	14,53
F	-2,15 **	5,95	94,05	23,11	25,76 \$
G	1,27 ***	17,06	82,94	24,96	16,36
H	-7,75 @ ***	19,20	80,80	29,01	3,85
I	-6,40 @ ***	22,96	77,04	29,05	21,62
J	-5,47 *	0,44 @	99,56 \$	46,04 \$	28,71 \$
x_{cp}	0,29	14,75	85,25	14,97	9,84
σ	6,33	9,33	9,33	18,15	14,36
$x_{cp} - \sigma$	-6,04	5,42	75,92	-3,17	-4,52
$x_{cp} + \sigma$	6,61	24,08	94,58	33,12	24,20

Примечание. \$ – значение выше $x_{cp} + \sigma$; @ – значение ниже $x_{cp} - \sigma$; * (**, ***) – различие между активным и пассивным режимами по величине опорных реакций значимо на уровне $p \leq 0,05$ ($p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$); # – отрицательные значения разницы свидетельствуют о больших величинах опорных реакций в пассивном режиме по сравнению с активным.

общего объема беговых тренировок, а в пассивном режиме – $14,75 \pm 9,33$ % (см. табл.). Значительная часть объема локомоторных тренировок выполнялась ими в активном режиме работы БД-2, и соответственно наибольшая сохранность нейромышечного статуса наблюдалась у космонавтов, чья индивидуальная особенностью являлась относительно бóльшая величина опорных реакций при беге в активном режиме.

У космонавта А как на 3-и (-10,07 % от фона), так и на 10-е (-13,07 % от фона) сутки после завершения КП изменения максимальной амплитуды ЭМГ *m. soleus* были наименьшими. Это свидетельствовало об относительном снижении количества двигательных единиц *m. soleus*, включавшихся у него в работу при выполнении ходьбы. Более высокие значения опорных реакций у космонавта А наблюдались при активном режиме передвижения полотна бегущей дорожки ($p \leq 0,001$). При этом космонавт А выполнил больший процент беговых тренировок в активном режиме (96,00 %), чем другие космонавты. Таким образом, тренировки, выполняемые космонавтом А на протяжении всей космической миссии, соответствовали преимущественному использованию режима работы БД-2, при котором он имел наибольшие величины опорных реакций.

Следующие по величине показатели изменения максимальной амплитуды ЭМГ *m. soleus* наблюдали для космонавтов В и С (-7,24 и 2,27 % от фона на 3-и сутки после КП, 7,24 и -11,36 % от фона на 10-е сутки соответственно). Отличительной особенностью данных космонавтов явилось отсутствие различий по величинам опорных реакций при активном и пассивном режимах работы БД-2. При этом соотношение активного и пассивного режимов в тренировках космонавта В соответствовало средним значениям в группе, а космонавт С чаще других испытуемых выполнял тренировки в пассивном режиме работы бегущей дорожки. Для данных космонавтов и высокий, и средний процент тренировок в пассивном режиме позволил сохранить нейромышечный статус на предполетном уровне.

Наибольшие изменения амплитуды ЭМГ *m. soleus* были выявлены для испытуемых F, G, H, I и J и составили от 23,11 до 46,04 % от фона на 3-и послеполетные сутки с восстановлением до 3,85–28,71 % от фона к 10-м суткам. Для космонавтов F, H, I и J были зарегистрированы более высокие значения опорных реакций при пассивном режиме работы БД-2 ($p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$), для G – при активном режиме ($p \leq 0,001$). Повышение амплитуды ЭМГ *m. soleus* от 23,11 % до 29,05 % было

зарегистрировано для космонавтов F, G, H и I, выполнявших от 5,95 до 22,96 % беговых тренировок при пассивном режиме работы БД-2, что соответствовало средним значениям в группе. Наибольшее повышение амплитуды ЭМГ *m. soleus* (46,04 % от фона на 3-и сутки, 28,71 % – на 10-е сутки) было выявлено для космонавта J, применявшего пассивный режим только в 0,44 % тренировок и имевшего более высокие опорные реакции при данном режиме работы бегущей дорожки ($p \leq 0,05$).

По результатам проведенного исследования можно предположить, что преимущественное применение во время КП физических тренировок, сопровождающихся наибольшими величинами опорных реакций, способствовало сохранению нейромышечного статуса космонавтов. Напротив, использование тренировок с меньшими величинами опорных реакций приводило к значительному повышению амплитуды ЭМГ *m. soleus*, что было выражено и на 3-и, и на 10-е сутки после КП.

В ранее проведенных исследованиях выполнялся анализ величин опорных реакций в условиях нормальной гравитации [16, 17], в модельных экспериментах [11, 15, 18–21] и в условиях микрогравитации [1, 12–14]. В условиях невесомости была показана зависимость максимальных значений вертикальной составляющей опорных реакций от скорости локомоций [11, 12, 14], величины осевой нагрузки [13, 14], вида локомоций [12, 13], режима работы бегущей дорожки [12, 13] и индивидуальных особенностей испытуемых [12, 13]. Однако сопоставление индивидуальных особенностей физических тренировок и величин опорных реакций при активном и пассивном режимах работы бегущей дорожки для условий длительных космических миссий с послеполетными изменениями электромиографической стоимости ходьбы выполнено впервые.

Полученные данные подтверждают концепцию о триггерной роли опорной афферентации в развитии гипогравитационных нарушений [5–7], дополняя результаты исследований, выполненных в модельных экспериментах, где стимуляция опорных зон стоп способствовала нивелированию негативного влияния опорной разгрузки на двигательную систему [6]. В частности, показано, что эффективность тренировок на борту МКС в сохранении нейромышечного статуса космонавтов опосредована индивидуальными различиями величин опорных реакций.

Выводы

1. Выявлены индивидуальные особенности величин опорных реакций во время выполнения физических тренировок при активном и пассивном режимах работы бегущей дорожки в условиях длительных КП.

2. Показана зависимость послеполетных изменений в нейромышечной системе космонавтов от

индивидуальных величин опорных реакций во время локомоторных тренировок в полете и соответственно интенсивности стимуляции опорного входа.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 17-04-01826.

Список литературы

1. Cavanagh P.R., Genc K.O., Gopalakrishnan R. et al. Foot forces during typical days on the International space station // J. Biomech. 2010. V. 43. P. 2182–2188.
2. Fitts R.H., Trappe S.W., Costill D.L. et al. Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres // J. Physiol. 2010. 588 (Pt 18). P. 3567–3592.
3. Fomina E.V., Lysova N.Y., Chernova M.V. et al. Comparative analysis of preventive efficacy of different modes of locomotor training in space flight // Human Physiol. 2016. V. 42. № 5. P. 539–545.
4. Fomina E.V., Uskov K.V., Rykova M.P. et al. Adaptive immunity as an indicator of optimum physical loads during 520-day isolation // Ibid. 2017. V. 43. № 3. P. 301–311.
5. Kozlovskaya I.B., Aslanova I.F., Kirenskaya A.V. The effects of support unloading on characteristics of motor control system activity // Motor Control. N.Y.; London, 1986. P. 149–153.
6. Kozlovskaya I.B., Sayenko I.V., Sayenko D.G. et al. Role of support afferentation in control of the tonic muscle activity // Acta Astronaut. 2007. V. 60. P. 285–294.
7. Григорьев А.И., Козловская И.Б., Шенкман Б.С. Роль опорной афферентации в организации тонической мышечной системы // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2004. Т. 90. № 5. С. 508–521.
8. Grigoriev A.I., Kozlovskaya I.B., Shenkman B.S. The role of support afferentation in organization of tonic muscular system // Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova. 2004. V. 90. № 5. P. 508–521.
9. Fitts R.H., Colloton P.A., Trappe S.W. et al. Effects of prolonged space flight on human skeletal muscle enzyme and substrate profiles // J. Applied Physiol. 2013. V. 115. № 5. P. 667–679.
10. Yarmanova E.N., Kozlovskaya I.B., Khimoroda N.N. et al. Evolution of Russian microgravity countermeasures // Aerospace Med. and Human Perform. 2015. V. 86. № 12. P. A32–A37.
11. Козловская И.Б. Гравитация и позно-тоническая двигательная система // Авиакосм. и экол. мед. 2017. Т. 51. № 3. С. 5–21.
12. Kozlovskaya I.B. Gravity and postural-tonic motor system // Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina. 2017. V. 51. № 3. P. 5–21.
13. DeWitt J., Schaffner G., Bentley J. et al. Biomechanical evaluation of locomotion on the Russian BD-1 treadmill in a weightless environment (KC-135). [Electronic resource]. Houston TX: National Aeronautics and Space Administration, Lyndon B. Johnson Space Center. 2006 Jan.

NASA Technical Memorandum NASA/TM-2006-213718. URL: http://ston.jsc.nasa.gov/collections/trs/_techrep/TM-2006-213718.pdf.

12. Фомина Е.В., Савинкина А.О., Чумаченко В.В. Стратегии локомоций и интенсивность опорных реакций как один из подходов к индивидуализации профилактики негативного воздействия невесомости // *Авиакосм. и экол. мед.* 2016. Т. 50. № 6. С. 31–36.

Fomina E.V., Savinkina A.O., Chumachenko V.V. Locomotion strategy and ground reaction forces intensity as one of approach to weightlessness countermeasure individualization // *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 2016. V. 50. № 6. P. 31–36.

13. Fomina E.V., Savinkina A.O., Yarmanova E.N. Ground reaction force values in cosmonauts during locomotor exercises on board the international space station // *Human Physiol.* 2017. V. 43. V. 5. P. 542–548.

14. De Witt J.K., Ploutz-Snyder L.L. Ground reaction forces during treadmill running in microgravity // *J. Biomech.* 2014. V. 47. № 10. P. 2339–2347.

15. De Witt J.K., Hagan R.D., Cromwell R.L. The effect of increasing inertia upon vertical ground reaction forces and temporal kinematics during locomotion // *J. Exp. Biol.* 2008. № 211. P. 1087–1092.

16. Phan X., Grisbrook T.L., Wernli K. et al. Running quietly reduces ground reaction force and vertical loading rate and alters foot strike technique // *J. Sports Sci.* 2017. V. 35. № 16. P. 1636–1642.

17. Brozgol M., Arbiv M., Mirelman A. Vertical ground reaction force during standing and walking: Are they related to bone mineral density left-right asymmetries? // *Gait & Posture*. 2017. V. 54. P. 174–177.

18. De Witt J.K., Perusek G.P., Lewandowski B.E. et al. Locomotion in simulated and real microgravity: horizontal suspension vs. parabolic flight // *Aviat. Space Environ. Med.* 2010. V. 81. № 12. P. 1092–1099.

19. Davis B.L., Cavanagh P.R., Sommer H.J. Ground reaction forces during locomotion in simulated microgravity // *Ibid.* 1996. V. 67. P. 235–242.

20. McCrory J.L., Derr J.A., Cavanagh P.R. Locomotion in simulated zero gravity: Ground reaction forces // *Ibid.* 2004. V. 75. P. 203–210.

21. Genc K.O., Mandes V.E., Cavanagh P.R. Gravity replacement during running in simulated microgravity // *Ibid.* 2006. V. 77. P. 1117–1124.

Поступила 27.10.2017

THE EFFICIENCY OF LOCOMOTOR TRAINING ONBOARD THE INTERNATIONAL SPACE STATION DEPENDING ON GROUND REACTION FORCES INDIVIDUAL FEATURES

Fomina E.V., Savinkina A.O., Lysova N.Yu.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 48–52

According to the concept about the support afferentation trigger role in the development of hypogravity disorders in the motor system, we have made a study in order to compare the reference input stimulation intensity during a space mission with post-flight changes in the neuromuscular system. The study involved 10 cosmonauts. Evaluation of cosmonauts' neuromuscular safety after space flight was carried out on the basis of m. soleus electromyography response when walking on hard support. We analyzed both relative volume of physical training and ground reaction forces magnitude in active and passive treadmill modes in conditions of prolonged space flight. We have revealed significant individual differences in ground reaction forces values depending on the BD-2 mode. It was shown that the use of exercise during space flight with the highest individual ground reaction forces values contributed to the preservation of the cosmonauts' neuromuscular status. The predominant use of exercises with smaller ground reaction forces values contributed to a significant increase in the m. soleus EMG amplitude in the test performed on both 3rd and 10th days after completion of space flight.

Keywords: long-duration space flight, microgravity, ground reaction forces, physical performance, neuromuscular status, countermeasure.

УДК 616.858-008.6:531.5.091-022.213

ВЛИЯНИЕ «СУХОЙ» ИММЕРСИИ КАК АНАЛОГА МИКРОГРАВИТАЦИИ НА НЕВРОЛОГИЧЕСКИЕ СИМПТОМЫ ПРИ ПАРКИНСОНИЗМЕ

Мейгал А.Ю.¹, Герасимова-Мейгал Л.И.¹, Саенко И.В.², Субботина Н.С.¹, Третьякова О.Г.¹, Черникова Л.А.³

¹Петрозаводский государственный университет

²Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

³Научный центр неврологии, Москва

E-mail: meigal@petrsu.ru

Группа больных болезнью Паркинсона (n = 11) и сосудистым паркинсонизмом (n = 5) прошла курс «сухой» иммерсии (7 процедур по 45 мин, 2 раза в неделю, всего 315 мин). Установлено, что у больных после процедур сумма баллов по части I шкалы вегетативных расстройств Вейна снизилась за время курса на 45 %, части II – на 23 %, улучшилось время реакции выбора (с 560 до 455 мс, p = 0,08), однако время простой зрительно-моторной реакции и число ударов кистью в теппинг-тесте не изменилось. Наиболее выраженное положительное действие «сухой» иммерсии приходилось на окончание курса и продолжалось 2 нед после его проведения.

Ключевые слова: микрогравитация, сухая иммерсия, болезнь Паркинсона, моторные и вегетативные расстройства.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 53–59.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-53-59

Болезнь Паркинсона (БП) остается в центре внимания современной неврологии вследствие высокой заболеваемости (до 1 % среди лиц старше 60 лет) [1], заметного ухудшения качества жизни больных и существенного экономического и социального бремени, которое накладывает БП на больного, его семью и государство [2]. Больные БП раньше обычного выходят на пенсию и часто теряют профессию, что неизбежно снижает их персональный жизненный капитал. Спонтанные падения с возможной травмой головы и шейки бедренной кости, депрессия, когнитивные и вегетативные нарушения могут привести к инвалидности [3, 4]. В настоящее время больным БП предлагается вполне эффективное симптоматическое лечение на основе восстановления уровня дофамина в черной субстанции мозга, хотя к фармакотерапии часто наступает привыкание и возникают побочные эффекты [4, 5]. Нетерапевтические методы лечения БП, например, стимуляция мозга магнитным полем [6] и хирургическое лечение [7], эффективны, но требуют дорогостоящего оборудования или технически сложны.

Хроническое течение БП и длительный доклинический период (4–6 лет) стимулируют поиск реабилитационных методик, которые позволили бы снизить фармакологическую нагрузку на больного и замедлить течение болезни. В последнее десятилетие, наряду с различными курсами физических упражнений, были предложены методики, основанные на тренировке с помощью роботов-ассистентов [8], виртуальной реальности [9]. Практически все эти реабилитационные методики дают положительный результат, а их многообразие, вероятно, основано на разнообразии клинической симптоматики БП.

Клинически БП характеризуется тремором покоя, усиленным мышечным тонусом (ригидностью) и замедленностью движений (брадикинезией). В то же время известно, что как реальная, так и моделируемая микрогравитация (μG) вызывает скорое снижение мышечного тонуса человека [10]. Для создания моделируемой μG используются разные методики: «сухая» иммерсия; антиортостатическая гипокинезия; параболические полеты на самолете; машины свободного падения; разгрузка (вывешивание). Среди названных аналогов μG «сухую» иммерсию можно считать наилучшим методом, поскольку она вызывает быстрый и сильный эффект, может применяться достаточно долго (недели, месяцы) и этот метод не так дорог, как, например, параболический полет или машина свободного падения. Высокая эффективность «сухой» иммерсии достигается за счет следующих физических факторов: безопорность; гипокинезия; равномерная гидростатическая компрессия [11, 12].

В нескольких недавних работах показано, что функциональность двигательной системы больных БП и здоровых пожилых людей существенно возрастает после курса физической акватерапии, которая в разных модификациях представляет собой аквааэробику [13, 14], а также после снижения фактического веса путем вывешивания испытуемого [15]. Также для БП характерен целый спектр нарушений автономной нервной системы, что проявляется в

Таблица

Критерии невключения испытуемых в курс «сухой» иммерсии

Повод невключения	Критерии невключения
Болезнь Паркинсона и сосудистый паркинсонизм	Другие неврологические расстройства, которые могли бы повлиять на симптомы болезни Паркинсона. Повреждение спинного мозга. Метаболические нарушения, включая гипертиреоз и диабет. Острые инфекции.
«Сухая» иммерсия	Эпилепсия. Психические расстройства. Остеопороз. Назначение мышечных релаксантов. Церебральный паралич. Гиповолемия. Миома матки и другие онкологические проблемы. Мерцательная аритмия. Кровотечения любой этиологии и нарушения свертывания крови. Болезни легких в острой стадии. Инфаркт миокарда.

расстройствах пищеварения (запоры, слюнотечение), мочеиспускания, терморегуляции, половых функций [5]. «Сухая» иммерсия оказывает сильное влияние на артериальное давление, частоту сердечных сокращений, водно-солевой баланс [11]. Это позволяет предположить, что «сухая» иммерсия может оказать влияние и на вегетативную симптоматику при БП.

С учетом вышеизложенного моделируемая μG в виде «сухой» иммерсии может оказать реабилитационный эффект на некоторые моторные и немоторные проявления БП: снизить патологически усиленный мышечный тонус, уменьшить выраженность депрессии и расстройств автономных функций.

Методика

Критерием включения испытуемых в исследование было наличие БП или сосудистого паркинсонизма и отсутствие других патологий, имитирующих паркинсонизм. Критерии невключения в основном касались процедуры «сухой» иммерсии (таблица). В больнице скорой медицинской помощи и Республиканской больнице им. Баранова (г. Петрозаводск, Республика Карелия, РФ) были отобраны 23 пациента с паркинсонизмом. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом при Министерстве здравоохранения Республики Карелия (№ 31, 18.12.2014). Перед началом курса «сухой» иммерсии все пациенты прошли неврологическое обследование и подписали Информированное согласие. Семь пациентов были исключены из исследования после тестовой или после первой действительной иммерсии в связи с нестабильным артериальным давлением в ходе погружения или увеличением артериального давления в ходе или после погружения. Из 16 оставшихся

в исследовании пациентов (11 мужчин, 5 женщин, возраст – 67 (60–69,5) лет), у 11 неврологически была диагностирована БП, у 5 – сосудистый паркинсонизм. Стадия по Хену и Яру – 1–3, акинетико-ригидная форма у 4 больных, дрожательная – у 12 больных.

Для введения больных в состояние моделируемой μG применили медицинский аппарат искусственной невесомости «МЕДСИМ» (Центр авиакосмической медицины и технологий, ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва), который представляет собой ванну, заполненную 2 м³ воды при заданной температуре 32 °С, с автоматической аэрацией и фильтрацией. Ванна снабжена подвижной платформой (ложементом), которая в верхнем положении перед погружением позволяет испытуемому удобно расположиться лежа. Поверхность ложементов покрыта тонким водонепроницаемым материалом с большой площадью для создания складок (12 м²). Испытуемого заворачивали в индивидуальную простыню для комфортного контакта с пленкой. Затем платформа при помощи электрического компрессора опускалась в нижнее положение, а испытуемый оставался погруженным в воду на водонепроницаемой пленке. Далее 2 исследователя погружали испытуемого в воду еще глубже, чтобы над его телом сформировалось пространство из складок пленки, заполненное водой. Голова и верхняя часть груди испытуемого оставались на уровне воды и свободны от пленки. Кисти рук располагались на верхней части живота или вдоль туловища. Более подробно процедура «сухой» иммерсии представлена в работе [11].

Перед курсом иммерсий все больные проходили тестовое 15-минутное погружение для выявления особенностей реакции, изменения артериального давления (АД) и привыкания к самой процедуре.

Процедура «сухой» иммерсии всегда проводилась в состоянии on-medication. Для синхронизации условий антипаркинсонической терапии и «сухой» иммерсии препараты принимались в 7.00, а само исследование начиналось в 9.00. Перед процедурой иммерсии больные выпивали 200 мл пресной воды и посещали туалет, поскольку «сухая» иммерсия оказывает сильный диуретический эффект [13]. Испытуемые адаптировались к лабораторным условиям в течение 15–20 мин в положении лежа на спине, на ложементе, при этом проводилось наложение электродов для электрокардиографии и измерение АД при помощи аппарата UA-767 (A&D Company Ltd., Japan). Если АД не превышало 140/80 мм рт. ст., иммерсия одобрялась. После всех подготовительных процедур, погружение обычно начиналось в 9.20–9.30. В течение всего времени иммерсии проводился мониторинг ЭКГ (Поли-Спектр-ВНС, ООО «Нейрософт», Иваново, РФ) во II стандартном отведении для контроля ритма сердечных сокращений и выявления экстрасистол. Измеряли АД на 20, 35 и 45-й минуте процедуры. Курс «сухой» иммерсии включал 7 однократных иммерсий (45 мин каждая, 2 раза в нед, всего 5 нед). В сумме, длительность воздействия микрогравитации за время курса «сухой» иммерсии составила 315 мин (5¼ ч). Испытуемые имели возможность прекратить иммерсию в любой момент. Также, иммерсия могла быть закончена раньше при быстром изменении АД (в сторону увеличения и уменьшения). В комнате, где проходила процедура иммерсии, всегда находились 2–3 исследователя, включая врача-невролога.

Для оценки клинического состояния испытуемых использовали шкалу часть II (UPDRS-II, повседневная активность) и III (UPDRS-III, обследование двигательной функции) международной шкалы UPDRS (Unified Parkinson's disease rating scale). Статус автономной нервной системы оценивали по части I (11 пунктов, оцениваемых испытуемым) и II (13 пунктов, оцениваемых неврологом) шкалы Вейна [16]. Внутри шкалы Вейна оценивали динамику отдельных пунктов во время исследования. Названные шкалы применялись до курса «сухой» иммерсии (Pre), после 4-й и 7-й процедуры (In4, In7) на следующий после иммерсии день, а также спустя 2 нед (Post14) и 2 мес (Post60) после курса.

Психофизиологическое состояние испытуемых оценивалось при помощи прибора «Психотест-НС» (ООО «Нейрософт», Иваново, РФ). Использованы методики: простая зрительно-моторная (ПЗМР, мс), реакция выбора (РВ, мс), тест на помехоустойчивость (ПУ, мс) и теппинг-тест (ТТ, максимальное количество ударов электронным карандашом по столу за 30 с) в те же сроки исследования, за исключением – после 4-й иммерсии. Испытуемые последовательно выполняли ознакомительную попытку исполнения задания (половина предъявлений), затем

2 действительные попытки, разделенные паузой в 2 мин для отдыха. Для анализа брали результаты лучшей попытки.

Для анализа полученных данных использовали статистическую программу Statgraphics 15.0 Centurion (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, USA). Применяли метод множественных сравнений параметров во всех точках исследования (Н-тест Крускал – Уоллеса) и метод попарно связанных сравнений (критерий Signed Rank Test) для оценки различий между состоянием «до курса» и последующими состояниями.

Результаты и обсуждение

Гемодинамические параметры

Все испытуемые оценили «сухую» иммерсию как новое, особенное и в общем приятное ощущение. Четверо испытуемых засыпали к 15-й минуте иммерсии в каждой процедуре, 5 испытуемых периодически дремали во время процедуры. Систолическое артериальное давление в начале первой иммерсии составило 124 (112; 131) мм рт. ст., к окончанию – 115 (103; 134, 25–75 %) мм рт. ст. ($p > 0,05$). Диастолическое артериальное давление (ДАД) снижалось с 75 (72; 79) до 69 (64; 75) мм рт. ст. ($p < 0,05$), а частота сердечных сокращений (ЧСС) – с 71 (62; 76) до 62 (58; 68) ударов в минуту ($p < 0,01$) к окончанию первой иммерсии. Аналогичная динамика была характерна и во время 7-й иммерсии.

Состояние двигательной сферы

по данным клинических шкалы UPDRS-III

Для шкалы UPDRS-III отмечено статистически значимое снижение с 30 (23,5; 36; $p < 0,05$) баллов в точке «до начала курса» до 25 (17,5; 31,5) баллов спустя 2 нед после курса (примерно на 20 %). После 4-й и 7-й иммерсий снижение было незначимым – до 27,5–28 баллов ($p > 0,05$). Два месяца спустя после курса иммерсии сумма баллов UPDRS-III возвращалась к исходному состоянию.

Состояние автономной нервной системы

испытуемых по данным шкалы вегетативных дисфункций Вейна

Наиболее частыми симптомами по шкале вегетативных дисфункций Вейна, которые встречались у большинства испытуемых, были следующие: повышенная утомляемость (пункт 10, часть I, 81,3 % испытуемых), нарушения сна (11/I, 68,8 %), ухудшение самочувствия при смене погоды (5/II, 68,8 %), плохая переносимость холода, жары, духоты (6/II, 50 %). У 43,7 % испытуемых встречались покраснение лица при волнении (1/I), онемение или похолодание кистей и стоп (2/I), нарушение функции желудочно-кишечного тракта (7/I). Чуть менее часто (у 37,5 % испытуемых) встречались жалобы на

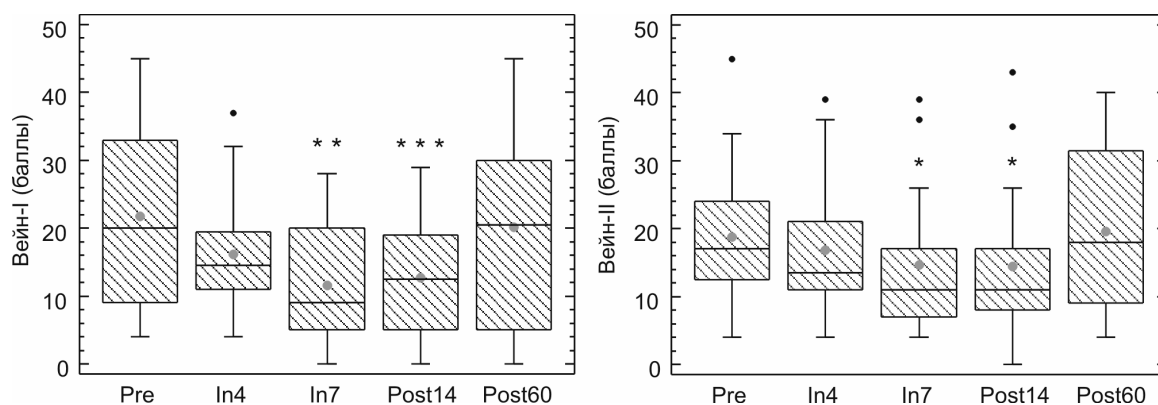


Рис. 1. Количество симптомов по части I (Вейн-I) и II (Вейн-II) шкалы Вейна до курса «сухой» иммерсии (Pre), после 4-й (In4) и 7-й (In7) иммерсий и через 2 нед (Post14) и 2 мес (Post60) после окончания курса.

Здесь и на рис. 2: столбики с косой штриховкой – значения суммы баллов (25–75 %), горизонтальная линия – медиана, серые кружки внутри столбиков – средние значения, черные кружки – выпадающие значения, вертикальные линии – стандартное отклонение ($\pm 1SD$).

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ по отношению к состоянию Pre

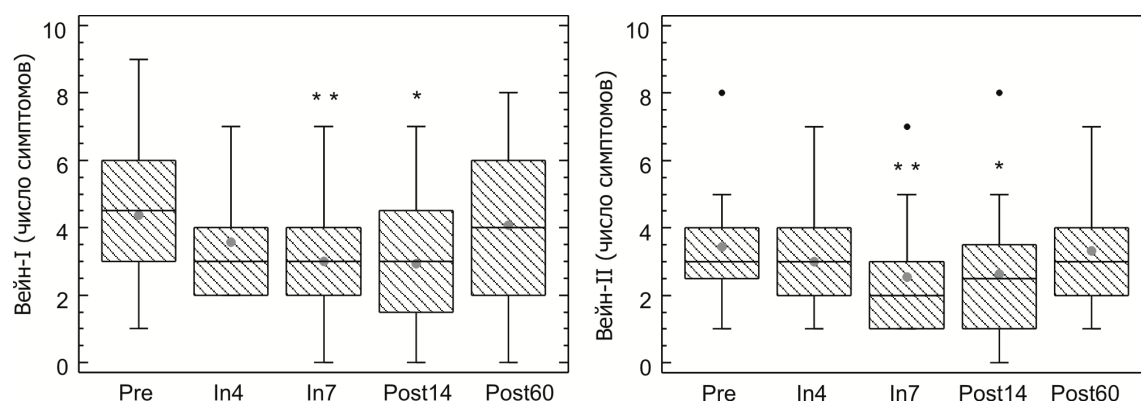


Рис. 2. Сумма баллов по части I (Вейн-I) и II (Вейн-II) шкалы Вейна до курса «сухой» иммерсии (Pre), после 4-й (In4) и 7-й (In7) иммерсий и через 2 нед (Post14) и 2 мес (Post60) после окончания курса.

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ по отношению к состоянию Pre

нехватку воздуха (6/I), а также изменение окраски кожи (1/II), потливость (3/II), повышенная тревожность и раздражимость (12/II), повышенная возбудимость нервно-мышечной системы (13/II). Все остальные симптомы встречались менее чем у 25 % испытуемых.

У каждого испытуемого наблюдалась уникальная комбинация симптомов до курса иммерсии и столь же уникальная реакция на этот курс. Практически все симптомы имели тенденцию к снижению своей частоты во время курса иммерсии, однако ни один из них не уменьшился статистически значимо, так как у разных испытуемых в ходе курса исчезали разные симптомы. Только взятые в виде суммы баллов по шкале Вейна, как в первой, так и второй ее части, эти изменения становились статистически значимыми для всей группы испытуемых. Сумма баллов по первой части шкалы Вейна (Вейн-I)

составила до курса иммерсии 20 (14,5; 33), далее статистически значимо снижалась до 15,5 (12; 20) после 4-й иммерсии и до 11 (8; 20) после 7-й иммерсии (рис. 1). В течение 2 недель после курса сумма баллов по шкале Вейна-I оставалась сниженной до 13,5 (6; 19), но спустя 2 месяца после курса иммерсии практически возвращалась к исходным значениям – 20,5 (7,5; 30) (рис. 2). Аналогичная динамика была характерна и для второй части шкалы Вейна (часть II) (см. рис. 2).

Если учитывать только наличие симптомов, а не их вес в баллах, также наблюдалось снижение их количества на одного испытуемого – с 4 до 3 в первой части шкалы и с 3 до 2 – во второй части шкалы Вейна (см. рис. 1). Таким образом, всего за курс «сухой» иммерсии испытуемые утрачивали в среднем 2 симптома, которые спустя 2 мес после курса появлялись снова.

Физиологическая хронометрия

Время ПЗМР у испытуемых до курса «сухой» иммерсии составило 320 (290; 340) мс и далее в течение исследования значимо не изменялось, хотя прослеживалась тенденция к его снижению после 7-й иммерсии и в течение 2 нед после курса иммерсии. Аналогично время теста на помехоустойчивость варьировало вокруг 350 мс со статистически незначимой тенденцией снижению на 2-й неделе после курса. Время РВ снизилось с начальных 560 (415; 760) мс до 455 мс ($p = 0,075$) спустя 2 нед после курса. По данным теппинг-теста число движений кистью за 30 с было стабильным и варьировало вокруг значения 190 в течение курса «сухой» иммерсии и после него. Соответственно частота движений составила в среднем около 6 Гц.

Таким образом, программа из 7 иммерсионных сессий приводила к заметному уменьшению выраженности некоторых симптомов паркинсонизма. В частности, по окончании программы «сухой» иммерсии сумма баллов UPDRS-III снизилась с 30 до 25 (примерно на 16 %), сумма баллов части I шкалы Вейна – с 20 до 11 (на 45 %), части II – с 18 до 14 (на 25 %), времени реакции выбора – с 550 до 450 мс. Эффект оставался выраженным в течение 2 нед после окончания курса «сухой» иммерсии, но к концу 2-го месяца после курса все параметры возвращались к исходному уровню. Время ПЗМР и количество ударов при теппинг-тесте практически не отреагировали на курс «сухой» иммерсии.

Похожая динамика была получена в исследовании [14] с применением 7 сеансов акватерапии. В частности, сумма баллов UPDRS-III снизилась с 20 до 14 (примерно на 30 %) за курс акватерапии и через 6 мес вернулась к исходному значению. Возможно, такое сходство результатов связано с похожим физическим действием «сухой» и обычной иммерсии, а также практически идентичным протоколом программы иммерсий. Поскольку шкала UPDRS-III основана на оценке симптомов, связанных с основными моторными симптомами (тремор, ригидность, бради-/акинезия), можно сделать вывод, что курс «сухой» иммерсии в соответствии с рабочей гипотезой действительно оказал благоприятное действие на эти симптомы. Вместе с тем детализация специфичности этого действия отдельно для тремора, ригидности и бради-/акинезии требует инструментальных методов исследования.

Известно, что в условиях реальной невесомости физиологический тремор на 3-й день космического полета модифицировался в сторону уменьшения частоты и амплитуды вследствие вероятной смены сенсорного обеспечения движения с мышечных на суставные рецепторы [17]. Однако эти данные трудно сопоставить с данным исследованием, так как: 1) условия «сухой» иммерсии и реальной микрогравитации нельзя считать идентичными; 2) иммерсия

в данном исследовании длилась всего 45 мин; 3) тремор оценивался в условиях земной гравитации. Что касается мышечной ригидности, то, как известно, ее причиной является усиление рефлекса на растяжение – важного звена в регуляции мышечного тонуса [18]. При переходе в состояние микрогравитации происходит быстрая дезактивация системы контроля мышечного тонуса. Это связано с резким снижением активности опорного афферентного входа, специально ориентированного на восприятие и анализ гравитационных нагрузок, что, в свою очередь, приводит к подавлению тонической активности мышечных волокон и неизменно сопровождается мышечной атонией. Чем больше процент тонических волокон в отдельно взятой мышце, тем выше коэффициент снижения мышечного тонуса.

Время простой зрительно-моторной реакции (~320 мс), теста на помехоустойчивость (~350 мс) и максимальный ритм движений кисти практически не изменились за курс «сухой» иммерсии, тогда как реакция выбора, требующая включения механизма принятия решения, продемонстрировала тенденцию к уменьшению с 550 до 450 мс после курса «сухой» иммерсии. Эти факты предполагают, что положительный эффект микрогравитации у больных паркинсонизмом реализуется скорее в когнитивно-волевой сфере, чем в сфере организации движения.

Одно из наиболее заметных действий на организм больных паркинсонизмом «сухая» иммерсия в данном исследовании оказала на симптомы расстройства автономной нервной системы. В частности, сумма баллов первой части шкалы оценки вегетативных функций Вейна, в которой больные сами характеризуют свое состояние, снизилась практически вдвое в результате курса иммерсии. При норме < 15 баллов снижение составило в среднем с 20 до 11 баллов, причем из 12 больных, у которых исходное значение было выше 15 баллов, у 7 (более половины) количество баллов в ходе курса «сухой» иммерсии становилось ниже 15 баллов, что позволяло констатировать временную нормализацию их вегетативного статуса. Сумма баллов 2-й части этой шкалы, в которой состояние больного оценивает невролог, также значимо снизилась, хотя и в меньшей степени (в среднем с 18 до 14). Столь большая разница собственной и врачебной оценки состояния предполагает заметный эмоциональный компонент, который оказывает процедура иммерсии.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о некотором несоответствии между явным улучшением функций автономной нервной системы и когнитивного статуса испытуемых и весьма скромным эффектом микрогравитации на собственно моторные функции больных с паркинсонизмом. Возможно, это связано с сильным и более быстрым действием микрогравитации

на сердечно-сосудистую систему [11, 19]. Микрогравитация, при контроле сопутствующих стрессогенных факторов параболического или космического полета, может вызвать даже улучшение исполнения некоторых когнитивных заданий, причем простые задания в наименьшей степени зависели от действия микрогравитации [20]. Также интересным результатом представляется то, что эффект «сухой» иммерсии проявлялся, по крайней мере, 2 нед и для некоторых параметров был даже более выражен именно на этот срок исследования. Можно предположить, что такой долгосрочный эффект может быть связан с влиянием «сухой» иммерсии на эндокринную систему и/или клеточные сигнальные системы [19].

Больные паркинсонизмом представляют собой чрезвычайно разнообразную группу. Поэтому дальнейшие исследования потребуют детализации результатов воздействия «сухой» иммерсии применительно к разным стадиям и формам заболевания, а для определения механизмов действия необходимо применение инструментальных методов исследования и сравнительный анализ с контрольной группой больных.

Выводы

Курс из 7 процедур «сухой» иммерсии при паркинсонизме оказывал позитивное действие в виде снижения выраженности моторной симптоматики на 15 % и нарушений автономной нервной системы на 20–45 % с длительностью благоприятного эффекта до 2 нед после окончания курса.

Данное исследование проведено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект 17.7302.2017/6.7).

Список литературы

1. De Lau L.M., Breteler M.M. Epidemiology of Parkinson disease // *Lancet Neurol.* 2006. V. 5. P. 525–535.
2. Racette B.A., Willis A.W. Time to change the blind men and the elephant approach to Parkinson's disease? // *Neurol.* 2015. V. 85. P. 190–196.
3. Lamont R.M., Morris M.E., Menz H.B. et al. Falls in people with Parkinson's disease: A prospective comparison of community and home-based falls // *Gait Posture.* 2017. V. 55. P. 62–67.
4. Park A., Stacy M. Non-motor symptoms in Parkinson's disease // *J. Neurol.* 2009. V. 256. Suppl. 3. P. 293–298.
5. Poewe W., Antonini A. Novel formulations and modes of delivery of levodopa // *Mov. Disord.* 2015. V. 30. P. 114–120.
6. Rissanen S.M., Kankaanpää M., Tärvinen M.P. et al. Analysis of EMG and acceleration signals for quantifying the effects of deep brain stimulation in Parkinson's disease // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2011. V. 58. P. 2545–2553.
7. Metman L.V., Slavin K.V. Advances in functional neurosurgery for Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2015. V. 30. P. 1461–1470.
8. Picelli A., Tamburin S., Passuello M. et al. Robot-assisted arm training in patients with Parkinson's disease: a pilot study // *J. Neuroeng. Rehabil.* 2014. V. 11. 28. DOI: 10.1186/1743-0003-11-28.
9. Mirelman A., Maidan I., Deutsch J.E. Virtual reality and motor imagery: promising tools for assessment and therapy in Parkinson's disease // *Mov. Disord.* 2013. V. 28. P. 1597–1608.
10. Kozlovskaya I.B., Sayenko I.V., Vinogradova O.L. et al. New approaches to countermeasures of the negative effects of microgravity in long-term space flights // *Acta Astronaut.* 2006. V. 59. P. 13–19.
11. Navasiolava N.M., Custaud M.-A., Tomilovskaya E.S. et al. Long-term dry immersion: review and prospects // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2011. V. 111. P. 1235–1260.
12. Watenpaugh D.E. Analogs of microgravity: head-down tilt and water immersion // *J. Appl. Physiol.* 2016. V. 120. P. 904–914.
13. Carroll L.M., Volpe D., Morris M.E., Saunders J., Clifford A.M. Aquatic exercise therapy for people with Parkinson disease: A randomized controlled trial // *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 2017. V. 98. P. 631–638.
14. Palamara G., Gotti F., Maestri R. et al. Land plus aquatic therapy versus land-based rehabilitation alone for the treatment of balance dysfunction in Parkinson disease: A randomized controlled study with 6-month follow-up // *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 2017. V. 98. P. 1077–1085.
15. Miyai I., Fujimoto Y., Yamamoto H. et al. Long-term effect of body weight-supported treadmill training in Parkinson's disease: a randomized controlled trial // *Ibid.* 2002. V. 83. P. 1370–1373.
16. Вейн А.М. и др. Вегетативные расстройства. Клиника, лечение, диагностика. М., 1998.
17. Wein A.M. et al. Vegetative disorders. Clinics, treatment, diagnostics. Moscow, 1998.
18. Gallasch E., Kozlovskaya I., Löscher W.N. et al. Arm tremor and precision of hand force control in a short and long term flight on the «Mir»-Space-Station // *Acta Astronaut.* 1994. V. 33. P. 49–55.
19. Magrinelli F., Picelli A., Tocco P. et al. Pathophysiology of motor dysfunction in Parkinson's disease as the rationale for drug treatment and rehabilitation // *Parkinsons Dis.* 2016; 2016:9832839. DOI: 10.1155/2016/9832839.
20. Demontis G.C., Germani M.M., Caiani E.G. et al. Human pathophysiological adaptations to the space environment // *Front. Physiol.* 2017. V. 8. P. 547. DOI: 10.3389/fphys.2017.00547.
21. Wollseiffen P., Vogt T., Abeln V. et al. Neuro-cognitive performance is enhanced during short periods of microgravity // *Physiol. Behav.* 2016. V. 155. P. 9–16.

Поступила 12.10.2017

THE EFFECT OF «DRY» IMMERSION AS MICROGRAVITY ANALOGUE ON NEUROLOGICAL SYMPTOMS IN PARKINSONISM

Meigal A.Yu., Gerasimova-Meigal L.I., Saenko I.V., Subbotina N.S., Tret'yakova O.G., Chernikova L.A.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia).
2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 53–59

Patients with either Parkinson's disease (n = 11) or parkinsonism and vascular parkinsonism (n = 5) have passed

through a course of «dry» immersion (7 sessions, each 45 min long, 2 times a week, net exposure was 315 min). After the course of «dry» immersion, score of subscale I of Wein's inventory for autonomic disorders has decreased by 45 % and of the subscale II – by 23 %, time of the choice reaction has improved (from 560 to 455 ms, $p = 0,08$), while that of the simple visual-motor reaction did not. The most prominent effect was seen at the point of 2 weeks of follow up after the course of «dry» immersion.

Key words: microgravity, dry immersion, Parkinson's disease, motor and autonomic disorders.

УДК 616-009.1

НЕЙРОПЛАСТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА, ВЫЗВАННЫЕ ПРИМЕНЕНИЕМ МЕХАНИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ ОПОРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ И МЯГКОГО МУЛЬТИМОДАЛЬНОГО ЭКЗОСКЕЛЕТОННОГО КОМПЛЕКСА «РЕГЕНТ» У ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И ПОСТИНСУЛЬТНЫХ БОЛЬНЫХ

Саенко И.В.^{1,3}, Черникова Л.А.², Пойдашева А.Г.², Хижникова А.Е.², Кремнева Е.И.², Морозова С.Н.², Коновалов Р.Н.², Козловская И.Б.¹

¹Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

²Научный центр неврологии, Москва

³Центр авиакосмической медицины и технологий, Москва

E-mail: isayenko@mail.ru

В статье обсуждаются исследования, которые проводились совместно отделом сенсомоторной физиологии и профилактики Института медико-биологических проблем РАН и Научным центром неврологии в течение последних 8 лет, по изучению нейропластических изменений в коре головного мозга, вызванных применением механической стимуляции опорных рецепторов и мягкого мультимодального экзоскелетонного комплекса «Регент» у здоровых лиц и постинсультных больных. В результате проведенных исследований была разработана пассивная сенсомоторная фМРТ-парадигма с использованием подошвенного имитатора опорной нагрузки «Корвит» для имитации локомоции как у здоровых людей, так и у пациентов с двигательным дефицитом. Показано, что как включение механической стимуляции опорных зон стоп в реабилитационном комплексе у больных с острым инсультом в первые дни заболевания, так и применение мультимодального экзоскелетонного комплекса «Регент» у больных с постинсультными гемипарезами в более поздние периоды инсульта приводят к улучшению характеристик функции ходьбы, что сопровождается реорганизацией корковых структур с формированием паттерна активации супраспинальных систем контроля локомоции.

Ключевые слова: нейропластичность, функциональная магнитно-резонансная томография, сенсомоторная пассивная фМРТ, постинсультные больные, локомоция, нейрореабилитация.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 60–66.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-60-66

Среди инновационных технологий, применяющихся в нейрореабилитации больных с постинсультными двигательными нарушениями, особое место занимают методы космической медицины, разработанные российскими учеными, такие, как механическая стимуляция опорных зон стопы с помощью аппарата «Корвит» и усиление проприоцептивной

афферентации от суставов, связок и мышц за счет системы эластичных нагрузочных элементов (ЭНЭ), распределяющихся в соответствии с топографией антигравитационных мышц туловища и конечностей (мышц-антагонистов), с помощью мягкого мультимодального экзоскелетонного комплекса «Регент». В основе создания этих технологий лежат многолетние исследования, проводимые в Институте медико-биологических проблем РАН, которые показали, что влияние гравитации на сенсомоторную систему происходит через различные афферентные входы, преимущественно вестибулярные и опорные. Ранее считалось, что функционирование тонической мышечной системы поддерживается в основном вестибулярной системой, однако в работах И.Б. Козловской и соавт. [1, 2] была показана прямая роль опорной афферентации в контроле структурно-функциональной организации тонической мышечной системы. В серии экспериментов было установлено, что опорная афферентация выполняет роль триггера в системе позно-тонических реакций, облегчая (при наличии опоры) или тормозя (при ее отсутствии) включение тонических двигательных единиц; определяет координационный рисунок позных синергий; обеспечивает оптимальную стратегию позных коррекционных ответов. В условиях безопорности снижается участие постральных мышц в локомоторных движениях при одновременном увеличении доли участия фазных мышц; уменьшается поперечная жесткость и максимальная произвольная сила [3, 4]. Установленные закономерности легли в основу разработки новых средств и методов профилактики и коррекции неблагоприятных эффектов невесомости, таких, как подошвенный имитатор опорной нагрузки «Корвит» и мягкий мультимодальный экзоскелетонный комплекс «Регент», используемых с высокой эффективностью в длительных космических полетах. Впоследствии эти средства нашли применение в

неврологической клинике для восстановления и коррекции, в первую очередь, нарушений позы и ходьбы. Но, несмотря на применение в течение последних 20 лет этих средств в комплексном лечении больных с постинсультными двигательными нарушениями, многие вопросы механизма их действия остаются недостаточно изученными. В частности, определенную трудность представляет изучение кортикальной реорганизации головного мозга, лежащей в основе нейропластических процессов, развивающихся при использовании этих средств в реабилитации больных с постинсультными двигательными нарушениями.

В настоящее время одной из наиболее часто используемых методик функциональной нейровизуализации, позволяющей изучать активизацию различных зон коры головного мозга в ответ на выполнение определенных заданий (двигательных, когнитивных, речевых и т.д.), является фМРТ, основанная на феномене BOLD (blood oxygen level dependent) эффекта. Вместе с тем оценка кортикального контроля локомоции с помощью фМРТ представляется одной из наиболее сложных в техническом плане проблем. Для этого разрабатываются специальные фМРТ-парадигмы, в которых обследуемому предлагают воображать необходимое движение [5–9], или же используют различные приспособления и устройства для осуществления активного или пассивного сгибания-разгибания в голеностопном суставе, которое рассматривается как наиболее важная составляющая в акте ходьбы [10–13]. И те и другие задания имеют определенные ограничения: первый вариант с воображаемым движением довольно сложен для воспроизведения не только больными, но и здоровыми испытуемыми, требует определенных навыков и тренировки; второй вариант также мало доступен вследствие отсутствия устройств, которые можно было бы использовать в условиях сильного магнитного поля без выраженных артефактов. Кроме того, активные движения в нижних конечностях зачастую невозможны у пациентов с выраженным неврологическим дефицитом. Поэтому продолжают активные поиски фМРТ-парадигм, которые позволят максимально точно воспроизвести процесс локомоции или отдельные его компоненты у всех категорий обследуемых.

С целью изучения нейропластических изменений в головном мозге, развивающихся в ответ на применение средств космической медицины, на базе ФГБНУ «Научный центр неврологии» совместно с отделом сенсомоторной физиологии и профилактики Института медико-биологических проблем РАН при активном участии член-корр. РАН, д.м.н. И.Б. Козловской был проведен комплекс клинико-нейровизуализационных исследований.



Рис 1. Имитатор опорной нагрузки подошвенный «Корвит»

Методика

Исследования проводились в 3 этапа.

I этап. Разработка пассивной моторной фМРТ-парадигмы для оценки супраспинального контроля навыка ходьбы в норме и у пациентов с двигательным неврологическим дефицитом после перенесенного ишемического инсульта.

В исследовании приняли участие 19 здоровых добровольцев без патологии со стороны ЦНС и других систем, а также без изменения вещества головного мозга по данным МРТ в стандартных режимах, 9 мужчин и 10 женщин, средний возраст которых составил 38 (31,5–60) лет. Кроме того, в исследование были включены 43 пациента (13 женщин, 30 мужчин), средний возраст 54 (46–60) года, с первичным ишемическим инсультом, из них с корково-подкорковой локализацией – 23 и с подкорковой – 20 больных. Инфаркт в правом полушарии большого мозга отмечался у 20 больных, в левом полушарии – у 23 больных. Давность инсульта на момент обследования составляла от 21 сут до 16 мес. У всех больных в клинической картине выявлялся постинсультный гемипарез со средней тяжестью пареза в ноге по шкале Fugl-Meyer 17 (12–25,3 баллов) (в норме – 34 балла). Все обследуемые были правши, доминирование правой руки подтверждалось с помощью Эдинбургского теста для определения рабочей руки [14]. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ФГБНУ «НЦН», получено Информированное согласие от всех участников обследования.

Для исследования функциональной реорганизации супраспинальных сенсомоторных систем использовался подошвенный имитатор нагрузки «Корвит» (рис. 1), который состоит из блока управления,

блока питания, МРТ-совместимых воздухопроводов и ортезов со встроенными в стельки пневмокамерами, закрепляющимися на ступнях обследуемого. Работа аппарата осуществляется по принципу создания пневмомеханического давления на соответствующие опорные зоны стопы с помощью пневмокамер, работающих в режимах реальных локомоций. Причем пневмокамеры вмонтированы в стельку таким образом, чтобы осуществлять стимуляцию участков ступней с максимальной плотностью проприорецепторов. Уникальность данного прибора состоит в том, что он позволяет имитировать показатели физического воздействия на стопу при ходьбе: величину давления, временные характеристики (длительность импульса, интервалы между воздействиями на пяточную и плюсневую опорные зоны и интервалы между воздействиями на правую и левую ногу). При подобном моделировании опорных реакций формируется мощный афферентный поток импульсации, который оказывает регулирующее действие на структуры ЦНС, контролирующие движение и моделирует сенсорный образ ходьбы.

В течение одной сессии сканирования у каждого испытуемого выполнялась парадигма (задание), которая была заранее прорепетирована до начала исследования и непосредственно в комнате сканирования. Парадигма имела блочный дизайн, состоящий из 6 чередующихся блоков периода активации и периода покоя продолжительностью по 38 с каждый. Задание начиналось с периода покоя, во время которого любая стимуляция отсутствовала. Затем следовал период активации – стимуляции опорных зон стопы в режиме имитации медленной ходьбы с давлением на стопы 40 кПа и частотой 75 шагов/мин. Во время каждого блока было получено 10 серий изображений головного мозга. Общая продолжительность каждой парадигмы составляла 3 мин 53 с, за которые было получено всего 60 серий изображений головного мозга.

МРТ-данные были получены на МР-томографе с напряженностью магнитного поля 1,5 Т, Magnetom Avanto фирмы Siemens, Erlangen (Германия). Исследование начиналось со стандартного режима T2 турбо спин-эхо в аксиальной проекции для исключения патологических изменений вещества головного мозга. Для получения анатомических данных выполнялось исследование в режиме 3D-T1 градиентное эхо (T1-mpr) с получением набора из 176 сагиттальных срезов, покрывающих весь объем вещества мозга (время повторения (TR) – 1940 мс, время эхо (TE) – 3,1 мс, угол наклона – 15°, матрица – 256 x 256 мм, толщина среза – 1,0 мм, размер вокселя – 1 x 1 x 1 мм). Затем последовательно были получены 2 набора функциональных данных (для каждой из парадигм) в режиме T2*-градиентное эхо в аксиальной проекции (TR – 3800 мс, TE – 50 мс, угол наклона – 90°, матрица – 64 x 64 мм, толщина

среза – 3,0 мм, размер вокселя – 3 x 3 x 3 мм, 36 срезов в серии). Каждый T2*-режим включал в себя 60 измерений всего объема вещества мозга.

Оценка полученных данных проводилась при помощи пакета для статистической обработки SPM5 (Wellcome Trust Centre of Neuroimaging, London, UK) отдельно для каждой парадигмы на этапе препроцессинга. Все объемы функциональных данных были выровнены относительно первого для коррекции движения испытуемого, после чего средний функциональный файл линейно корегистрировался с соответствующим анатомическим файлом с последующей пространственной нормализацией первого (3x3x3 мм) и второго (1x1x1 мм) относительно стандартного пространства координат Монреальского неврологического института (Montreal Neurological Institute, MNI). Непосредственно перед статистическим анализом преобразованные функциональные данные размывались при помощи гауссовой функции размером ядра 10 x 10 x 10 мм для увеличения соотношения сигнал – шум (за счет ослабления высокочастотного шума) и компенсации вариативности строения извилин между субъектами. Статистические параметрические карты генерировались на основании повоксельного сравнения при помощи общей линейной модели (General Linear Model) [15]. Для снижения артефактов от движения обследуемого параметры ригидной трансформации при выравнивании вводились в качестве регрессоров при статистической обработке первого уровня (для каждого испытуемого). При групповом анализе применялась модель со случайными уровнями факторов (Random Effects Model), с установленным порогом статистической значимости $p < 0,001$ (без коррекции) для выявления значимых зон активации. В результатах представлены только зоны активации (кластеры) с $p_{\text{коррект}} < 0,05$ на кластерном уровне.

II этап. Изучение влияния механической стимуляции опорных зон стоп на восстановление двигательных нарушений и функций опоры и ходьбы, а также на реорганизацию корковых областей у больных в остром периоде инсульта.

В работу было включено 56 пациентов: 32 мужчины и 24 женщины в возрасте от 31 до 81 года, средний возраст 61 (55–65) год, поступивших на лечение в острейшем периоде инсульта (1–7-е сутки), средний срок поступления 1 (1–3) сутки острого нарушения мозгового кровообращения. Тяжесть инсульта по шкале NIHSS – 11 (9–14) баллов, что соответствует инсульту средней степени тяжести. Степень двигательного дефицита в ноге по шкале Fugl-Meyer – 4 (3–8) балла (в норме – 34 балла). Все испытуемые не имели противопоказаний для проведения МРТ-исследований и подписали Информированное согласие о добровольном участии в исследовании.

Основную группу составили 32 больных, у которых с первых часов развития инсульта, помимо традиционной восстановительной терапии, включающей лечебную гимнастику, массаж и нервно-мышечную электростимуляцию, применялась механическая стимуляция опорных зон стоп с помощью устройства «Корвит». Контрольная группа включала 24 больных, которые получали только традиционную терапию. Механическая стимуляция опорных зон стоп проводилась в основной группе на аппарате «Корвит» в режиме медленной ходьбы. Стимуляция проводилась 2 раза в сутки по 20 мин 5 раз в неделю, в течение 3 нед.

III этап. Изучение реорганизации корковых зон мозга, ответственных за локомоцию, при использовании в комплексном лечении постинсультных больных мультимодального экзоскелетонного комплекса (МЭК) «Регент».

В исследовании принимали участие 14 больных, средний возраст 50,3 (49–62) года, перенесших ишемический инсульт с локализацией очага поражения в подкорковых зонах, с давностью заболевания в среднем 14,2 (7,0–23,0) мес. У 7 больных наблюдалось поражение правого полушария и у остальных 7 больных – левого. Все больные имели умеренный или легкий парез ноги со средней тяжестью пареза по шкале Fugl-Meyer 22,2 (17,0–27,0) балла (в норме – 34 балла). Все больные могли пройти 10 м без какой-либо помощи. Все испытуемые не имели противопоказаний для проведения МРТ-исследований и подписали Информированное согласие о добровольном участии в исследовании.

Пациенты, перенесшие ишемический инсульт, помимо стандартных реабилитационных мероприятий, занимались кинезотерапией с использованием МЭК (10 занятий 5 раз в нед). Занятия проводились не ранее, чем через 2 ч после еды, при постоянном контроле за физическим состоянием пациентов (контроль АД, ЧСС).

Важнейшим элементом МЭК «Регент» (рис. 2) являются эластичные нагрузочные элементы (ЭНЭ), с помощью которых производилась аксиальная нагрузка на пациента путем регулирования силы натяжения ЭНЭ с ориентацией как на больную, так и на здоровую сторону. Натяжение ЭНЭ производилось таким образом, чтобы обеспечить правильную установку нижних конечностей, отвечая мышечным сопротивлением на приложенную силу, либо способствовать пассивному включению в физиологическую синергию, формирующуюся под воздействием МЭК «Регент» и способствующую нормализации шаговых движений. С помощью ЭНЭ на жилете корректировалось правильное положение плеч и торса. Таким образом, достигалось выраженное уменьшение асимметрии позы. Первые 1–2 занятия осуществлялся индивидуальный подбор оптимальной степени натяжения ЭНЭ, выбор типа которых

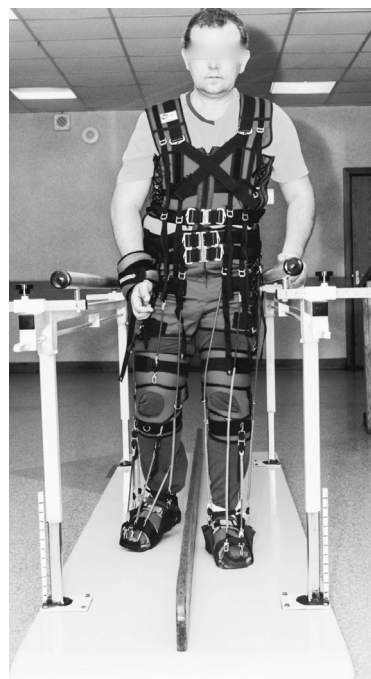


Рис. 2. Мультимодальный экзоскелетонный комплекс «Регент»

зависел от индивидуальных особенностей пациента (роста, объема, диагноза) и варианта их крепления на опорных элементах.

Результаты и обсуждение

Результаты I этапа исследований

При фМРТ с помощью пассивной сенсомоторной парадигмы – механической стимуляции опорных зон стоп в режиме имитации медленной ходьбы – в группе здоровых добровольцев были локализованы участки активации первичной сенсорной коры (S1), включающие обширные двусторонние зоны активации в парацентральных долях, а также в первичной моторной коре (M1), что доказывает действенность данной парадигмы для имитации именно активных движений. Важно отметить двустороннюю активацию дополнительной моторной зоны (SMA), которая, как считают, активизируется при намерении выполнить действие (при этом само действие может и не последовать) и его прогнозирования, а также при стимуляции движения без его выполнения, что и происходило в нашем задании. Также была получена активация задних теменных областей, а именно области нижних теменных долей IPL (больше слева). Данные участки играют важную роль в оценке когнитивных стратегий и моторных программ, вовлеченных при последовательных движениях ногами. Таким образом, при использовании у испытуемых пассивной сенсомоторной фМРТ-парадигмы отмечается обширная активация области

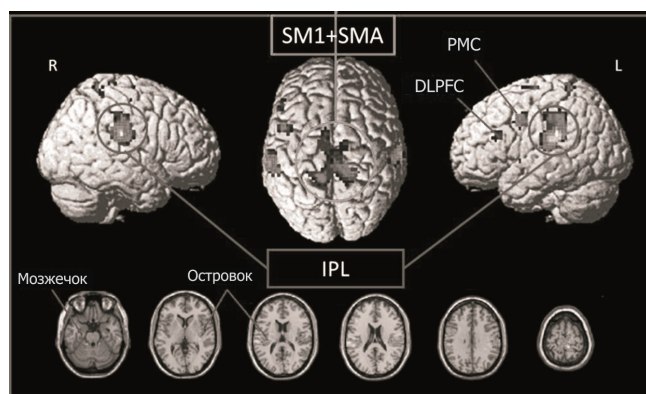


Рис. 3. Зоны активации головного мозга в группе здоровых добровольцев при выполнении парадигмы, наложенные на объемное изображение головного мозга (вверху) и срезы в аксиальной проекции (внизу).

R – правое полушарие большого мозга; L – левое полушарие



Рис. 4. Активация сенсомоторной коры в группе с корково-подкорковой локализацией ишемического инсульта в различные сроки

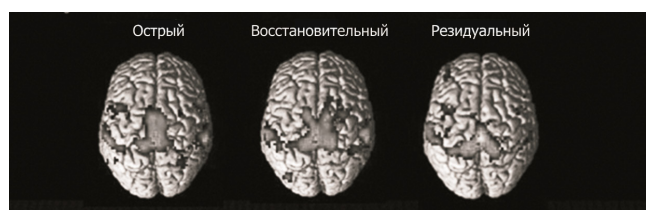


Рис. 5. Активация сенсомоторной коры в группе с подкорковой локализацией ишемического инсульта в различные сроки

первичной и вторичной сенсомоторной коры, участвующей в контроле локомоции (рис. 3).

Что касается больных, то по данным фМРТ с использованием предложенной нами парадигмы активировались те же области, что и у здоровых испытуемых. Однако активация этих зон имеет некоторые особенности в зависимости от локализации зоны инфаркта и периода ишемического инсульта. В группе больных с корково-подкорковой локализацией инсульта дезорганизация сенсомоторной системы в остром периоде сменяется паттерном контралатеральной пластичности в восстановительном

периоде с последующим подключением пораженного полушария в сроки более 1 года от момента начала заболевания (рис. 4). В группе с подкорковой локализацией очага поражения паттерн активации сенсомоторной коры в остром периоде остается сохранным, с преобладанием паттерна ипсилатеральной реорганизации в последующие периоды (рис. 5). В недавно проведенном исследовании [16] также были получены аналогичные данные при использовании «Корвита» у здоровых лиц.

Результаты II этапа исследований

Проведенное исследование показало, что программа реабилитации, включающая механическую стимуляцию опорных зон стоп с первых часов развития инсульта, позволяет повысить эффективность реабилитационных мероприятий у больных основной группы, что проявлялось в более раннем (в среднем на 2 сут по сравнению с контрольной группой) восстановлении баланса в положении сидя и стоя, а также функции ходьбы. Оказалось также, что применение «Корвита» в 1-е сутки после развития инсульта можно рассматривать как профилактическую меру развития спастичности в паретичной ноге.

С целью изучения влияния курса механической стимуляции стоп на реорганизацию корковых структур было выполнено сравнительное изучение данных фМРТ с использованием разработанной нами пассивной сенсомоторной парадигмы, имитирующей локомоцию, в первые сутки после инсульта и в конце острого периода (на 21-е сутки инсульта). При оценке фМРТ-данных, выполненных при поступлении, наблюдалась дезорганизация супраспинальных структур у всех больных, участвующих в исследовании, что согласуется с прежде полученными данными [17, 18]. При оценке фМРТ-данных на 21-е сутки инсульта у больных, в комплексное лечение которых была включена механическая стимуляция опорных зон стоп, отмечалось начало формирования характерного паттерна активации супраспинальных структур, контролирующей локомоцию. Так, активация первичной сенсомоторной коры SM1 (парацентральная доля) и дополнительной моторной коры SMA отмечалась в основном в контралатеральном полушарии, в то время как активация ассоциативной соматосенсорной области – правая и левая нижние теменные доли – превалировала на стороне очага в ипсилатеральном полушарии.

Можно предположить, что эффективность включения механической стимуляции опорных зон стоп в раннюю реабилитацию больных с острым инсультом (уменьшение выраженности двигательного дефицита, более ранние сроки восстановлению баланса и функции ходьбы, нормализация мышечного тонуса) обусловлена, прежде всего, коррекцией позно-тонических нарушений в гравитационной мускулатуре ног и туловища, возникших в результате

функциональной опорной депривации. Это предположение подтверждается результатами фМРТ, при которой были получены данные, свидетельствующие о том, что на фоне усиленного потока опорной афферентации, создаваемого механической стимуляцией опорных зон стоп от аппарата «Корвит», в течение 3 нед с момента развития инсульта наблюдается реорганизация супраспинальных структур, отвечающих за локомоцию, в виде начала формирования характерного паттерна активации. При этом ипсилатерально наблюдается преобладание активации чувствительных зон (вторичной сенсомоторной коры), а в контралатеральном полушарии превалирует активация первичной сенсомоторной коры и возникает активация дополнительной моторной коры.

Результаты III этапа исследований

При анализе клинической эффективности применения МЭК «Регент» были получены данные о достоверном повышении скорости ходьбы на 10 м после курса лечения, при этом степень двигательных нарушений в ноге по шкале Fugl-Meyer достоверно не изменилась.

Данные фМРТ с парадигмой, имитирующей медленную ходьбу, обсчитывались суммарно по всей группе. Очаг поражения на всех иллюстрациях был справа. До начала реабилитационных мероприятий у пациентов выявлялись зоны активации в области первичной сенсомоторной и дополнительной моторных зон, а также в левой и правой нижней теменной долях. После реабилитационных мероприятий у пациентов выявлялось повышение более чем в 2 раза объема зоны активации в первичной сенсомоторной и дополнительной моторной коре и снижение объема зоны активации в нижних теменных долях с 2 сторон. При этом зона в первичной сенсомоторной и дополнительной моторной коре стала более «целостной» и сконцентрированной.

Проведенное исследование показало, что на фоне применения курса МЭК «Регент» у больных с постинсультными гемипарезами повышается скорость ходьбы, что сопровождается изменениями в зонах активности, выявляемых при фМРТ, свидетельствующими о положительном направлении нейропластических процессов: уменьшение зон активации во вторичных сенсорных областях (нижних теменных долях) с одновременным увеличением зоны активации в первичной сенсомоторной и дополнительной моторной областях.

По-видимому, эффективность применения МЭК «Регент» в комплексной реабилитации больных с постинсультными двигательными нарушениями связана с коррекцией патологических локомоторных синергий и нормализацией шаговых движений за счет перераспределения проприоцептивного потока от суставов, связок и мышц при использовании системы ЭНЭ, распределяющихся в соответствии с

топографией антигравитационных мышц туловища и конечностей (мышц-антагонистов).

Выводы

1. Подошвенный имитатор опорной нагрузки «Корвит» может быть использован в фМРТ-исследованиях в качестве парадигмы для имитации локомоции как у здоровых людей, так и у пациентов с двигательным дефицитом.

2. Преимуществом отработанной нами парадигмы является автоматизация и объективизация стимуляции, которая проводится с постоянной силой и частотой и может быть воспроизведена многократно; задания требуют минимальной кооперации со стороны исследуемого.

3. Включение механической стимуляции опорных зон стоп в реабилитационном комплексе у больных с острым инсультом в первые дни заболевания, так и применение МЭК «Регент» у больных с постинсультными гемипарезами в более поздние периоды инсульта приводят к улучшению характеристик функции ходьбы, что сопровождается реорганизацией корковых структур с формированием паттерна активации супраспинальных систем контроля локомоции.

Список литературы

1. Kozlovskaya I.B., Vinogradova O.V., Sayenko I.V. et al. New approaches to countermeasures of the negative effects of microgravity in longterm space flights // Acta Astronaut. 2006. V. 59. P. 13.
2. Kozlovskaya I.B., Sayenko I.V., Sayenko D.G. et al. Role of support afferentation in control of the tonic muscle activity // Ibid. 2007. V. 60. P. 285.
3. Miller T., Ivanov O., Galanov D. et al. The method of support stimulation as a way to maintain activity of the tonic muscular system during functional support deprivation // J. Gravit. Physiol. 2005. V. 12. № 1. P. 149.
4. Grigoriev A.I., Kozlovskaya I.B., Shenkman B.S. The role of support afferents in organization of the tonic muscle system // Rus. Physiol. J. 2004. V. 90. № 5. P. 508.
5. Iseki K., Hanakawa T., Shinozaki J. et al. Neural mechanisms involved in mental imagery and observation of gait // NeuroImage. 2008. V. 41. P. 1021–1031.
6. La Fougere C., Zwergal A., Rominger A. et al. Real versus imagined locomotion: A [18F]-FDG PET-fMRI comparison // Ibid. 2010. V. 50. P. 1589–1598.
7. Bakker M., De Lange F.P., Helmich R.C. et al. Cerebral correlates of motor imagery of normal and precision gait // Ibid. 2008. V. 41. P. 998–1010. DOI:10.1016/j.neuroimage.2008.03.020.
8. Blumen H.M., Holtzer R., Brown L.L. et al. Behavioral and neural correlates of imagined walking and walking-while-talking in the elderly // Hum. Brain Mapp. 2014. V. 35. P. 4090–4104. DOI:10.1002/hbm.22461.

9. Zwergal, A., Linn, J., Xiong, G. et al. Ageing of human supraspinal locomotor and postural control in fMRI // *Neurobiol. Ageing*. 2012. V. 33. P. 1073–1084. DOI: 10.1016/j.neurobiol.ageing.2010.09.022.

10. Mehta J.P., Verber M.D., Wieser J.A. et al. A novel technique for examining human brain activity associated with pedaling using fMRI // *J. of Neurosci. Methods*. 2009. V. 179. P. 230–239.

11. Dobkin B.H., Firestine A., West M. et al. Ankle dorsiflexion as an fMRI paradigm to assay motor control for walking during rehabilitation // *NeuroImage*. 2004. V. 23. P. 370–381. DOI:10.1016/j.neuroimage.2004.06.008.

12. Sahyoun C., Floyer-Lea A., Johansen-Berg H., Matthews P.M. Towards an understanding of gait control: brain activation during the anticipation, preparation and execution of foot movements // *Ibid.* V. 21. P. 568–575. DOI:10.1016/j.neuroimage.2003.09.065.

13. Trinastic J.P., Kautz S.A., McGregor K. et al. An fMRI study of the differences in brain activity during active ankle dorsiflexion and plantarflexion // *Brain Imaging Behav.* 2010. V. 4. P. 121–131. DOI:10.1007/s11682-010-9091-2.

14. Henry J.D., Crawford J.R. A meta-analytic review of verbal fluency performance following focal cortical lesions // *Neuropsychol.* 2004. V. 18. № 2. P. 284–295.

15. Friston K.J., Holmes A.P., Worsley K.J. et al. Statistical parametric maps in functional imaging: A general linear approach // *Human Brain Mapping*. 1995. V. 2. № 4. P. 189–210.

16. Labriffe M., Annweiler C., Amirova L.E. et al. Brain activity during mental imagery of gait versus gait-like plantar stimulation: a novel combined functional MRI paradigm to better understand cerebral gait control // *Front Hum. Neurosci.* 2017. Mar. 611:106. doi: 10.3389/fnhum.2017.00106. eCollection 2017.

17. Kremneva E.I., Chernikova L.A., Konovalov R.N. et al. Activation of the sensorimotor cortex using a device for mechanical stimulation of the plantar support zones // *Human Physiol.* 2012. V. 38. № 1. C. 49–55.

18. Kremneva E.I., Saenko I.V., Chernikova L.A. et al. Specific Activation of Brain Cortical Areas in response to stimulation of the support receptors in healthy subjects and patients with focal lesions of the CNS // *Ibid.* 2013. V. 39. № 5. P. 524–529.

Поступила 26.09.2017

NEUROPLASTIC CHANGES IN THE CEREBRAL CORTEX CAUSED BY THE USE OF MECHANICAL STIMULATION OF THE SUPPORT RECEPTORS AND THE SOFT MULTIMODAL EXOSKELETON COMPLEX «REGENT» IN HEALTHY INDIVIDUALS AND POST-STROKE PATIENTS

**Saenko I.V., Chernikova L.A.,
Poydasheva A.G., Khizhnikova A.E.,
Kremneva E.I., Morozova S.N.,
Konovalov R.N., Kozlovskaya I.B.**

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 60–66

The article discusses the investigations that were conducted in common by the Department of Sensomotor Physiology and Prevention of the Institute of Medical and Biological Problems of the Russian Academy of Sciences and the Research Center of Neurology during the last 8 years. The investigations studied the neuroplasticity changes in the cerebral cortex caused by the use of mechanical stimulation of the supporting receptors and the soft multimodal exoskeleton complex «Regent» in healthy individuals and post-stroke patients. As a result of the research, a passive sensorimotor fMRI-paradigm was developed using the plantar imitator of the «Korvit» support load to simulate locomotion in healthy individuals and in patients with motor deficiency. It has been shown that both the inclusion of mechanical stimulation of the foot support zones in the rehabilitation complex in patients with acute stroke in the first days of the disease and so the use of the multimodal exoskeleton complex «Regent» in patients with post-stroke hemiparesis in later periods of stroke lead to an improvement in the characteristics of the walking function, which is accompanied by the reorganization of cortical structures with the formation of a pattern of activation of supraspinal locomotion control systems.

Key words: neuroplasticity, functional magnetic resonance imaging, sensorimotor passive fMRI, post-stroke patients, locomotion, neurorehabilitation.

УДК 612.135+611.08

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПРЕБЫВАНИИ В УСЛОВИЯХ ОРТОСТАТИЧЕСКОЙ И АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ГИПОКИНЕЗИИ

Руденко Е.А., Пучкова А.А., Баранов М.В.

НИИ космической медицины ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА России, Москва

E-mail: katrud@mail.ru

Цель работы – исследование влияния постоянного и переменного угла наклона на показатели микроциркуляции в условиях ортостатической и антиортостатической гипокинезии. В статье представлены результаты 2 серий эксперимента. Показано, что для антиортостатической гипокинезии характерна вазоконстрикция с увеличением линейной скорости кровотока. Обратные явления наблюдаются при ортостатической гипокинезии. Постуральные изменения тела в течение суток не влияют значительно на тонус артериальных отделов капилляров и линейную скорость кровотока.

Ключевые слова: микроциркуляция, антиортостатическая гипокинезия, ортостатическая гипокинезия.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 67–70.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-67-70

Во время космических полетов (КП) и при моделировании их эффектов происходят процессы адаптации к микрогравитации и антиортостатической гипокинезии. При переходе организма в состояние невесомости гидростатическое давление жидких сред меняется, что влияет на состояние сосудов, окружающих их тканей и распределение жидкостных компартментов организма. Развивающиеся при этом первичные сдвиги в сосудистых областях ниже уровня сердца характеризуются уменьшением трансмурального давления и растяжения стенок венозного русла и капилляров, уменьшением сосудистого объема и количества депонированной в этих участках крови с образованием в области голени зон свободной растяжимости вен, преобладанием перехода жидкости из межклеточного во внутрисосудистое пространство, что способствует первоначальному увеличению объема циркулирующей крови [1, 2]. В сосудистых областях, расположенных выше уровня сердца, возникают противоположные изменения. В результате происходит частичное перемещение крови и других жидких сред в верхнюю часть тела. Устанавливается новый уровень гемодинамического и водно-солевого гомеостаза [3].

Изменения гемодинамики при моделировании микрогравитации достаточно хорошо изучены [4,

5]. В то же время исследования, посвященные гипогравитации, практически не проводили. Развитие пилотируемых космических программ как российских, так и зарубежных агентств предполагает в скором будущем полеты человека на Луну и Марс, где человек будет находиться в условиях гипогравитации. При этом переход и адаптация к гипогравитации будет происходить после пребывания в условиях КП (микрогравитации).

Важнейшей частью кардиореспираторной системы является микроциркуляторное звено. Именно на этом уровне гравитационный фактор может влиять не только на тонус сосудов, но и существенно образом изменять газообмен, баланс жидкости в организме и обмен веществ [6].

Целью исследования было сравнение параметров микроциркуляции при моделировании эффектов гипо- и микрогравитации. В ходе эксперимента моделирование гипогравитации происходило с помощью ортостатической гипокинезии [7], которую сравнивали с классической моделью невесомости – антиортостатической гипокинезией (АНОГ) [8]. Исследовали микроциркуляцию мягких тканей с помощью компьютерной капилляроскопии. Данный метод позволяет неинвазивно оценивать ангиоархитектонику капиллярного русла на уровне ногтевого ложа.

Методика

Исследования проводили с участием добровольцев в условиях стационара. Проведены 2 серии исследований: 21-суточная и 14-суточная. Предварительно процедуры и методики исследований были рассмотрены Комиссией по биомедицинской этике при Федеральном научно-клиническом центре специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России. От испытуемых, принимавших участие в исследованиях, получено письменное Информированное согласие.

В 1-й серии исследований, направленной на сравнение показателей микроциркуляции при моделировании гипо- и микрогравитации, приняли



Рис.1. Изображение капилляров при увеличении в 450 раз

участие 11 здоровых мужчин-добровольцев в возрасте 18–35 лет. Испытатели находились в условиях АНОГ -6° (модель микрогравитации) в течение 5 сут. На 6-е сутки они были разделены на 2 группы: 1-я группа «АНОГ» (5 человек) оставалась в условиях АНОГ -6° до 21-х суток, 2-я группа «ОГ» (6 человек) в дневное время находилась в условиях ортостатической гипокинезии $+9,6^\circ$ (модель лунной гипогравитации), а на время ночного сна (с 23.00 до 7.00) переводилась в горизонтальное положение. Компьютерную капилляроскопию проводили у всех обследуемых в фоне на 6-е и 21-е сутки.

Поскольку группа «ОГ» в ночное время находилась в горизонтальном положении, то она подвергалась не только воздействию «пониженной гравитации», но и изменениям положения тела в течение суток. Для оценки вклада постуральных колебаний на физиологические параметры в условиях моделирования гипогравитации была проведена 2-я серия эксперимента, в которой приняли участие 12 человек, и также было выделено 2 группы. В 1-й группе «ОГ16» воздействие заключалось в пребывании испытуемых в ортостатическом положении с углом наклона тела относительно горизонтальной поверхности $+9,6^\circ$ на дневной период (с 07.00 до 23.00) и горизонтального положения на ночной период (с 23.00 до 07.00). Во 2-й группе «ОГ24» испытуемые находились в ортостатическом положении с углом наклона тела относительно горизонтальной оси $+9,6^\circ$ на всем протяжении исследования. Капилляроскопию проводили у всех обследуемых в фоне на 6-е и 14-е сутки.

Для исследования капиллярного кровотока ногтевого ложа использовали цифровой капилляроскоп со встроенной высокоскоростной камерой PL-B621MU. Детальное исследование размеров капилляров проводили при увеличении в 450 раз (рис. 1). Оценивали средние значения диаметров капилляров в артериальном (АО), переходном (ПО) и венозном (ВО) отделах, отношение диаметров венозного отдела капилляра к артериальному (ВО/АО), линейную скорость кровотока в

капилляре, размер периваскулярной зоны (ПЗ). Для улучшения оптической проницаемости эпидермиса на исследуемый участок наносилось небольшое количество иммерсионного масла. Рука испытуемого находилась на уровне сердца. Капиллярный кровоток изучался в эпонихии 3-го и 4-го пальцев левой руки. Обработка первичной информации проводилась с помощью компьютерного обеспечения, позволяющего просматривать записанные изображения, определять параметры капилляров.

Результаты и обсуждение

В ходе 1-й серии эксперимента сравнивали показатели микроциркуляции в условиях моделирования лунной гипогравитации и антиортостатической гипокинезии. Наиболее показательными в данных исследованиях оказались артериальный отдел капилляра и линейная скорость кровотока.

На 6-е сутки в обеих группах отмечена тенденция к снижению диаметра артериального отдела капилляра (рис. 2). Однако к 21-м суткам в группе «ОГ» отмечен рост показателя ($p < 0,01$; Wilcoxon), а в группе «АНОГ» тенденция к снижению сохранилась. На 21-е сутки воздействия выявлены достоверные различия между обеими группами ($p < 0,01$; тест Манна – Уитни).

На 6-е сутки эксперимента установлено увеличение линейной скорости кровотока в обеих группах (рис. 3). Однако в дальнейшем к 21-м суткам скорость кровотока в группе «ОГ» снизилась ($p < 0,05$; тест Вилкоксона), а в группе «АНОГ» продолжила нарастать. На 21-е сутки воздействия выявлены достоверные различия между обеими группами ($p < 0,05$; тест Манна – Уитни).

На 6-е сутки воздействия значимых изменений в размере периваскулярной зоны выявлено не было, но к 21-м суткам воздействия отмечена тенденция к увеличению размера ПЗ в группе «АНОГ», не достигающая уровня достоверности (рис. 4).

В ходе 2-й серии эксперимента выявлены следующие изменения.

В обеих группах к 6-му дню воздействия отмечена динамика увеличения диаметра артериального отдела капилляра, которая сохранялась до конца воздействия (рис. 5). Выявлены достоверные внутригрупповые изменения в группе «ОГ24» с постоянным углом ($p < 0,05$, тест Вилкоксона) и в группе «ОГ16» с переменным углом ($p < 0,01$, тест Вилкоксона). Достоверных межгрупповых различий выявлено не было.

В группе с постоянным углом к 6-м суткам воздействия отмечено уменьшение линейной скорости, в группе с переменным углом изменений выявлено не было (рис. 6). К 14-м суткам исследования в группе с постоянным углом скорость кровотока увеличилась и вернулась к уровню фоновых значений. В

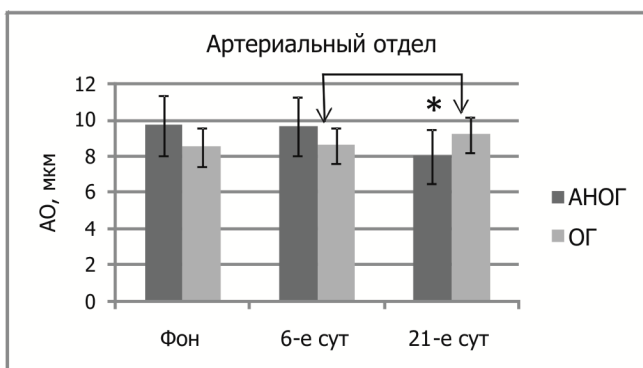


Рис. 2. Динамка изменений артериального отдела капилляров в группах «АНОГ» и «ОГ».

* – $p < 0,01$, межгрупповые различия, тест Манна – Уитни; $\leftrightarrow$ – $p < 0,01$, внутригрупповые различия, тест Вилкоксона

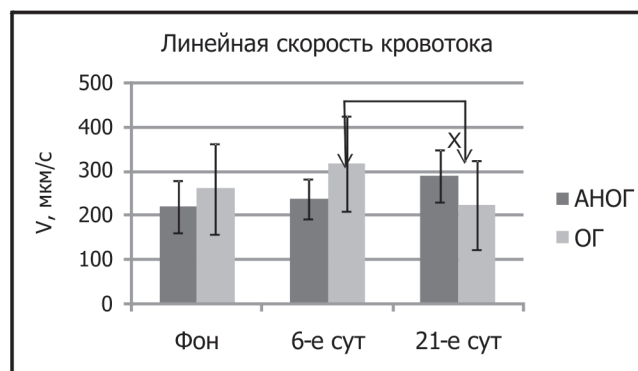


Рис. 3. Динамка изменений линейной скорости кровотока в группах «АНОГ» и «ОГ».

× – $p < 0,05$, межгрупповые различия, тест Манна – Уитни; $\leftrightarrow$ – $p < 0,01$, внутригрупповые различия, тест Вилкоксона

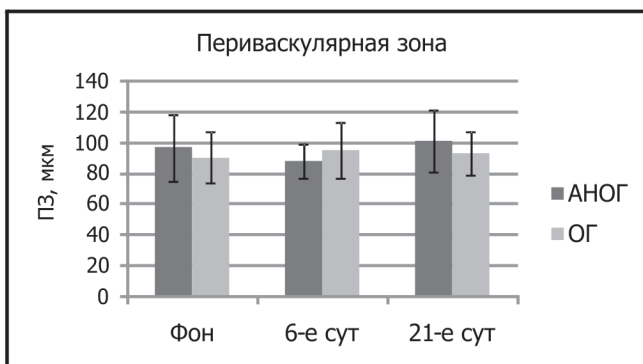


Рис. 4. Динамка изменений периваскулярной зоны капилляров в группах «АНОГ» и «ОГ»

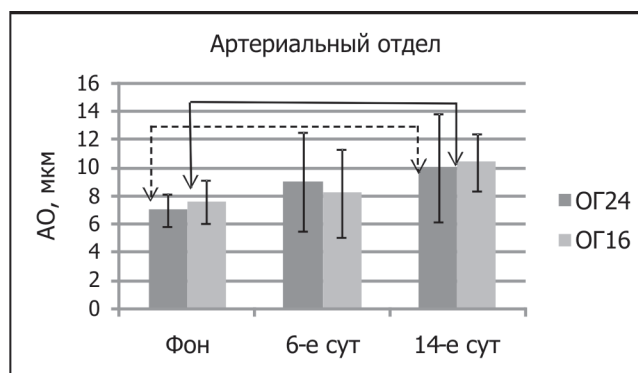


Рис. 5. Динамка изменений артериального отдела капилляров в группе с постоянным и переменным углом воздействия.

$\leftrightarrow$ – $p < 0,01$, внутригрупповые различия, тест Вилкоксона; $\leftrightarrow$ – $p < 0,05$, внутригрупповые различия, тест Вилкоксона

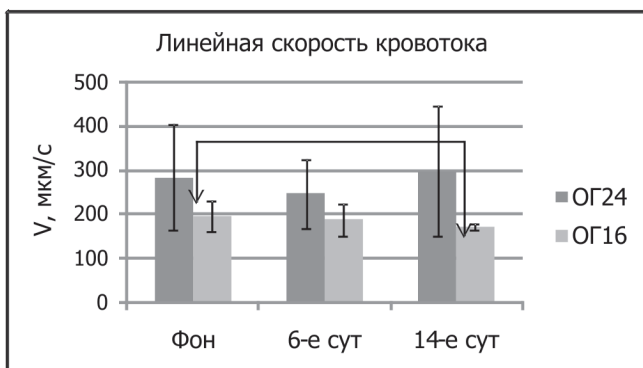


Рис. 6. Динамка изменений линейной скорости кровотока в группе с постоянным и переменным углом воздействия.

$\leftrightarrow$ – $p < 0,01$, внутри групповые различия, тест Вилкоксона

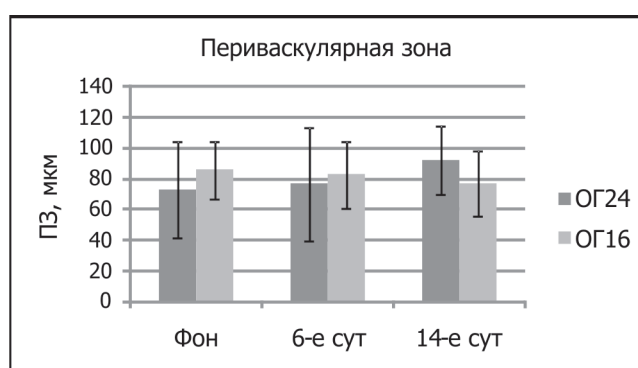


Рис. 7. Динамка изменений периваскулярной зоны в группе с постоянным и переменным углом воздействия

тоже время, в группе с переменным углом отмечено достоверное снижение скорости по сравнению с исходными значениями ($p < 0,01$, тест Вилкоксона).

В группе с постоянным углом выявлена тенденция к увеличению периваскулярной зоны, в группе с переменным углом – тенденция к уменьшению в ходе эксперимента (рис. 7).

Выводы

1. Антиортостатическая и ортостатическая гипокинезии по-разному влияют на артериальный сегмент микроциркуляторного русла. В первую очередь это выражается в артериальной вазоконстрикции и увеличении линейной скорости кровотока, присущих антиортостатическому положению. При сохранении условий гипокинезии, но изменении угла наклона испытуемого вазоконстрикция сменяется вазодилатацией и снижением линейной скорости кровотока.

2. В ходе 2-й серии эксперимента получены данные, свидетельствующие об отсутствии значимого влияния поструральных изменений тела в течение суток на тонус артериальных отделов капилляров. Однако линейная скорость кровотока демонстрирует достоверное снижение в группе с переменным углом наклона тела. Вероятных объяснений этого факта может быть много, но в данном исследовании точно определить ведущие механизмы не представляется возможным. Значимых изменений со стороны венозного сегмента капиллярного русла выявлено не было.

3. Размеры периваскулярной зоны, характеризующие проницаемость сосудистой стенки, имели минимальную тенденцию к увеличению в группах с антиортостатической гипокинезией и ортостатической гипокинезией без изменения положения тела в течение суток. Однако уровня достоверности они не достигали.

Список литературы

1. Атьков О.Ю., Бедненко В.С. Гипокинезия, невесомость: клинические и физиологические аспекты. М., 1989. At'kov O.Yu., Bednenko V.S. Hypokinesia and weightlessness: clinical and physiologic aspects. M., 1989.
2. Григорьев А.И., Баранов В.М. Сердечно-сосудистая система человека в условия космического полета // Вестник РАМН. 2003. Т. 12. С. 41–45. Grigoriev A.I., Baranov V.M. Human cardiovascular system in the conditions of a space flight // Vestnik RAMN. 2003. V. 12. P. 41–45.
3. Григорьев А.И., Бугров С.А., Богомолов В.В. и др. Обзор основных медицинских результатов годового полета на станции «Мир» // Косм. биол. и авиакосм. мед. 1990. Т. 24. № 5. С. 3–10. Grigoriev A.I., Bugrov S.A., Bogomolov V.V. et al. Review of the major medical results of the 1-year flight on space station «Mir» // Kosmicheskaya biologiya i aviakosmicheskaya meditsina. 1990. V. 24. № 5. P. 3–10.

4. Arbeille P., Herault S., Fomina G. et al. Influences of thigh cuffs on the cardiovascular system during 7-day head-down bed rest // J. Applied Physiol. 1999. V. 87. № 6. P. 2186–2176.

5. Baevsky R.M., Baranov V.M., Funtova I.I. et al. Autonomic cardiovascular and respiratory control during prolonged spaceflights aboard the International Space Station // Ibid. 2007. V. 103. № 1. P. 156–161.

6. Астахов Д.А., Баранов М.В., Панченков Д.Н. Физиологические эффекты микрогравитации как факторы риска заболеваний в космическом полете // Патол. физиология и эксперим. терапия. 2012. № 2. С. 70–76. Astakhov D.A., Baranov M.V., Panchenkov D.N. Physiological effects of microgravity as risk factors of diseases during space flight // Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya. 2012. № 2. P. 70–76.

7. Баранов М.В., Катунцев В.П., Шпаков А.В., Баранов В.М. Метод наземного моделирования физиологических эффектов пребывания человека в условиях гипогравитации // Бюллетень эксперим. биологии и медицины. 2015. Т. 160. № 9. С. 392–396. Baranov M.V., Katuntsev V.P., Shpakov A.V., Baranov V.M. The method of terrestrial modeling of physiological effects of human presence in conditions of hypogravitation // Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. 2015. V. 160. № 9. P. 392–396.

8. Генин А.М., Какурин Л.И. 30-суточный эксперимент с моделированием физиологических эффектов невесомости // Косм. биология и медицина. 1972. № 4. С. 26–28. Genin A.M., Kakurin L.I. 30-day experiment with the modeling of the physiological effects of weightlessness // Kosmicheskaya biologiya i meditsina. 1972. № 4. P. 26–28.

Поступила 26.09.2017

THE RESEARCH OF PERIPHERAL MICROCIRCULATION WITH A LONG STAY IN HEAD-UP BED REST AND HEAD-DOWN BED REST

Rudenko E.A., Puchkova A.A., Baranov M.V.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 67–70

The aim of the study was to investigate the effect of constant and variable tilt angle of head-down bed rest (HDBR) and head-up bed rest (HUBR) on the parameters of microcirculation in humans. The results of 2 series of the experiment are presented in the article. It has been shown that arterial vasoconstriction and the increase in the linear velocity of blood flow are specific to HDBR. Opposite changes were marked under the conditions of HUBR. The postural changes of the body during the day do not influence significantly the tone of the arterial parts of the capillaries and the blood flow velocity.

Key words: microcirculation, head-down bed rest (HDBR), head-up bed rest (HUBR).

УДК 616.3-018.1.001.42:629.78

ЭКСПРЕССИЯ ПРОТЕАЗ В ТУЧНЫХ КЛЕТКАХ ОРГАНОВ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ МОНГОЛЬСКИХ ПЕСЧАНОК ПОСЛЕ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

Атякшин Д.А.¹, Бурцева А.С.², Ильин Е.А.³, Алексеева Н.Т.², Шишкина В.В.²

¹НИИ экспериментальной биологии и медицины, Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко Минздрава России

²Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н.Бурденко Минздрава России

³Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

E-mail: earth-mars38@yandex.ru

Для космической биологии и медицины особый интерес представляют протеазы тучных клеток (ТК) в связи с их способностью к ремоделированию соединительной ткани. Известны влияния протеаз ТК на активацию матриксных металлопротеаз, состояние фибробластов, регуляцию клеточной пролиферации, ангиогенез и др. Однако экспрессия триптазы и химазы ТК в условиях космического полета (КП) ранее не изучалась. В данной работе проведен анализ протеазного профиля популяции ТК тощей кишки, желудка и печени у 3 групп монгольских песчанок: виварийного контроля, синхронного эксперимента и 12-суточного орбитального полета на космическом аппарате «Фотон-М3», а также 2 групп в эксперименте по моделированию некоторых эффектов невесомости в наземных условиях: виварийного контроля и антиортостатического вывешивания. Идентификация протеаз проводилась после иммуногистохимического окрашивания антителами к триптазе и химазе ТК. Окрашенные срезы изучались на исследовательском микроскопе Zeiss Axio Imager.A2. Множественное иммуномаркирование протеаз оценивалось с помощью флуоресцентной микроскопии. После КП на фоне снижения количества ТК в исследуемых органах происходило перераспределение соотношения протеаз, которое заключалось в возрастании доли химаза-позитивных ТК и ТК с одновременным содержанием триптазы и химазы. Такое изменение экспрессии протеаз наблюдалось как в слизистой, так и соединительнотканной субпопуляциях ТК желудка и тощей кишки. В то же время относительное содержание триптаза-позитивных ТК в изучаемых органах пищеварительной системы снижалось. Моделирование факторов КП в условиях синхронного эксперимента не вызывало столь существенных изменений в протеазном профиле популяций ТК изученных органов. Возрастание экспрессии химазы в условиях КП может свидетельствовать об участии ТК в регуляции состояния сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: тучные клетки, монгольские песчанки, космический полет, пищеварительная система, триптаза, химаза.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 71–79.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-71-79

С каждым годом в космической отрасли нарастает научно-технический базис, позволяющий увеличивать длительность пребывания человека в условиях орбитального полета. Это требует дальнейшего целенаправленного изучения механизмов адаптации к условиям измененной гравитации и разработки путей преодоления негативного влияния на организм стрессовых факторов. Органы желудочно-кишечного тракта являются представителями систем, обеспечивающих полноценность адаптивных реакций организма к действию внешних факторов, в том числе носящих продолжительный характер. Высокая активность исследований биологии тучных клеток (ТК) показала многогранные возможности биоэффектов их секрета в формировании уникальных клеточно-тканевых взаимосвязей, обеспечивающих постоянство внутренней среды и в некоторых условиях, играющих ключевую роль в индукции ряда патологических и адаптивных процессов на различных уровнях организации живой материи [1–5]. Полученные в последние годы данные свидетельствуют о выраженной полифункциональности протеаз ТК в отношении состояния внеклеточного матрикса, таргетных клеток и ремоделирования тканевого микроокружения. В связи с вышеизложенным изучение механизмов адаптации организма к факторам космического полета (КП), в том числе невесомости, должно быть неразрывно связано с изучением биологического действия секрета ТК [6]. Однако к настоящему времени работ в данной области недостаточно.

Целью проведенного исследования стало изучение протеазного профиля ТК желудка, тощей кишки и печени монгольских песчанок под воздействием измененной гравитации в КП и при моделировании физиологических эффектов невесомости в наземных условиях.

Методика

Объектами исследования послужили ТК желудка, тощей кишки и печени монгольских песчанок

Meriones unguiculatus (самцов) нескольких групп. Группа полетного эксперимента, реализованного в рамках научно-исследовательского проекта 12-суточного орбитального полета космического аппарата «Фотон-М3», состояла из 12 животных. Группа синхронного наземного эксперимента включала 11 монгольских песчанок, пребывавших 12 сут в макете полетной аппаратуры «Контур-Л», моделирующей ряд условий КП. Третью группу составили 12 виварийных животных. Декапитация животных группы полетного эксперимента была осуществлена через 21 ч после посадки спускаемого аппарата. Имитирование некоторых физиологических эффектов невесомости было проведено с помощью антиортостатического вывешивания по методике Ильина – Новикова в интерпретации Морей-Холтон [7]. Этот эксперимент включал 2 группы животных: 8 из них подвергались 12-суточному антиортостатическому вывешиванию, 8 служили виварийной группой. Биоматериал желудка, тощей кишки и печени был получен в ФГБУН ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН (Москва) с соблюдением всех необходимых требований по гуманному обращению с животными в соответствии с решением Комиссии по биомедицинской этике ИМБП (протокол № 206 от 07.10.2007 г.). Дальнейшее исследование проводилось на базе НИИ экспериментальной биологии и медицины ВГМУ им. Н.Н. Бурденко.

После 24–48-часовой фиксации в 10%-ном нейтральном формалине при комнатной температуре фрагменты фундальной зоны желудка, середины левой доли печени и тощей кишки в процессе стандартной процедуры пробоподготовки были залиты в парафин. Для проведения иммуноморфологического анализа на полуавтоматическом ротационном микротоме Accu-Cut® SRM™ 200 (Sakura Finetek Europe B.V.) подготовили гистологические срезы толщиной 1 мкм. В желудке и тощей кишке проводили раздельное изучение мукозной и соединительнотканной субпопуляций ТК, локализованных в собственной пластинке слизистой оболочки и в интерстиции других оболочек соответственно. В печени ТК представлены только соединительнотканной субпопуляцией.

Для идентификации протеаз ТК использовали иммуногистохимическое окрашивание. По стандартному протоколу иммуномаркирования [8] детектировали триптазу с помощью мышиных моноклональных антител (Anti-Mast Cell Tryptase antibody, AbCam, #ab2378, разведение 1 : 2000). Гомологичные мышиные иммуноглобулины блокировали во время предварительной инкубации срезов неконъюгированными Fab-фрагментами (Goat anti-mouse IgG, Jackson ImmunoResearch, #115-007-003, разведение 1 : 13). Для окрашивания химазы применялись конъюгированные с биотином кроличьи поликлональные антитела к

данной протеазе ТК (Mast cell Chymase/CHYMASE Antibody, Biotin Conjugated, Bioss, #bs-2353R-Biotin, разведение 1 : 500). Пероксидазу хрена использовали согласно протоколу производителя (AmpliStain™ Horse radish Peroxidase conjugates, SDT GmbH, Baesweiler, Germany) для детекции связанных первичных и вторичных антител с помощью светлопольной микроскопии. Для визуализации ферментной метки использовали набор с 3,3'-диаминобензидином в роли субстрата (DAB substrate kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Перед заключением препаратов ядра окрашивались гематоксилином Майера.

Солокализацию протеаз в ТК определяли при флуоресцентной микроскопии после инкубации с первичными антителами в разведении 1 : 500 к химазе и 1 : 2000 к триптазе в течение ночи при температуре +4 °C. Далее с помощью стрептавидина (Streptavidin AlexaFluor 488, # S11223) проводили идентификацию связанных с биотином антихимазных антител и визуализировали с помощью соответствующего фильтра. Конъюгированные с Cy3 вторичные антитела (CyTM3-conjugated AffinPure Goat Anti Mouse IgG, #115-165-166, 10 мг / мл PBS) применяли для детекции антитриптазных первичных антител. Ядра докрашивали DAPI (5 мкг/мл PBS, 15 с) и заключали срезы во временную монтажную среду Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA). Техника окрашивания для флуоресцентной микроскопии выполнялась по стандартному протоколу [8].

Окрашенные срезы изучали с помощью аппаратно-программного комплекса на основе исследовательского микроскопа ZEISS Axio Imager.A2 (Carl Zeiss Microscopy, Germany) с системой документирования. Программное обеспечение ZEN 2.3 (blue edition, Carl Zeiss, Germany) применялось для анализа полученных изображений с использованием монохромной камеры Camera AxioCam 503 mono (при флуоресцентной микроскопии) и цветной камеры Camera AxioCam 506 color (для светлопольной микроскопии). Подсчет ТК проводили на полях зрения размером 700 x 500 мкм, полученных при использовании объектива x20. Изучаемые на микропрепарате площади не пересекались между собой. В каждом срезе исследовали не менее 15 полей зрения. При подсчетах показателей характеристик популяций ТК использовали как абсолютные величины, так и относительные, вычисляемые в % от общего количества. Программное обеспечение Zen 2.3 (Carl Zeiss Microscopy, Germany) применялось для статистической обработки полученной информации. Т-критерий Стьюдента использовался при нормальном распределении данных для установления достоверности различий.

Таблица 1

Содержание триптаза- и химаза-позитивных ТК в органах пищеварительной системы монгольских песчанок (методика выявления – иммуногистохимическое окрашивание, на п/з)

Группа животных	Субпопуляция ТК Орган	Методика идентификации ТК					
		Триптаза ТК			Химаза ТК		
		Тощая кишка	Желудок	Печень	Тощая кишка	Желудок	Печень
ВК	МТК	Эксперимент «Роденция»					
		39,6 ± 2,2	4,4 ± 0,3	3,2 ± 0.4	2,6 ± 0,4	Единичные	Единичные
	СТТК	2,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2		Единичные	1,1 ± 0,2	
СЭ	МТК	42,4 ± 2,8	4,3 ± 0,3	2,9 ± 0,2	2,8 ± 0,2	Единичные	Единичные
	СТТК	2,8 ± 0,3	1,4 ± 0,1		0,4 ± 0,0*	1,3 ± 0,1	
КП	МТК	28,6 ± 1,1*, **	2,6 ± 0,2*,**	2,2 ± 0,2*, **	7,8 ± 0,8***	1,2 ± 0,1***	1,8 ± 0,2*, **
	СТТК	2,1 ± 0,2*, **	1,4 ± 0,2		2,2 ± 0,1***	1,5 ± 0,1***	
Моделирование физиологических эффектов 12-суточной невесомости							
ВК	МТК	36,8 ± 2,7	4,1 ± 0,7	2,9 ± 0,3	2,9 ± 0,2	Единичные	Единичные
	СТТК	2,4 ± 0,3	1,4 ± 0,1		Единичные	1,2 ± 0,1	
АОВ	МТК	33,4 ± 2,5	4,8 ± 0,4	3,8 ± 0,2*	3,6 ± 0,1*	0,3 ± 0,1*	0,8 ± 0,2*
	СТТК	2,9 ± 0,3	1,7 ± 0,2		0,5 ± 0,1*	1,4 ± 0,1	

Примечание. Здесь и в табл. 2: ВК – виварийный контроль; СЭ – синхронный эксперимент; КП – космический полет; АОВ – антиортостатическое вывешивание.

МТК – мукозная субпопуляция тучных клеток; СТТК – соединительнотканная субпопуляция тучных клеток; * – $p < 0,05$ по сравнению с виварийным контролем; ** – $p < 0,05$ по сравнению с синхронным экспериментом.

Таблица 2

Протеазный профиль тучных клеток органов пищеварительной системы монгольских песчанок (методика идентификации – множественное иммуномаркирование, флуоресцентная микроскопия, в %)

Группы животных	Орган	Мукозная субпопуляция ТК			Соединительнотканная субпопуляция ТК		
		ТК _{ТР}	ТК _{ХИМ}	ТК _{ТР+ХИМ}	ТК _{ТР}	ТК _{ХИМ}	ТК _{ТР+ХИМ}
		Эксперимент «Роденция»					
ВК	Тошая кишка	89,8 ± 3,1	6,1 ± 0,2	4,1 ± 0,2	94,3 ± 3,3	3,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1
	Желудок	91,1 ± 2,3	3,2 ± 0,2	5,7 ± 0,4	45,4 ± 2,8	27,3 ± 3,4	27,3 ± 3,4
	Печень ¹	-	-	-	97,2 ± 2,4	0,9 ± 0,2	1,9 ± 0,1
СЭ	Тошая кишка	90,6 ± 4,4	6,0 ± 0,4	3,4 ± 0,3	84,8 ± 4,2*	12,1 ± 1,1*	3,1 ± 0,2*
	Желудок	89,4 ± 4,2	3,8 ± 0,3	6,8 ± 0,3	43,4 ± 4,2	26,3 ± 2,3	30,3 ± 2,5
	Печень ¹	-	-	-	97,1 ± 3,3	0,7 ± 0,1	2,2 ± 0,3
КП	Тошая кишка	65,7 ± 4,5*,**	17,9 ± 1,1*,**	16,4 ± 1,2*,**	33,3 ± 2,8*,**	34,9 ± 3,4*,**	31,8 ± 2,5*,**
	Желудок	25,4 ± 0,2*,**	28,4 ± 1,9*,**	46,2 ± 3,3*,**	24,2 ± 2,2*,**	36,7 ± 3,6*,**	39,1 ± 3,9*,**
	Печень ¹	-	-	-	21,3 ± 2,8*,**	22,4 ± 1,2*,**	56,3 ± 1,8*,**
Моделирование физиологических эффектов невесомости							
ВК	Тошая кишка	90,1 ± 3,1	5,4 ± 0,3	4,5 ± 0,5	93,4 ± 3,2	4,2 ± 0,3	2,4 ± 0,2
	Желудок	87,6 ± 4,2	6,2 ± 0,5	6,2 ± 0,4	43,2 ± 3,1	25,7 ± 2,7	31,1 ± 1,4
	Печень ¹	-	-	-	96,5 ± 2,9	1,5 ± 0,1	2,0 ± 0,3
АОВ	Тошая кишка	79,5 ± 3,2*	8,3 ± 0,4*	12,2 ± 0,9*	81,4 ± 4,5*	9,2 ± 0,6*	9,4 ± 0,5*
	Желудок	65,0 ± 3,5*	12,6 ± 1,1*	22,4 ± 2,0*	26,2 ± 1,9*	35,6 ± 3,1*	38,2 ± 2,2*
	Печень ¹	-	-	-	76,3 ± 3,8*	5,4 ± 0,6*	18,3 ± 1,1*

Примечание. ТК_{ТР} – триптаза-позитивные тучные клетки; ТК_{ХИМ} – химаза-позитивные тучные клетки; ТК_{ТР+ХИМ} – тучные клетки с одновременной экспрессией триптазы и химазы; * – $p < 0,05$ по сравнению с виварийным контролем, ** – $p < 0,05$ по сравнению с синхронным экспериментом. ¹ – ТК печени представлены соединительнотканной субпопуляцией.

Результаты и обсуждение

При изучении микропрепаратов желудка экспериментальных животных определили, что для виварийной группы характерно превалирование в слизистой оболочке триптаза-позитивных ТК, экспрессия химазы выявлялась эпизодически. В соединительнотканной субпопуляции ТК, локализованной в подслизистой и мышечной оболочках, преобладали ТК, экспрессирующие химазу. При изучении подслизистой оболочки выявили большее количество химаза-позитивных ТК, число которых лишь немного уступало триптаза-позитивным ТК по сравнению с уровнем в слизистой оболочке (табл. 1). На это указывает также протеазный профиль ТК, свидетельствующий о более высоком содержании ТК как с экспрессией исключительно химазы, так и обеих протеаз одновременно в соединительной ткани подслизистой, мышечной и серозной оболочек (табл. 2).

Наибольшее количество ТК в тощей кишке виварийной группы животных можно было выявить с помощью иммуногистохимической идентификации триптазы. Триптаза-позитивные ТК формировали группы, однако могли располагаться и поодиночке. В слизистой оболочке они чаще находились в межкрипальной строме. Некоторые ТК локализовались на границе слизистой и подслизистой оболочек. В цитоплазме ТК хорошо визуализировались триптаза-позитивные гранулы, которые обладали просветлением в центральной части. Встречались триптазасодержащие гранулы, располагавшиеся на некотором расстоянии от ТК, что являлось отражением их секреторной деятельности. Кроме того, обращала на себя внимание различная степень интенсивности окрашивания ТК при иммуногистохимическом выявлении триптазы, что, видимо, в определенной степени свидетельствовало о различном содержании данного фермента в ТК. Определение протеазного профиля ТК в популяции показало существенное преобладание триптазасодержащих клеток над химаза-экспрессирующими. Число триптаза-позитивных ТК как в слизистой оболочке, так и в других оболочках тощей кишки было превалирующим. Вместе с этим по сравнению с соединительнотканной субпопуляцией ТК в собственной пластинке слизистой оболочки тощей кишки относительная экспрессия химазы была несколько выше, что следует из анализа протеазного профиля субпопуляции. Реже всего ТК тощей кишки обладали экспрессией химазы. При этом можно говорить о единичных клетках в пределах мышечной и подслизистой оболочек тощей кишки монгольских песчанок.

В печени животных триптаза-позитивные ТК составляли незначительное число, локализуясь преимущественно в пределах соединительной ткани

портальных трактов и центральных вен, тогда как химаза-позитивные ТК практически не обнаруживались (см. табл. 1).

В условиях синхронного эксперимента протеазный профиль ТК стенки желудка и печени изменялся в незначительной степени. Количество триптаза-позитивных и химазасодержащих ТК не имело достоверных отличий от показателей монгольских песчанок группы виварийного контроля. В подслизистой оболочке тощей кишки после синхронного эксперимента в ТК усиливалась экспрессия химазы (см. табл. 1). Среди соединительнотканых ТК наблюдали изменение протеазного профиля в сторону возрастания экспрессии химазы (см. табл. 2).

После КП в микропрепаратах желудка имело место снижение количества триптаза-позитивных ТК в собственной пластинке слизистой оболочки (см. табл. 1). Однако параллельно с этим в слизистой оболочке происходило достоверное возрастание численности химаза-позитивных ТК по сравнению с синхронным экспериментом как в абсолютных, так и в относительных значениях (см. табл. 1, 2). Изменения протеазного профиля отражали увеличение экспрессии химазы после КП, особенно в слизистой оболочке. Следует подчеркнуть, что отмечалось возрастание численности ТК, экспрессирующих не только химазу, но также одновременно триптазу и химазу (см. табл. 2).

В стенке тощей кишки происходило сокращение популяции ТК, что следует из анализа биоматериала после иммуногистохимического выявления триптазы. Количественные подсчеты показали уменьшение объема триптаза-позитивных ТК в строме тощей кишки монгольских песчанок. Такие изменения обнаруживались как в мукозной, так и в субмукозной субпопуляциях. Триптаза-позитивные ТК иногда формировали скопления, в которых контактировали друг с другом. Со стороны триптазасодержащих ТК выявлялась выраженная интенсификация дегрануляции. В частности, как в слизистой оболочке, так и в других оболочках тощей кишки активизировался экзоцитоз. При этом триптаза-позитивные гранулы обнаруживались на достаточном расстоянии от ТК, свободно локализуясь в межкрипальной строме слизистой оболочки. Очевидно, последствия интенсивной дегрануляции могли приводить к тому, что после КП объем цитоплазмы ТК снижался, отражая поступление биологических активных веществ в строму. Иногда триптаза-позитивные гранулы составляли всего один ряд в цитоплазме, располагаясь перинуклеарно. Триптазасодержащие ТК обнаруживались и в строме ворсин. После КП происходило возрастание представительства химазасодержащих ТК как в собственной пластинке слизистой оболочки, так и в других оболочках тощей кишки (см. табл. 1). Достоверно по сравнению с показателями животных группы синхронного

эксперимента и виварийного контроля повышалась численность ТК, содержащих обе протеазы либо только химазу, прежде всего в пределах подслизистой и мышечной оболочек.

В печени животных полетной группы повышалось представительство химазасодержащих ТК (см. табл. 1). Это происходило как за счет увеличения представительства химаза-позитивных ТК, так и ТК с одновременной экспрессией химазы и триптазы (см. табл. 2). Возрастание уровня продукции химазы следует рассматривать как важный компенсаторный механизм адаптации органа к условиям КП.

После антиортостатического вывешивания по сравнению с показателями виварийной группы животных в слизистой оболочке желудка повышалась численность химазасодержащих ТК (см. табл. 1). Определение протеазного профиля показало, что как в мукозной, так и в типичной субпопуляциях ТК усиливалась экспрессия химазы (см. табл. 2). Особенно заметно это наблюдалось в ТК собственной пластинки слизистой оболочки. В то же время абсолютное количество триптазасодержащих ТК, хорошо идентифицируемых в стенке желудка, практически не менялось по сравнению с показателями виварийной группы животных (см. табл. 1).

В слизистой оболочке тощей кишки отмечали только формирование тенденции к снижению числа и некоторое возрастание в подслизистой и мышечной оболочках триптаза-позитивных ТК. Часто наблюдались картины экзоцитоза триптазасодержащих гранул. Обращало на себя внимание также увеличение уровня химаза-позитивных ТК как в слизистой оболочке, так и подслизистой. При исследовании протеазного профиля популяции ТК было также показано усиление экспрессии химазы в ТК. При этом с большей частотой выявлялись не только ТК с экспрессией химазы, но и с содержанием обеих протеаз одновременно. Соответственно достоверно снижалось количество ТК, экспрессирующих только одну триптазу. Обнаруживались картины экзоцитоза химаза-позитивных гранул, которые не наблюдались в такой выраженности у животных виварийного контроля.

В печени условия антиортостатического вывешивания приводили к активизации экспрессии химазы, проявляющейся как в химазасодержащих ТК, так и за счет значительного роста числа ТК с одновременной экспрессией триптазы и химазы. В то же время после КП по сравнению с модельным экспериментом в ТК более существенно возрастала экспрессия химазы.

Известно, что в сравнении с остальными клетками иммунной системы ТК содержат наибольший спектр пептидаз как в количественном, так и в качественном отношении [2]. Протеазы ТК локализируются в цитоплазме главным образом в гранулах, упаковка которых осуществляется с помощью

серглицин-гликозаминогликанового комплекса [9]. У человека ТК делят на 3 группы по экспрессии специфических сериновых протеаз: триптаза-позитивные, химазасодержащие и с одновременной экспрессией триптазы и химазы, – среди которых первые преобладают. Триптаза обладает более широким спектром биоэффектов, оказывающим влияние на формирование клеточного и внеклеточного фенотипа в определенных условиях внешней среды [3, 4]. Полученные экспериментальные данные о роли триптазы и химазы за последние несколько лет позволяют рассматривать эти протеазы в качестве перспективных объектов исследования и в лабораторных экспериментах, и при поиске новых мишеней фармакологической коррекции различных заболеваний [5, 10–12].

Химаза обладает способностью к превращению ангиотензина I в ангиотензин II вне зависимости от ангиотензинпревращающего фермента, что, безусловно, имеет особое значение для регуляции артериального давления [13]. Ангиотензин II повышает экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) различными клетками. В КП возрастание экспрессии химазы может представлять определенную компенсацию снижению биогенеза триптазы, поддерживая гиперсекреторное состояние желудка в условиях микрогравитации. Химаза может гидролитически инактивировать пептиды, такие, как брадикинин [14], а также некоторые нейропептиды, в том числе, вещество Р и вазоинтестинальный пептид [15]. Это свойство позволяет химазе, в отличие от триптазы инактивировать определенные бронхоконстрикторы, которые, возможно, ограничивают дегрануляцию ТК. Химаза принимает участие в модулировании воспаления путем влияния на активизацию ряда интерлейкинов [16]. Также химаза способна расщеплять аллергены и некоторые белки крови [17], фактор роста гепатоцитов [18], эндогенные иммунные белки, в том числе интерлейкин-6 и интерлейкин-13 [19]. В аспекте тканевого ремоделирования важны эффекты химазы по отношению к локальной активации матриксных металлопротеиназ (ММП) 1 и 3, с последующей деградацией ряда элементов внеклеточного матрикса [20]. В присутствии гепарина значительно возрастала скорость, с которой химаза активировала некоторые ММП как путем ускорения расщепления их предшественников, так и с помощью предотвращения его дальнейшей деградации. В частности, химаза активировала ММП-1 непосредственно путем расщепления лейцина и треонина без образования каких-либо промежуточных продуктов [21].

Выявление химаза-позитивных ТК в органах пищеварительной системы монгольских песчанок существенно расширило возможности интерпретации их деятельности в органе в ответ на внешние

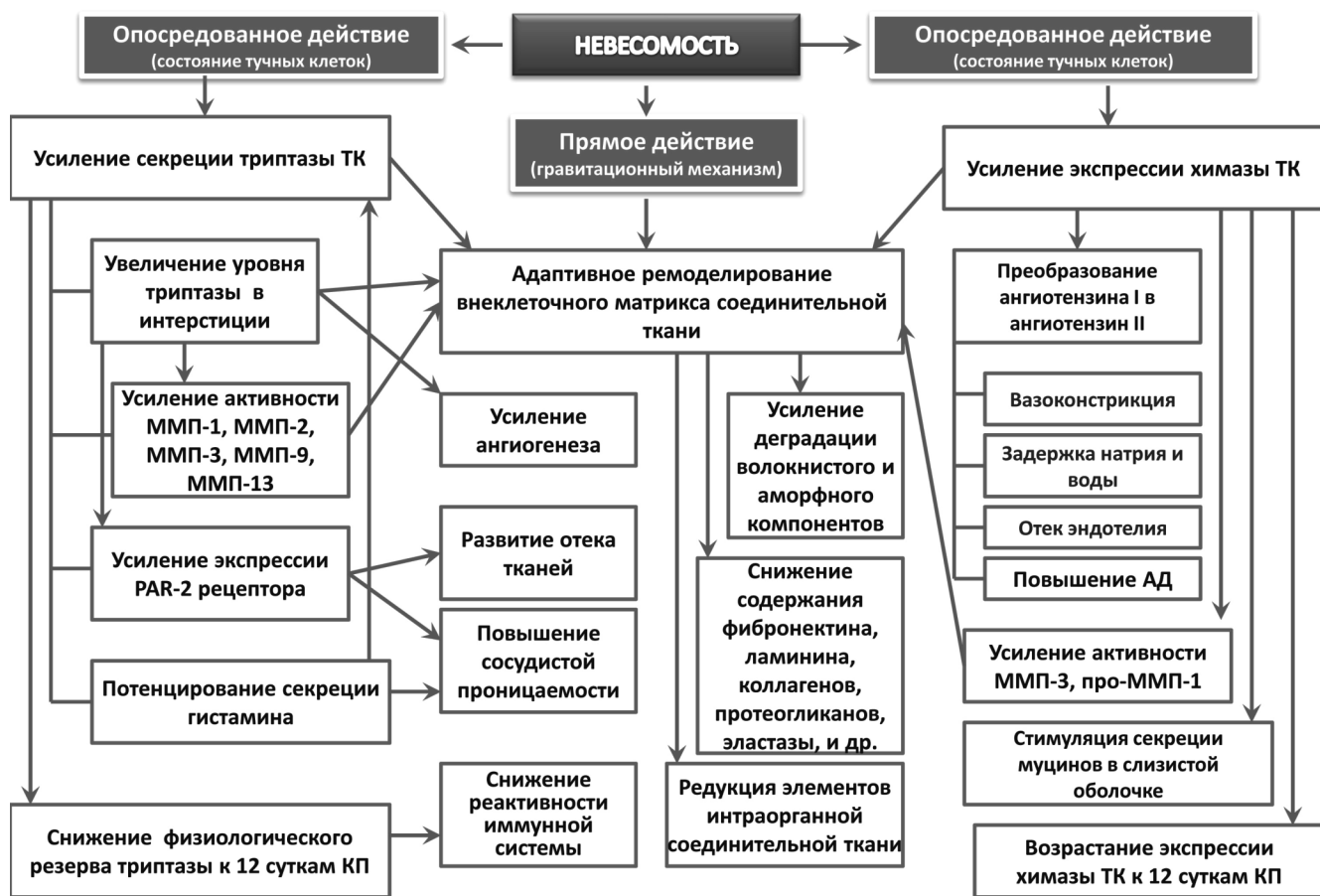


Рисунок. Участие протеаз ТК в развитии адаптации органов пищеварительной системы монгольских песчанок к условиям невесомости

воздействия. Несмотря на то, что их содержание у виварийных животных незначительно, обращает на себя внимание существенное возрастание экспрессии химазы после КП и в меньшей степени после моделирования физиологических эффектов невесомости. Это показывает важнейшую адаптивную роль химазы ТК по отношению к факторам КП, в частности невесомости.

Другая протеаза ТК – триптаза, также обладает высокой биологической активностью по отношению ко многим клеточным и неклеточным компонентам тканей [22]. Эффекты секреции триптазы могут быть как локальными, ограничиваясь влиянием на близлежащие клетки и структуры, так и более распространенными, затрагивая некоторые органы (например, при астматическом бронхоспазме), вплоть до генерализации при системном мастоцитозе или анафилаксии [23]. Обнаружено, что собственные продукты биосинтеза ТК могут приводить к дальнейшему усилению их дегрануляции по механизму положительной обратной связи, потенцируя высвобождение медиаторов. Показан аутокринный механизм активирующего действия триптазы на дегрануляцию ТК, который может распространяться

и в отношении эозинофильных гранулоцитов [23]. Возможно, именно этот механизм приводил к существенному расходованию триптазы ТК в первое время пребывания лабораторных животных в условиях невесомости, следствием чего было истощение физиологического резерва, что и наблюдалось после КП.

Клеточно-тканевые эффекты триптазы можно разделить на провоспалительные и противовоспалительные [24]. Однако в большинстве случаев триптаза является инициатором воспалительных реакций, сопровождающихся повышением проницаемости капилляров и интенсивностью рекрутинга гранулоцитов [25]. Триптаза принимает участие в ангиогенезе, деградации волокнистого и аморфного компонентов внеклеточного матрикса соединительной ткани, высвобождении факторов роста, что может происходить опосредованно с вовлечением ММП. ММП способны вызывать деградацию практически всех элементов соединительной ткани, секретирясь клетками в виде неактивных предшественников.

Снижение количества ТК в органах пищеварительной системы в условиях невесомости может

уменьшать интенсивность воспалительных реакций, если в них возникнет необходимость для реализации иммунного ответа. Среди биологических эффектов триптазы необходимо упомянуть ее способность стимулировать культивируемые сосудистые эндотелиальные клетки к формированию про-васкулярных трубчатых образований. В литературе рассматривается несколько механизмов влияния триптазы, способствующих росту и дифференциации новых кровеносных сосудов [23]. Возможно, что интенсивная секреция триптазы в первое время орбитального полета приводит к дополнительному образованию сосудов в слизистой оболочке желудка и кишечника. Такие процессы могут лежать в основе развития отека слизистой оболочки, а также являться одной из причин реализации гемодинамического механизма гиперсекреторного состояния желудка в условиях микрогравитации [26]. При этом возможна и генерализация этого эффекта триптазы, поскольку данная протеаза приводит к потенцированию высвобождения гистамина. Гистамин, в свою очередь, стимулирует дальнейшее усиление секреции триптазы, способствуя распространению сигнала из одной группы активированных тучных клеток к другим [27]. Триптаза же инактивирует прокоагулянтные протеины, в частности, кининоген и фибриноген [28]. Повышение сосудистой проницаемости под действием триптазы происходит опосредованно путем увеличения образования кининов. Кроме того, триптаза индуцирует экспрессию интерлейкина-1 и интерлейкина-8 из эндотелиальных клеток, что может сочетаться с возрастанием синтеза белка межклеточной адгезии ICAM-1 и увеличением лейкоцитарной инфильтрации тканей, а также дальнейшим развитием отека тканей на определенной территории [23]. Также данный эффект пролонгируется из-за способности триптазы разрушать нейропептиды, в том числе вазоинтестинальный пептид.

В то же время дефицит триптазы в стенке желудка и тощей кишки, развивающийся к 12-м суткам КП, может приводить и к дефициту митогенного эффекта триптазы на гладкие миоциты. Данный факт в дальнейшем может быть причиной истончения гладкомышечного пласта в стенке полых органов пищеварительного тракта и отражаться на моторной деятельности пищеварительной трубки [29].

Таким образом, высокое содержание триптазы и химазы в ТК позволяет принимать им активное участие в координации интегративно-метаболического состояния соединительной ткани в условиях КП [30]. Модификация протеазного профиля ТК оказывает непосредственное влияние на адаптивное ремоделирование внеклеточного матрикса соединительной ткани в условиях измененной гравитации (рисунок).

Выводы

После орбитального полета и наземного моделирования физиологических эффектов невесомости происходило изменение соотношения протеаз в ТК органов пищеварительной системы монгольских песчанок, обусловленное усилением экспрессии химазы. Это свидетельствует о тесной вовлеченности ТК органов желудочно-кишечного тракта в процессы адаптации к факторам КП.

Список литературы

1. *Atiakshin D. et al.* Characterization of mast cell populations using different methods for their identification // *Histochemistry and Cell Biol.* 2017. DOI: 10.1007/s00418-017-1547-7.
2. *Trivedi N.N., Caughey G.H.* Mast cell peptidases: chameleons of innate immunity and host defense // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2010. V. 42. № 3. P.257–267.
3. *Mulloy B., Lever R., Page C.P.* Mast cell glycosaminoglycans // *Glycoconjugate J.* 2016. DOI:10.1007/s10719-016-9749-0.
4. *Hernandez-Hernandez L. et al.* Tryptase: Genetic and functional considerations // *Allergol. Immunopathol. (Madr).* 2012. V. 40. № 6. P. 385–389.
5. *Caughey G.H.* Mast cell proteases as pharmacological targets // *Eur. J. Pharmacol.* 2016. V. 778. P. 44–55.
6. *Атякшин Д.А., Бурцева А.С., Алексеева Н.Т.* Триптаза как полифункциональный компонент секрета тучных клеток // *Журн. анатомии и гистопатологии.* 2017. Т. 6. № 1. С. 121–132.
7. *Atiakshin D.A., Burtseva A.S., Alekseeva N.T.* Tryptase as a multifunctional component of mast cell secretion // *Zhurnal anatomii i gistopatologii.* 2017. V. 6. № 1. P. 121–132.
8. *Morey-Holton E.* The hindlimb unloading rat model: Literature overview, technique update and comparison with space flight data // *Experimentation with animal models in space* / G. Sonnenfeld, ed. 2005. P. 7–40.
9. *Immunohistochemistry: Basics and methods.* 1st edition / I.B. Buchwalow, W. Boecker, eds. London; N.Y., 2010.
10. *Ronnberg E., Melo F.R., Pejler G.* Mast cell proteoglycans // *Histochem. Cytochem.* 2012. V. 60. № 12. P. 950–962.
11. *Ammendola M. et al.* Mast cell-targeted strategies in cancer therapy // *Transfus. Med. Hemother.* 2016. V. 43. № 2. P. 109–113.
12. *Singh J., Shah R., Singh D.* Targeting mast cells: Uncovering prolific therapeutic role in myriad diseases // *Inter. Immunopharmacol.* 2016. V. 40. P.362–384.
13. *Vitte J.* Human mast cell tryptase in biology and medicine // *Mol. Immunol.* 2015. V. 63. № 1. P. 18–24.
14. *Wintroub B.U. et al.* A human lung mast cell chymotrypsin like enzyme. Identification and partial characterization // *J. Clin. Invest.* 1986. V. 77. P. 196–201.

14. Reilly C.F. et al. Inactivation of bradykinin and kallidin by cathepsin G and mast cell chymase // *Biochem. Bioph. Res. Commun.* 1985. V. 127. P. 443–449.

15. Franconi G.M. et al. Mast cell tryptase and chymase reverse airway smooth muscle relaxation induced by vasoactive intestinal peptide in the ferret // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989. V. 248. P. 947–951.

16. Mizutani H. et al. Rapid and specific conversion of precursor interleukin I β (IL β) to an active IL-1 species by human mast cell chymase // *J. Exp. Med.* 1991. V. 174. P. 821–825.

17. Raymond W.W. et al. Albumin is a substrate of human chymase: prediction by combinatorial peptide screening and development of a selective inhibitor based on the albumin cleavage site // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 34517–34524.

18. Raymond W.W. Mast cell and neutrophil peptidases attack an inactivation segment in hepatocyte growth factor to generate NK4-like antagonists // *Ibid.* 2006. V. 281. P. 1489–1494.

19. Zhao W. et al. Cytokine production by skin-derived mast cells: endogenous proteases are responsible for degradation of cytokines // *J. Immunol.* 2005. V. 175. P. 2635–2642.

20. Lees M., Taylor D.J., Woolley D.E. Mast cell proteinases activate precursor forms of collagenase and stromelysin, but not of gelatinases A and B // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 223. № 1. P. 171–177.

21. Saarinen J. et al. Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 18134–18140.

22. Wernersson S., Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle // *Nat. Rev. Immunol.* 2014. V. 14. № 7. P. 478–494.

23. Caughey G.H. Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense // *Immunol. Rev.* 2007. V. 217. P. 141–154.

24. Yu M. et al. Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice // *J. Clin. Invest.* 2006. V. 116. P. 1633–1641.

25. Krystal Whittemore M. et al. Mast cell: a multifunctional master cell // *Front Immunol.* 2016. V. 6. Art. 620. P. 1–12.

26. Афонин Б.В. Гемодинамический механизм, определяющий возникновение гиперсекреторного состояния желудка в условиях микрогравитации // *Авиакосм. и экол. мед.* 2013. Т. 47. № 4. С. 10–11.

Afonin B.V. The hemodynamic mechanism determining the emergence of a hypersecretory state of the stomach in microgravity conditions // *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina.* 2013. V. 47. № 4. P. 10–11.

27. Molinari J.F. et al. Inhaled tryptase causes bronchoconstriction in sheep via histamine release // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996. V. 154. P. 649–653.

28. Thomas V.A. et al. Human mast cell tryptase fibrinogenolysis: kinetics, anticoagulation mechanism, and cell adhesion disruption // *Biochem.* 1988. V. 37. P. 2291–2298.

29. Атякшин Д.А. и др. Тканеспецифичные особенности реакции слизистой тощей кишки монгольских песчанок при воздействии факторов космического полета на биоспутнике «Фотон-М3» // *Авиакосм. и экол. мед.* 2011. Т. 45. № 2. С. 25–30.

Atyaksin D.A. et al. Tissue-specific features of the reaction of the mucous membrane of the jejunum of Mongolian gerbils under the influence of space flight factors on the «Foton-M3» biosatellite // *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina.* 2011. V. 45. № 2. P. 25–30.

30. Омельяненко Н.П., Слуцкий Л.И. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). Т. 1. / С.П. Миронов, ред. М., 2009.

Omelyanenko N.P., Slutskiy L.I. Connective tissue (histophysiology and biochemistry). V. 1. / S.P. Mironov, ed. Moscow, 2009.

Поступила 17.10.2017

PROTEASE EXPRESSION IN MAST CELLS OF DIGESTIVE ORGANS OF MONGOLIAN GERBILS AFTER SPACEFLIGHT

Atiakshin D.A., Burtseva A.S., Ilyin E.A., Alexeeva N.T., Shishkina V.V.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 71–79

Mast cell proteases are reported to be of special interest for space biology and medicine due to their ability to remodel the connective tissue. Mast cell proteases are known to have effects on matrix metalloproteases, fibroblast status, regulation of cellular proliferation, angiogenesis and others. However, tryptase and chymase mast cell expression in space flight conditions has not been studied yet. In this study a protease profile of mast cell population of the jejunum, stomach and liver has been analyzed in 3 groups of Mongolian gerbils: a vivarium control group, a group of synchronic experiment and a group of 12-day orbital flight on the space module «Foton-M3»; 2 experimental groups on simulating certain effects of gravity-free state in ground-based conditions were also involved in the study: a vivarium control group and a group of anti-orthostatic hanging. Protease identification was performed after immunohistochemical staining by antibodies to mast cell tryptase and chymase. Stained media were studied on the research microscope Zeiss Axio Imager A2. Multiple immunostaining was evaluated using fluorescent microscopy. After the space flight protease proportion was redistributed on the background of decreased number of mast cells in the investigated organs: the proportion of chymase-positive mast cells and mast cells with simultaneous content of chymase and tryptase increased. Such alteration of protease expression was observed in both

– mucous and connective-tissue sub-populations of mast cells of the stomach and jejunum. Simultaneously, relative level of tryptase-positive mast cells in the investigated digestive organs decreased. Simulation of spaceflight factors in conditions of the synchronic experiment did not result in such significant alterations in the protease profile of mast

cell populations of the investigated organs. Conspicuous is the fact that chymase expression after the spaceflight has increased; this may support mast cell participation in regulation of the cardiovascular system condition.

Key words: mast cells, Mongolian gerbils, spaceflight, the digestive system, tryptase, chymase.

УДК 612.133

МЕХАНИЗМЫ ЭНДОТЕЛИЙ-ЗАВИСИМОГО РАССЛАБЛЕНИЯ РАЗНЫХ АРТЕРИЙ МЫШИ: СВЯЗЬ С ИЗМЕНЕНИЯМИ В ПОЛЕТНОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ «БИОН-М1»

Кирюхина О.О.^{1, 2, 3}, Гайнуллина Д.К.^{1, 3}, Тарасова О.С.^{1, 3}, Виноградова О.Л.^{1, 3}

¹Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

²Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

E-mail: ost.msu@gmail.com

Проверена гипотеза о различии механизмов эндотелий-зависимой регуляции тонуса гладких мышц сосудистой стенки базилярной и подкожной артерий мыши, демонстрирующих различные изменения в полетном эксперименте «Бион-М1». С использованием специфических блокаторов показано, что расслабление изолированных препаратов этих артерий в ответ на ацетилхолин связано с влиянием 2 сигнальных путей – NO и эндотелиального гиперполяризующего фактора (EDHF). В подкожной артерии дефицит одного из этих путей эндотелиального влияния может компенсироваться повышением активности другого. В базилярной артерии такого перераспределения механизмов эндотелий-зависимого расслабления не наблюдается, поэтому дефицит NO или EDHF в условиях космического полета может приводить к уменьшению расширительных реакций при активации эндотелия.

Ключевые слова: мелкие артерии, мышь, головной мозг, кожа, эндотелий, космический полет.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 80–84.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-80-84

Эндотелий играет важную роль в регуляции тонуса кровеносных сосудов. В здоровом организме преобладают вазорелаксирующие влияния эндотелия, которые в основном опосредуются 3 факторами: оксидом азота (NO), простациклином и эндотелиальным гиперполяризующим фактором (EDHF) [1, 2]. Патологическое изменение секреторной активности эндотелия (так называемая дисфункция эндотелия) служит маркером многих циркуляторных расстройств и лежит в основе нарушения кровоснабжения органов и тканей при артериальной или легочной гипертензии, атеросклерозе, сахарном диабете и многих других заболеваниях [3].

Дисфункция эндотелия может развиваться под влиянием факторов космического полета (КП). Во-первых, в условиях микрогравитации наблюдается изменение градиента гидростатического давления и скорости кровотока в органах [4, 5], что ведет к изменению структуры эндотелиального слоя и

секреторной активности клеток эндотелия [6, 7]. Во-вторых, влияние космических излучений также приводит к долговременному нарушению эндотелиальной функции [8, 9]. Показано, что в результате комбинированного воздействия этих факторов КП в артериях скелетных мышц происходит ослабление эндотелий-зависимой вазодилатации [8], что может быть одной из причин неадекватного кровоснабжения работающей скелетной мускулатуры.

В эксперименте «Бион-М1» впервые были даны характеристики реакции эндотелий-зависимого расслабления артерий разных органов у мышей после 30-суточного КП [10, 11]. Было показано, что в артерии головного мозга (базилярной артерии, *a. basilaris*) у мышей полетной группы наблюдается полное подавление эндотелий-зависимой релаксации в ответ на ацетилхолин [10]. Однако в артерии, снабжающей кровью кожу задней конечности (подкожной артерии, *a. saphena*), реакции на ацетилхолин у полетной группы, напротив, были несколько увеличенными по сравнению с контролем [11]. Эти наблюдения позволяют предположить, что характер сосудистых изменений в условиях КП зависит от особенностей функционирования ткани, которую питает кровью данный тип артерий. Также следует отметить, что вклад различных механизмов эндотелиального влияния может существенно различаться в артериальных сосудах разного порядка ветвления, а также в артериях разных органов [1, 2].

Целью данной работы была проверка гипотезы о зависимости характера изменений эндотелиальной функции в разных артериях мыши под действием условий КП от присущих этим артериям механизмов эндотелий-зависимой регуляции тонуса гладкой мышцы. С использованием специфических блокаторов исследовали вклад NO, простациклина и EDHF в базилярной и подкожной артериях мыши, продемонстрировавших различные изменения в эксперименте «Бион-М1».

Методика

В экспериментах использовали самцов мышей линии C57/Bl6 в возрасте 2–3 мес. Протокол исследования был одобрен Комиссией по биомедицинской этике Института проблем передачи информации РАН (протокол № 12-051).

Эвтаназию животных проводили путем цервикальной дислокации. Органы (головной мозг и заднюю конечность) помещали в чашки Петри с охлажденным до 4 °С физиологическим раствором и выделяли исследуемые артерии (базиллярную и подкожную). Из артерий вырезали кольцевые сегменты длиной 2 мм и помещали их в камеры изометрического миографа (модель 620M, DMT, Дания). В просвет каждого сегмента продевали 2 струны из нержавеющей стали (диаметр 40 мкм) и прикрепляли их к головкам миографа, одна из которых была соединена с датчиком силы, а другая – с микроманипулятором. Раствор в камере миографа имел следующий состав (мМ): NaCl 120; NaHCO₃ 26; KCl 4,5; CaCl₂ 1,6; MgSO₄ 1,0; NaH₂PO₄ 1,2; D-глюкоза 5,5; EDTA 0,025; HEPES 5,0, аэрация 5 % CO₂ + 95 % O₂ для поддержания pH 7,4. Показания датчиков силы оцифровывали с частотой 10 Гц и записывали на жесткий диск компьютера с помощью аналого-цифрового преобразователя E14 140 (L Card, Россия) и программы PowerGraph 3.3 (ДИСофт, Россия).

После нагрева миографа до 37 °С определяли растяжение, оптимальное для сокращения препарата [12]. Затем препараты активировали путем проведения 2 циклов сокращения (3 мин) и расслабления (5 мин). Сокращение препаратов базиллярной артерии вызывали с помощью вещества U46619 (агонист рецепторов тромбоксана A₂, ключевого регулятора тонуса мозговых артерий [13], концентрация 1 мкМ). Для препаратов подкожной артерии в качестве вазоконстриктора использовали фенилэфрин (агонист α1-адренорецепторов, концентрация 10 мкМ).

Для определения максимальной силы, которую может развить данный препарат, регистрировали сократительные ответы на U46619 (для базиллярной артерии) или фенилэфрин (для подкожной артерии), постепенно увеличивая концентрацию вазоконстриктора в камере миографа до максимальной. Затем проводили отмывку (10–15 мин) и вызывали сокращение сосуда на 50–80 % от максимально возможной силы; на фоне этого предсокращения исследовали эндотелий-зависимое расслабление на ацетилхолин, также постепенно увеличивая его концентрацию в камере миографа.

Для определения вклада различных путей эндотелиального влияния проводили блокаду NO-синтазы (L-NNA, 100 мкМ), циклооксигеназы (индометацин, 10 мкМ), а также Ca²⁺-активируемых калиевых каналов средней и малой проводимости

(TRAM-34, 1 мкМ, и UCL-1684, 0,1 мкМ соответственно), для устранения действия EDHF [14]. Блокаторы добавляли в камеру миографа за 15–20 мин до тестирования реакций на ацетилхолин. Все фармакологические препараты были получены из фирмы Sigma (США), кроме U46619, который был получен от Cayman Chemicals (США).

Обработку результатов проводили в программе PowerGraph 3.3. Определяли прирост силы при действии каждой из концентраций фенилэфрина или U46619, а также максимальное значение силы в зависимости «концентрация – эффект». Величину реакций на различные концентрации ацетилхолина оценивали по снижению силы сокращения препарата в процентах от предварительного сокращения.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием дисперсионного анализа для повторных измерений. В тексте и на рисунках данные представлены как среднее и стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Аппликация ацетилхолина приводила к расслаблению артериальных препаратов, которое достигало максимума при концентрации агониста 3·10⁻⁶ М. При этом в отсутствие блокаторов величина максимальной реакции на ацетилхолин для подкожной артерии (рисунок Б, Г, Е) была больше, чем для базиллярной артерии (см. рис., А, В, Д). В обеих артериях эндотелий-зависимое расслабление практически полностью подавлялось после блокады всех 3 путей эндотелиального влияния (с использованием комбинации L-NNA, индометацина, TRAM-34 и UCL-1684, см. рис., А–Е).

Блокада синтеза NO с использованием L-NNA приводила к сопоставимому уменьшению расслабления в обеих артериях: в базиллярной артерии – на 60 % (см. рис., А), в подкожной – на 50 % (см. рис., Б). Дополнительное ингибирование циклооксигеназы индометацином не сопровождалось дальнейшим уменьшением релаксации артерий в ответ на ацетилхолин (см. рис., В, Г) по сравнению с реакциями в присутствии только L-NNA (см. рис. А, Б); напротив, наблюдалось некоторое увеличение реакций расслабления. На основании этого наблюдения можно предположить, что в базиллярной и подкожной артериях мыши основным продуктом метаболизма арахидоновой кислоты по циклооксигеназному пути является не вазодилататор простаглицлин, а другие простаноиды, вызывающие сокращение гладких мышц артериальной стенки [15]. Таким образом, NO играет значительную роль в эндотелий-зависимом расслаблении обеих артерий в ответ на ацетилхолин, тогда как вклад простаноидов относительно невелик. Эти компоненты эндотелий-зависимой релаксации сопоставимы в 2 артериях мыши (базиллярной и подкожной).

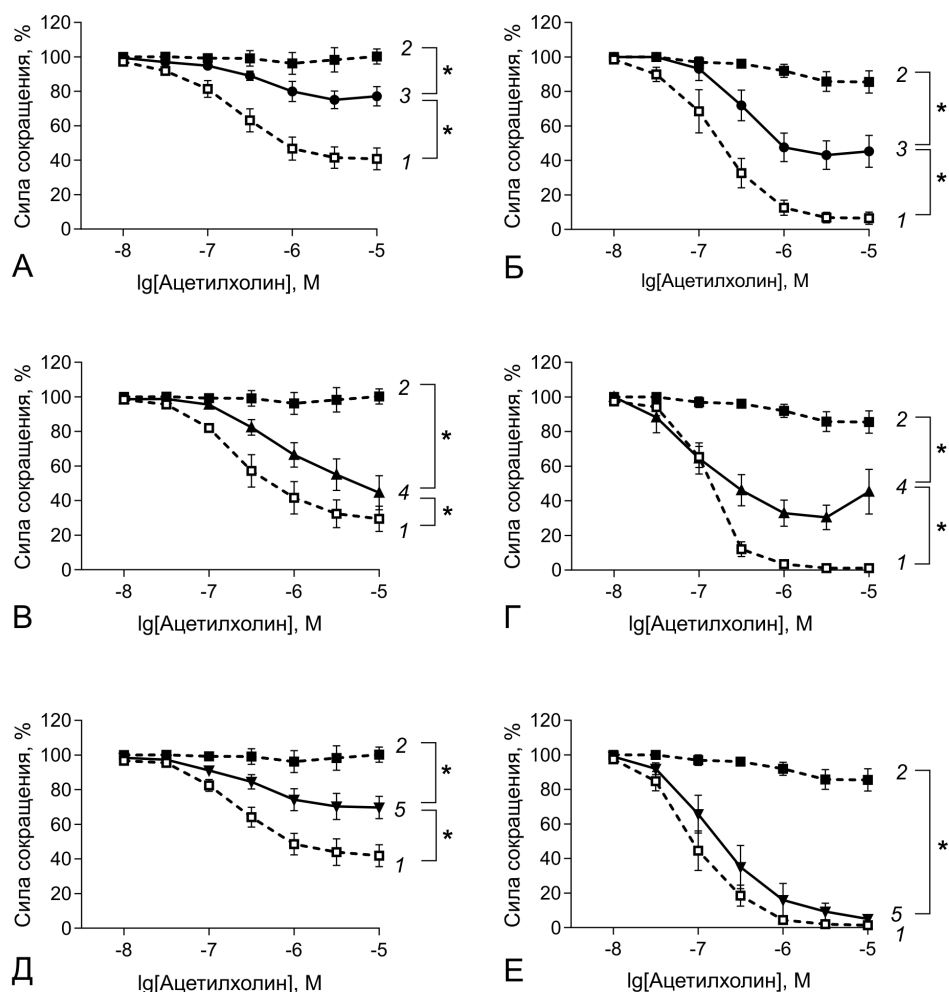


Рисунок. Результаты фармакологического анализа механизмов эндотелий-зависимого расслабления базилярной (А, В, Д) и подкожной (Б, Г, Е) артерий мыши в ответ на ацетилхолин.

1 – реакции базилярной ($n = 15$) и подкожной ($n = 9$) артерий в отсутствие блокаторов; 2 – реакции базилярной ($n = 5$) и подкожной ($n = 5$) артерий после блокады всех путей эндотелиального влияния. Цифрами 3 на рисунках А и Б обозначены реакции базилярной ($n = 12$) и подкожной ($n = 6$) артерий в присутствии L-NNA ($n = 12$), цифрами 4 на рис. В и Г – реакции базилярной ($n = 7$) и подкожной ($n = 5$) артерий в присутствии комбинации L-NNA и индометацина, а цифрами 5 на рис. Д и Е – реакции базилярной ($n = 8$) и подкожной ($n = 5$) артерий в присутствии комбинации TRAM-34 и UCL-1684 ($n = 7$); * – $p < 0,05$ (дисперсионный анализ для повторных измерений)

Вместе с тем регуляторные последствия блокады EDHF-пути в 2 артериях принципиально различались. При блокаде Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов малой и средней проводимости реакции расслабления базилярной артерии уменьшались примерно вдвое (см. рис., Д), тогда как в подкожной артерии это воздействие не приводило к статистически значимому уменьшению расслабления (см. рис., Е), несмотря на то, что в условиях совместной блокады циклооксигеназы и NO-синтазы в подкожной артерии наблюдался выраженный EDHF-компонент реакции (расстояние между кривыми 2 и 4 на рис., Г).

Таким образом, базилярная и подкожная артерии мыши различаются по механизмам влияния эндотелия

на тонус гладких мышц сосудистой стенки. Реакции расслабления базилярной артерии обусловлены аддитивным влиянием 2 путей – NO и EDHF, каждый из которых обеспечивает приблизительно половину суммарной реакции расслабления. В подкожной артерии блокада NO-пути ведет к мощному компенсаторному увеличению вклада пути EDHF, т.е. в исходных условиях действие NO тормозит активность EDHF-пути. Действие NO может ослаблять повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме эндотелиальных клеток [16] и тем самым тормозить влияние Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов, необходимое для реализации EDHF.

Можно предположить, что выявленное перераспределение путей эндотелиального влияния может

обеспечивать нормальное функционирование эндотелия подкожной артерии в условиях КП. В этой артерии дефицит одного из путей может компенсироваться повышением активности другого: снижение активности эндотелиального NO-пути может компенсироваться повышением вклада EDHF, а снижение активности EDHF – повышением вклада NO.

В базилярной артерии компенсаторное перераспределение компонентов эндотелий-зависимого расслабления отсутствует, что может быть причиной нарушения эндотелий-зависимого расслабления этой артерии в условиях КП. В результате эндотелий артерий мозга оказывается более уязвимым к влиянию факторов КП, чем эндотелий периферических артерий. Нарушение эндотелий-зависимой регуляции тонуса артерий мозга может быть причиной сужения диапазона адаптивных изменений мозгового кровотока после длительных КП [9].

Выводы

1. Базилярная и подкожная артерии мыши, демонстрирующие различные изменения в полетном эксперименте «Бион-М1», различаются по механизмам эндотелий-зависимой регуляции тонуса гладких мышц сосудистой стенки.

2. При действии ацетилхолина расслабление обеих артерий связано с влиянием 2 сигнальных путей – NO и EDHF.

3. В подкожной артерии дефицит одного из этих путей эндотелиального влияния может компенсироваться повышением активности другого.

4. В базилярной артерии такого перераспределения механизмов эндотелий-зависимого расслабления не наблюдается, поэтому дефицит NO или EDHF в условиях КП может приводить к уменьшению расширительных реакций при активации эндотелия.

Работа выполнена по Плану фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН и при финансовой поддержке гранта Президиума РАН.

Список литературы

1. Trigg C.R., Samuel S.M., Ravishankar S. et al. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2012. V. 90. P. 713–738.
2. Гайнуллина Д.К., Кирюхина О.О., Тарасова О.С. Оксид азота в эндотелии сосудов: регуляция продукции и механизмы действия // *Успехи физиол. наук.* 2013. Т. 44. С. 88–102.
- Gaynullina D.K., Kiryukhina O.O., Tarasova O.S. Nitric oxide in vascular endothelium: control of production and mechanisms of action // *Uspekhi fiziologicheskikh nauk.* 2013. V. 44. P. 88–102.

3. Vanhoutte P.M., Zhao Y., Xu A., Leung S.W.S. Thirty years of saying NO // *Circ. Res.* 2016. V. 119. P. 375–396.
4. Watenpaugh D., Hargens A. The cardiovascular system in microgravity. *Handbook of Physiology (Environmental Physiology)*. Bethesda: American Physiological Society. 1996. P. 631–674.
5. Zhang L.F. Region-specific vascular remodeling and its prevention by artificial gravity in weightless environment // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2013. V. 113. P. 2873–2895.
6. Zhang L.F. Vascular adaptation to microgravity: what have we learned? // *J. Appl. Physiol.* 2001. V. 91. P. 2415–2430.
7. Prisby R.D., Wilkerson M.K., Sokoya E.M. et al. Endothelium-dependent vasodilation of cerebral arteries is altered with simulated microgravity through nitric oxide synthase and EDHF mechanisms // *J. Appl. Physiol.* 2006. V. 101. P. 348–353.
8. Ghosh P., Behnke B.J., Stabley J.N. et al. Effects of high-LET radiation exposure and hindlimb unloading on skeletal muscle resistance artery vasomotor properties and cancellous bone microarchitecture in mice // *Radiat. Res.* 2016. V. 185. P. 257–266.
9. Delp M.D., Charvat J.M., Limoli C.L. et al. Apollo Lunar astronauts show higher cardiovascular disease mortality: possible deep space radiation effects on the vascular endothelium // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 29901.
10. Sofronova S.I., Tarasova O.S., Gaynullina D. et al. Spaceflight on the «Bion-M1» biosatellite alters cerebral artery vasomotor and mechanical properties in mice // *J. Appl. Physiol.* 2015. V. 118. P. 830–838.
11. Тарасова О.С., Софронова С.И., Борзых А.А. и др. Влияние условий космического полета на вазомоторные реакции мелких артерий разных органов // *Космический научный проект «Бион-М1»: медико-биологические эксперименты и исследования.* М., 2016. С. 310–317.
- Tarasova O.S., Sofronova S.I., Borzykh A.A. et al. Influence of space flight conditions on vasomotor reactions of small arteries of different organs. *Space scientific project «Bion-M1» biomedical experiments and research.* Moscow, 2016. P. 310–317.
12. Mulvany M.J., Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats // *Circ. Res.* 1977. V. 41. P. 19–26.
13. Toth P., Rozsa B., Springo Z. et al. Isolated human and rat cerebral arteries constrict to increases in flow: role of 20-HETE and TP receptors // *J. Cereb. Blood. Flow Metab.* 2011. V. 31. P. 2096–2105.
14. Garland C.J., Hiley C.R., Dora K.A. EDHF: spreading the influence of the endothelium // *Br. J. Pharmacol.* 2011. V. 164. P. 839–852.
15. Féférou M., Huang Y., Vanhoutte P.M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products // *Ibid.* P. 894–912.
16. Bauersachs J., Popp R., Hecker M. et al. Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor // *Circ.* 1996. V. 94. P. 3341–3347.

Поступила 17.10.2017

MECHANISMS OF ENDOTHELIUM-DEPENDENT RELAXATION OF DIFFERENT MURINE ARTERIES: RELATIONSHIP TO THE ALTERATIONS IN «BION-M1» FLIGHT EXPERIMENT

Kiryukhina O.O., Gaynullina D.K., Tarasova O.S., Vinogradova O.L.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 80–84

This study proved the hypothesis that basilar and saphenous murine arteries, which demonstrated qualitatively different

alterations in the «Bion-M1» flight experiment, differ in the mechanisms of endothelium-dependent regulation of their smooth muscle tone. Using specific blockers, it was shown that relaxation of both isolated arteries in response to acetylcholine is mediated by 2 signaling pathways – NO and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF). In saphenous artery, the deficiency of one of these endothelial pathways can be compensated by an increase in the activity of the other. In the basilar artery such a redistribution of the mechanisms of endothelium-dependent relaxation is not observed, therefore, a deficiency of either NO or EDHF due to space flight conditions may suppress endothelium-dependent control of vascular tone.

Key words: mouse, small arteries, brain, skin, endothelium, microgravity.

УДК 616-092.9

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ ПРОФИЛЬ СПИННОГО МОЗГА МЫШИ ПОСЛЕ 30-СУТОЧНОГО КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА НА БИОСПУТНИКЕ «БИОН-М1» И ПОСЛЕДУЮЩЕЙ 7-СУТОЧНОЙ РЕАДАПТАЦИИ НА ЗЕМЛЕ

Кузнецов М.С.¹, Резвяков П.Н.¹, Лисюков А.Н.¹, Волков К.Д.¹, Исламов Р.Р.^{1, 2}, Никольский Е.Е.^{1, 2}

¹Казанский государственный медицинский университет

²Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

E-mail: qmaxksmu@yandex.ru

Проведено полногеномное исследование поясничного утолщения спинного мозга мышей линии C57BL/6J после 30-суточного космического полета на биоспутнике «Бион-М1» и мышей, прошедших последующую 7-суточную реадaptацию на Земле. Сравнительный биоинформационный анализ транскриптомного профиля спинного мозга мышей после 30-суточного космического полета, проведенный нами ранее, и мышей, прошедших период реадaptации, выявил дифференциальную экспрессию 178 генов (118 генов с повышенной экспрессией и 60 – с пониженной), участвующих в работе 60 метаболических и сигнальных путей. Так, гены с повышенной экспрессией имеют непосредственное отношение к кальциевым сигнальным путям (CALM, CaN), путям метаболизма аминокислот (RIMKLA, CBS), глицерофосфолипидов (LPSAT, LPEAT), сигнальным путям митоген-активируемой протеинкиназы (RasGRP, CACN, MEK1), направленного роста аксонов (EphA, Robo1, TRPC). Среди генов с пониженной экспрессией представляют интерес участники молекулярных каскадов, ответственные за деградацию жирных кислот (CPT1, ACOX3), окислительное фосфорилирование (Cyt1, SDHA, COX10), сигнальных путей апоптоза (CASP3, TRAF2), пероксисомального окисления (PEX1, SOD). Полученные данные свидетельствуют о вовлечении в механизмы реадaptации после пребывания в условиях невесомости, как каскадов, отвечающих за развитие гипогравитационного двигательного синдрома, так и внутриклеточных сигнальных путей, активированных в течение недели в условиях земной гравитации.

Ключевые слова: гипогравитационный двигательный синдром, полногеномное исследование, транскриптомный профиль, «Бион-М1», ДНК-микрочипы.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 85–87.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-85-87

Исторически развитие жизни на Земле происходило в условиях влияния различных сил, которые можно считать постоянными или меняющимися в узких диапазонах. Примерами таких воздействий являются гравитация, магнитное поле Земли,

интенсивность ионизирующих излучений. В условиях космического полета (КП) живой организм сталкивается с экстремальными изменениями внешней среды, которые выходят за пределы адаптационных механизмов, выработанных в ходе эволюции, что приводит к развитию разнообразных патологических состояний, клиническое проявление которых становится особенно выражено при реадaptации к земным условиям. Одним из таких патологических состояний является гипогравитационный двигательный синдром (ГДС), характеризующийся глубокими нарушениями активности основных проприоцептивных афферентаций, систем моторного контроля, а также специфическими изменениями скелетных мышц. В первую очередь страдают так называемые постуральные, или позно-тонические, мышцы, отвечающие за поддержание позы в условиях нормального гравитационного поля [2, 7]. Наряду с атрофией скелетных мышц, изменяется соотношение входящих в них типов мышечных волокон и экспрессия мышечно-специфических белков [11], электрофизиологические свойства мембраны мышечных волокон и функциональные характеристики мионевральных синапсов [4]. Показано, что патогномичные признаки имеют место в скелетной мышце и после повреждения периферического нерва [5], что хорошо укладывается в представление о том, что в системе «мотонейрон – скелетная мышца» оба клеточных партнера находятся в информационно-зависимости друг от друга. На этом основании была высказана гипотеза о том, что важная роль в патогенезе ГДС принадлежит изменениям, происходящим в мотонейронах, иннервирующих соответствующие мышцы [1, 2, 7].

Изучение молекулярных механизмов патогенеза ГДС у животных, находившихся в КП, стало возможным благодаря реализации проекта «Бион-М1». Для проверки справедливости данной гипотезы ранее нами было выполнено полногеномное исследование поясничного отдела спинного мозга мышей после 30 сут КП [3]. С позиции интереса к

патогенезу ГДС следует отметить изменения экспрессии генов, вовлеченных в каскады метаболизма азота, биосинтеза ненасыщенных жирных кислот, направленного роста аксонов, клеточной адгезии. При этом продолжительность этих изменений и характер адаптации к естественной гравитации на Земле остаются малоизученными. Целью данного исследования являлось полногеномное исследование поясничного утолщения спинного мозга мышей после 30-суточного КП на биоспутнике «Бион-М1» и последующей 7-суточной реадaptации на Земле (группа «Восстановление»). Сравнительный биоинформационный анализ проводили, основываясь на транскриптомный профиль поясничного отдела спинного мозга мышей после 30-суточного полета (группа «Полет») [3].

Эксперименты были проведены на взрослых самцах мышей линии C57BL/6J (питомник лабораторных животных «Пушино», г. Пушино, Московская обл.). В рамках проекта «Бион-М1» мыши в течение 30 сут находились в условиях КП на биоспутнике «Бион-М1». После приземления биоспутника мыши (группа «Восстановление») проходили период реадaptации к условиям гравитации на Земле в стандартных условиях вивария в течение 7 суток ($n = 2$). По завершении периода реадaptации животных выводили из эксперимента, поясничный отдел спинного мозга помещали в жидкий азот и хранили при температуре -80°C . Общую РНК выделяли при помощи RNeasy Kit (Qiagen, Германия), качество РНК подтверждали с помощью 2100 Bioanalyzer (Agilent, США) и использовали в реакции обратной транскрипции для полученной кДНК, которую исследовали с помощью ДНК-микрочипов Mouse Development Microarray Kit 4×44000 (Agilent, США). Предобработку, анализ полученных данных, обогащение метаболических и сигнальных путей проводили с использованием статистической среды R и дополнительных пакетов репозитория CRAN и Bioconductor. Полученные с помощью ДНК-микрочипов данные об экспрессии генов с внесенной фоновой поправкой стандартизировали методом квантильной нормализации. Анализ дифференциальной экспрессии генов проводили с помощью t-теста Уэлча [10]. На основании анализа графиков Volcano различия считали существенными при изменении уровня экспрессии более чем в 30 раз и наблюдаемом р-значении меньше 0,01 (без внесения поправок) [6, 8]. Функциональная аннотация отреагировавших генов проводилась с использованием базы KEGG (Киотская энциклопедия генов и геномов) [9].

Из всех заявленных генов на платформе ДНК-микрочипа 178 показали изменение уровня экспрессии в материале поясничного отдела спинного мозга мышей группы «Восстановление» по сравнению с показателями животных группы «Полет». В 118 случаях наблюдалось повышение экспрессии, в 60 – понижение.

Функциональная аннотация отреагировавших генов с использованием базы данных KEGG выявила принадлежность генов в работе 60 метаболических и сигнальных путей. Так, гены с повышенной активностью имеют непосредственное отношение к кальциевым сигнальным путям (CALM, CaN), путям метаболизма аминокислот (RIMKLA, CBS), глицерофосфолипидов (LPSAT, LPEAT), сигнальным путям митоген-активируемой протеинкиназы (RasGRP, CACN, MEK1), направленного роста аксонов (EphA, Robo1, TRPC). Среди генов с пониженной экспрессией представляют интерес участники молекулярных каскадов, ответственных за деградацию жирных кислот (CPT1, ACOX3), окислительное фосфорилирование (Cyt1, SDHA, COX10), сигнальных путей апоптоза (CASP3, TRAF2), пероксисомального окисления (PEX1, SOD).

Выводы

1. Биоинформационный анализ транскриптомов поясничного отдела спинного мозга мышей группы «Полет» и группы «Восстановление» позволяет сделать предположение о вовлечении в механизмы реадaptации после пребывания в невесомости как каскадов, участвующих в развитии ГДС, так и внутриклеточных сигнальных путей, активированных в течение недели в условиях земной гравитации.

2. Характер экспрессии генов преимущественно не является специфичным для нервной ткани и, возможно, во многом отражает изменения и в других тканях организма.

3. Полученные данные могут иметь не только фундаментальное значение, но и могут быть использованы в космической медицине при разработке новых профилактических и терапевтических подходов преодоления воздействия невесомости на организм человека, особенно когда их необходимость возрастает с увеличением времени пребывания человека в космосе.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 17-04-00385 и программой Президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий».

Список литературы

1. Григорьев А.И., Козловская И.Б., Шенкман Б.С. Роль опорной афферентации в организации тонической мышечной системы // Рос. физиол. журн. 2004. Т. 90. № 5. С. 508–521.
2. Grigoryev A.I., Kozlovskaya I.B., Shenkman B.S. The role of supporting afferentation in the organization of tonic muscle system // Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal. V. 90. № 5. P. 508–521.

2. Григорьев А.И., Шенкман Б.С. Скелетная мышца в безопорном мире. Еще одно приложение физиологии сигнальных систем // Вестник РАН. 2008. Т. 78. № 4. С. 337–345.

Grigoryev A.I., Shenkman B.S. Skeletal muscle in an unsupported world. Another application of the physiology of signaling systems // Vestnik RAN. 2008. V. 78. № 4. P. 337–345.

3. Исламов Р.Р., Гусев О.А. и др. Полногеномное исследование экспрессии генов поясничного отдела спинного мозга мышей после 30-суточного космического полета на биоспутнике «Бийон-М1» // ДАН. 2014. Т. 458. № 6. С. 1–3 DOI: 10.7868/S0869565214300227.

Islamov R.R., Gusev O.A. et al. A full-genome study of the expression of the lumbar spine genes of mice after a 30-day space flight on a biosatellite «Bion-M1» // DAN. 2014. V. 458. № 6. P. 1–3. DOI: 10.7868/S0869565214300227.

4. Исламов Р.Р., Тяпкина О.В. и др. Роль мотонейронов спинного мозга в механизмах развития гипогравитационного двигательного синдрома // Рос. физиол. журн. 2013. Т. 99. № 3. С. 281–293.

Islamov R.R., Tyapkina O.V. et al. Role of spinal cord motoneurons in mechanisms of development of hypogravitational motor syndrome // Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal. 2013. V. 99. № 3. P. 281–293.

5. Улумбеков Э.Г., Резвяков Н.П. Нейротрофический контроль фазных мышечных волокон. Л., 1980.

Ulumbekov E.G., Rezvyakov N.P. Neurotrophic control of the phase muscle fibers. Leningrad, 1980.

6. Bair E. Identification of significant features in DNA microarray data // Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat. 2013. 5(4): 10.1002/wics.1260. DOI: 10.1002/wics.1260.

7. Kozlovskaya I.B., Kreidich Yu.V., Oganov V.S., Koserenko O.P. Pathophysiology of motor functions in prolonged manned space flights // Acta Astronaut. 1981. № 8. P. 1059–1072.

8. Li W. Volcano plots in analyzing differential expressions with mRNA microarrays // Bioinform. Comput. Biol. 2012. 10(6): 1231003. DOI: 10.1142/S0219720012310038.

9. Luo W., Brouwer C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway based data integration and visualization // Bioinformatics. 2013. 15;29(14): 1830–1. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt285.

10. Ritchie M.E., Phipson B. et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies // Nucleic. Acids Res. 2015. 20;43(7):e47. DOI: 10.1093/nar/gkv007.

11. Shenkman B.S. From slow to fast: hypogravity-induced remodeling of muscle fiber myosin phenotype // Acta Nature. 2016. V. 8. № 4. P. 47–59.

Поступила 15.09.2017

TRANSCRIPTOMIC PROFILE OF MICE SPINAL CORD AFTER 30 DAY SPACE FLIGHT ON «BION-M1» BIOSATELLITE AND SUBSEQUENT 7 DAY READAPTATION

Kuznetsov M.S., Rezvyakov P.N., Lisyukov A.N., Volkov K.D., Islamov R.R., Nikolskiy E.E.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 85–87

A full-genome study of lumbar spinal cord of C57BL/6J mice after 30-day space flight on «Bion-M1» biosatellite and mice that have undergone a subsequent 7-day readaptation on the Earth. Comparative bioinformatic analysis of transcriptomic profile of mouse spinal cord after 30-day space flight performed by us earlier and mice that had undergone a period of readaptation revealed differential expression of 178 genes (118 genes were up-regulated and 60 were down-regulated) participating in 60 metabolic and signaling pathways. Thus, up-regulated genes which are directly related to calcium signaling pathways (CALM, CaN), aminoacids metabolism pathways (RIMKLA, CBS), glycerophospholipids (LPSAT, LPEAT), signaling pathways of mitogen-activated protein kinase (RasGRP, CACN, MEK1) directed growth of axons (EphA, Robo1, TRPC). Among down-regulated genes the participants of molecular cascades responsible for degradation of fatty acids (CPT1, ACOX3), oxidative phosphorylation (Cyt1, SDHA, COX10), apoptosis signal pathways (CASP3, TRAF2), peroxisomal oxidation (PEX1, SOD) are interesting. Obtained data indicate involvement to mechanisms of readaptation after being in zero-gravity conditions, as cascades responsible for the development of hypogravitational motor syndrome and intracellular signaling pathways activated during the week under the conditions of Earth's gravity.

Key words: hypogravitational motor syndrome, full-genome study, transcriptomic profile, «Bion-M1», DNA-microarray.

УДК 611.817.1

КЛЕТКИ ПУРКИНЬЕ ХРЯЩЕПАЛЫХ ГЕККОНОВ ПОСЛЕ 30-ДНЕВНОГО КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА

Прошина А.Е., Гулимова В.И., Барабанов В.М., Харламова А.С., Савельев С.В.

Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва

E-mail: proschina@mtu-net.ru

Целью данного исследования была оценка влияния длительных космических полетов на клетки Пуркинье мозжечка хрящепалых гекконов (*Chondrodactylus turnery* Gray, 1864).

Гекконы из экспериментальной группы полета находились на борту биоспутника «Бион-М1» в течение 30 сут. Гекконы контрольной группы содержались в лаборатории при условиях, аналогичных полетным. Было проведено исследование клеток Пуркинье в переднем и заднем мозжечке с применением окраски по Ниссля и антител к нейрон-специфическому бета-III-тубулину.

Выявлены неспецифические цитоморфологические изменения в клетках Пуркинье вестибулярного мозжечка хрящепалых гекконов (гиперхроматоз, хроматолиз и вакуолизация клеток), свидетельствующие об изменении функциональной нагрузки. Однако эти изменения являлись обратимыми, отсутствовали грубые морфологические нарушения, в том числе в плотности дендритов в молекулярном слое заднего мозжечка. При этом не было обнаружено значимых различий между группами полета и контроля в морфологическом строении клеток Пуркинье и плотности распределения дендритов в переднем мозжечке, что может свидетельствовать о сохранении у хрящепалых гекконов в невесомости сенсомоторных функций.

Мы предполагаем, что основным условием успешной адаптации гекконов к условиям невесомости является способность нервной системы компенсировать некорректную информацию, поступающую от вестибулярного анализатора, тактильными сигналами.

Ключевые слова: космический полет, биоспутник «Бион-М1», головной мозг, мозжечок, клетки Пуркинье, нейропластичность, хрящепалый геккон.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 88–93.

DOI: 10.21687/0133-528X-2017-51-7-88-93

Во время и после долговременного космического полета (КП) у людей и экспериментальных животных может наблюдаться ряд нарушений. Продолжительное пребывание в невесомости влияет на поведение позвоночных, включая людей, вызывая изменения локомоции, системы позиционирования тела в пространстве и вестибулярные

аномалии [1–4]. Наиболее часто у людей наблюдаются симптомы космической болезни движения, космического адаптационного синдрома, зрительные иллюзии, нарушения поддержания позы, слабость и атаксия после возвращения на Землю [5, 6, 7]. У большинства космонавтов возникают визуальные реориентационные иллюзии, при которых можно не узнать знакомое место, оказавшись в нем непривычно расположенным [8]. В полете происходит постепенная адаптация сенсомоторного ответа к изменению характера вестибулярной афферентации и нагрузки на опорно-двигательный аппарат [1, 2, 9, 10]. Однако эти адаптации становятся ненужными при возвращении к земной гравитации, приводя к необходимости реадаптации в течение нескольких дней и даже недель после полета [2].

Физиологические механизмы, лежащие в основе этих эффектов, окончательно не выяснены. В ЦНС сигналы, поступающие от вестибулярных органов, сопоставляются с визуальной информацией, тактильными сигналами и информацией, поступающей от опорно-двигательной системы (проприорецепторов). Таким образом, происходит контроль локомоции, компенсация движений головы и т.д. В условиях КП, прежде всего, изменяется координация сигналов, приходящих от опорно-двигательной системы и вестибулярных органов [6, 9, 10]. Таким образом, после многодневного КП логично ожидать изменений в областях головного мозга, отвечающих за эту координацию. Анализ вестибулярной и проприорецептивной информации, который позволяет позвоночным контролировать положение тела в пространстве, осуществляется в том числе за счет сложной системы межклеточных взаимодействий на уровне коры мозжечка (*cortex cerebelli*) [10–12]. Таким образом, мозжечок может быть вовлечен в нарушения вестибулярных функций, возникающих в невесомости. К тому же изменения вестибулоокулярных рефлексов, наблюдаемые у людей после КП, схожи с некоторыми отклонениями у лиц с нарушениями работы мозжечка [1]. Основные принципы организации коры мозжечка сходны в различных группах позвоночных. В ней можно выделить 3 слоя: гранулярный, ганглионарный (слой

клеток Пуркинье) и молекулярный. Наиболее часто в литературе, посвященной влиянию измененной гравитации и других факторов КП на мозг позвоночных, сообщается об изменениях, возникающих в клетках Пуркинье, хотя их роль в развитии нарушений вестибулярной и двигательной функций остается спорной [10]. Например, у грызунов описаны дегенеративные изменения этих клеток [13]. В работе Краснова и Красникова [11] выявлено, что пребывание крыс в 14-суточном КП вызывает снижение активности цитохромоксидазы в молекулярном слое и клетках Пуркинье узелка (*nodulus*). Эти факты были интерпретированы как свидетельство уменьшения в невесомости афферентного вестибулярного притока к клеткам Пуркинье и снижения функциональной активности этих клеток [14]. Такие данные коррелируют с результатами, полученными в работах, посвященных влиянию на кору мозжечка измененной гравитации [1, 15].

Рептилии являются удобной моделью для изучения эффектов невесомости на мозжечок благодаря относительной простоте его организации. Афференты от вестибулярных ядер у рептилий приходят преимущественно в заднюю часть мозжечка, а от кожных рецепторов и проприорецепторов – в переднюю часть [16]. При этом полушария мозжечка у гекконов практически отсутствуют. Они представлены небольшими латеральными выпячиваниями (*auriculae*) в задней части мозжечка. Таким образом, задний мозжечок и аурикулярные доли мозжечка гекконов соответствуют флокуло-нодулярной доле млекопитающих.

Хрящепалые гекконы (*Chondrodactylus turneri* Gray, 1864) впервые предложены нами в качестве модельного объекта для космических исследований в 2005 г. и успешно использованы в 3 орбитальных экспериментах на непилотируемых космических аппаратах (КА) «Фотон-М2» и «Фотон-М3» (2005, 2007), а также «Бион-М1» (2013) продолжительностью 16, 12 и 30 сут соответственно. За это время не было ни одного случая гибели животных. Кроме того, в наших предыдущих исследованиях было показано, что у хрящепалых гекконов, по всей видимости, не возникают описанные выше нарушения сенсомоторных функций, а их поведение мало отличается от обычного [17–19]. Хрящепалые гекконы являются хорошей моделью для орбитальных экспериментов благодаря их способности прикрепляться практически к любым поверхностям, которая позволяет животным поддерживать нормальную двигательную активность в течение большей части полета (в состоянии флотации гекконы находились в среднем 0,1 % от времени видеорегистрации). Гекконы в невесомости быстро восстанавливают прикрепленное положение, которое нарушается при старте и редких флотациях. Поэтому во время КП они сохраняют нормальную

активность, включая двигательное, пищевое, исследовательское, социальное и даже игровое поведение [18], что косвенно свидетельствует об отсутствии тяжелого или хронического стресса.

Таким образом, хрящепалые гекконы являются удачной моделью для изучения воздействия факторов КП на мозжечок позвоночных. Целью данного исследования явилась оценка влияния длительных орбитальных экспериментов на клетки Пуркинье передней и задней долей мозжечка хрящепалых гекконов.

Методика

Данное исследование является частью комплексного изучения мышей и гекконов после космической миссии на борту непилотируемого КА «Бион-М1». Биоспутник был запущен 19 апреля 2013 г., спускаемый аппарат приземлился 19 мая 2013 г.

Исследование проводилось на взрослых девственных самках хрящепалого геккона (*Chondrodactylus turneri* Gray, 1864) в возрасте 1,5–2 года в соответствии с международными нормами по содержанию и изучению рептилий. Гекконы из экспериментальной группы полета (П) были размещены на борту биоспутника «Бион-М1». Гекконы из группы отложенного синхронного контроля (ОСК) содержались в лаборатории при условиях, аналогичных тем, в которых находились животные из П. Более подробно о дизайне эксперимента можно прочитать в работе [18].

Все гекконы были подвергнуты эвтаназии внутрибрюшинной инъекцией нембутала. Биоэтическая экспертиза протокола исследования проводилась Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 319 от 4 апреля 2013 г.). Эксперименты выполнялись в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.) и приказом № 742 Министерства высшего и среднего специального образования СССР «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» от 13.11.1984. Забой гекконов из группы П проводился спустя 14,5 ч после приземления.

Гистологические и иммуногистохимические методы. Целый головной мозг гекконов фиксировали в 4%-ном нейтральном формалине. После заливки образцов в парафин были изготовлены серии фронтальных и сагиттальных срезов (10 мкм). В работе предполагалось использовать все полученные срезы, поэтому они монтировались на стекла с шагом 1–11-й срез, и, таким образом, с каждого образца получено по 10 серий для гистологического и иммуногистохимического исследования. Всего исследовали мозжечок 19 гекконов: 9 – из группы П и 10 – ОСК.

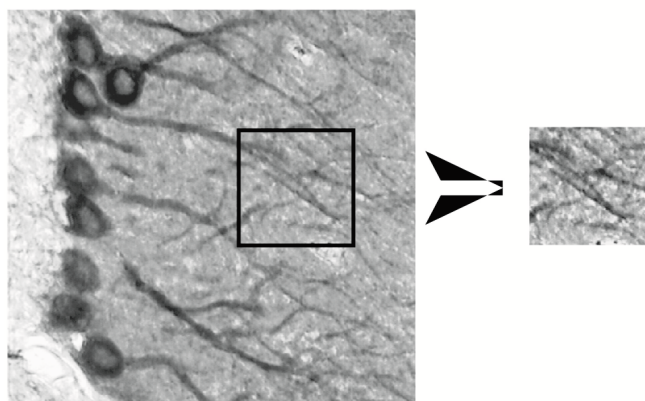


Рис. 1. Пример выделения полей для подсчета плотности дендритов клеток Пуркинье.

Сагиттальный срез через передний мозжечок геккона из группы полета, иммуногистохимическая реакция на нейронспецифический бета-III-тубулин, объектив x100

Для гистологического исследования 1-я серия срезов для всех образцов была окрашена по Нисслю. Иммуногистохимическое окрашивание проходило на другой серии срезов с использованием стандартной иммунопероксидазной реакции с применением антител к кроличьему поликлональному нейронспецифическому бета-III-тубулину (Abcam) (NST) в течение 60 мин при комнатной температуре. Для выявления антигенов использовали Ultra Vision Detection System Anti-rabbit (Thermo Scientific). Для визуализации реакций срезы обрабатывали раствором DAB.

Метод исследования клеток Пуркинье в заднем мозжечке гекконов описан в работе [19]. На фронтальных срезах головного мозга гекконов было вычислено соотношение количества клеток Пуркинье с неспецифическими изменениями (гиперхроматоз, хроматолиз, вакуолизация цитоплазмы) к общему количеству клеток. Так как при изучении клеток Пуркинье в заднем мозжечке не было выявлено отличий между группами ОСК и отложенного терариумного контроля, при дальнейшем изучении мозжечка мы сравнивали только группы П и ОСК. Изучение клеток Пуркинье в переднем мозжечке гекконов производилось на тех же срезах, что и в заднем (вестибулярном мозжечке) по той же методике. Так, для 5 гекконов из группы П и 4 из группы ОСК было произвольно выбрано по 5 фронтальных срезов через мозжечок, окрашенных по Нисслю, и по 5 – при помощи антител к NST. На каждом из этих срезов при увеличении объектива микроскопа x40 было выбрано по 5 неперекрывающихся полей наблюдений. Полученные препараты изучали при помощи светового микроскопа (Leica DMLS), оснащенного системой видеозахвата (камера Sony SSC-DC50P). На каждой микрофотографии было подсчитано и проанализировано соотношение количества

клеток Пуркинье с морфологическими изменениями к их общему количеству.

Как в переднем, так и в заднем мозжечке была измерена плотность дендритов клеток Пуркинье. Для этого среди сагиттальных срезов мозга для 4 гекконов из группы П и 6 – из группы ОСК было выбрано по 5 срезов через мозжечок. При увеличении объектива микроскопа x100 на этих срезах было сделано по 3 микрофотографии через молекулярный слой как в переднем, так и в заднем мозжечке. На микрофотографиях (рис. 1) было выбрано по 7 непересекающихся полей (350 x 350 пикс), в которых была измерена плотность дендритов клеток Пуркинье с помощью алгоритма Default (Jimage J).

Для статистической обработки и построения графиков был использован пакет статистического программного обеспечения (Statistica 10.0, Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Для попарного сравнения использован тест Манна – Уитни, так как число измерений в группах было разным. Во всех процедурах статистического анализа рассчитывали достигнутый уровень значимости (p), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Нервная система позвоночных обладает пластичностью, которая определяется как способность к биохимическим и структурным изменениям. Эти изменения необходимы в том числе для таких процессов как восприятие, обучение и запоминание [7]. Клеточные и молекулярные механизмы нейропластичности активно изучаются ввиду их возможного вклада в развитие разного рода функциональных нарушений. В специальной литературе обсуждается вопрос о пластичности сенсомоторных зон головного мозга после КП [2, 7]. В экспериментах, проведенных на грызунах, были показаны изменения головного мозга после КП: например, изменения в распределении терминалей аксонов в соматосенсорной коре [20] и изменения клеток Пуркинье в узелке мозжечка [13]. В недавней работе [2] показана возможность нейропластических изменений в мозге астронавтов: выявлено уменьшение объема серого вещества в височной и лобных долях и в медиальной части нижних полушарных долек мозжечка. Увеличение объема серого вещества обнаружено в пре- и постцентральной и поясной извилинах и предклинье. Авторы предполагают, что изменения объема серого вещества зависят от длительности КП.

Мозжечок у геккона представляет собой тонкую вогнутую пластину, в которой выделяют переднюю и заднюю доли. Интересной особенностью хрящепалого геккона является то, что слои в коре мозжечка инвертированы (рис. 2, А, Б), что описано также для некоторых других видов ящериц.

В нашем предыдущем исследовании [19] после длительного КП на биоспутнике «Бион-М1» (30 сут) у хрящепалых гекконов было выявлено значимое увеличение количества клеток Пуркинье задней доли мозжечка с неспецифическими изменениями цитоморфологии, такими, как хроматолиз, вакуолизация, гиперхроматоз. Обычно они считаются первичными признаками нейродегенеративных изменений. Однако тинкториальная гетерогенность нервных клеток является неспецифическим проявлением состояния нейронов, которое коррелирует с уровнем их метаболизма [19]. Хроматолиз, вакуолизация и гиперхроматоз рассматриваются как обратимые изменения нейронов. Это согласуется с данными по изменениям в поведении животных. Гекконы в условиях КП чаще совершали движения головой в покое, чем при локомоции по сравнению с контрольными группами, что может быть связано с тем, что животные пытались стимулировать вестибулярный аппарат с помощью движений головы [17].

Рассматривая результаты нашего исследования в рамках концепции о нейропластичности, можно предположить, что выявленные нами изменения в вестибулярном мозжечке гекконов [19] связаны с обучением. В последнее время появились данные об участии мозжечка в формировании двигательных навыков. Хотя нейрогенез взрослого мозга ограничен определенными областями (например, зубчатой извилиной гиппокампа, субвентрикулярной зоной боковых желудочков и обонятельной луковицей), другие нейропластические изменения могут происходить в течение всей жизни, например, спраутинг аксонов, ветвление дендритов, синаптогенез, изменение в количестве и морфологии клеток глии и ангиогенез [2].

Выявленные изменения, по-видимому, являются обратимыми. Подтверждением такой точки зрения является то, что не было обнаружено значимого изменения плотности дендритов в молекулярном слое гекконов из группы П по сравнению с ОСК (39,7 и 41,8 % соответственно). Несмотря на то что плотность дендритов в среднем уменьшалась примерно на 2 %, индивидуальные различия заметно перекрывали эту разницу. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об обратимости большинства обнаруженных изменений, так как грубого нарушения морфологического строения клеток Пуркинье у гекконов после КП не происходит.

В передней доле мозжечка гекконов как в П, так и в ОСК тоже были выявлены нейроны с неспецифическими изменениями, описанными выше. Однако значимых отличий между этими группами не было обнаружено (см. рис. 2, В, Г). Плотность дендритов в молекулярном слое переднего мозжечка также значимо не отличалась (40,8 % в П и 39,3 % – в ОСК). Таким образом, можно предположить, что факторы КП не влияют на представительство проприо- и

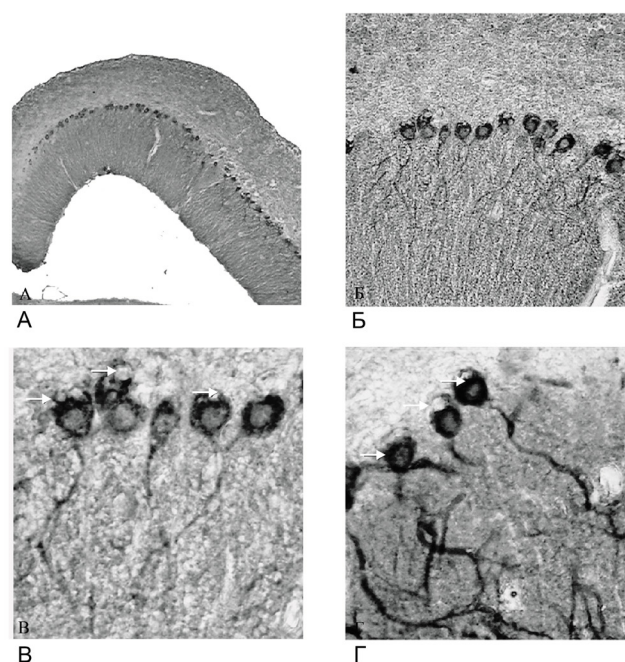


Рис. 2. Клетки Пуркинье в переднем мозжечке хрящепалого геккона (сагиттальные срезы), иммуногистохимическая реакция на нейронспецифический бета-III-тубулин: А, Б, В – отложенный синхронный контроль; Г – космический полет.

Стрелками показаны некоторые клетки с вакуолизацией цитоплазмы и хроматолизом; объектив: А – $\times 10$; Б – $\times 40$; В, Г – $\times 100$

тактильной рецепции в мозжечке у гекконов, несмотря на то что у грызунов и человека были найдены некоторые изменения в сенсомоторных областях мозга после продолжительного пребывания в невесомости [2, 15]. Возможной причиной этого является сохраняющаяся у гекконов в КП способность к прикреплению. Авторы данной работы предполагают, что основным условием успешной адаптации гекконов к условиям невесомости является свойство нервной системы компенсировать некорректную информацию, поступающую от вестибулярного анализатора, тактильными сигналами. Проверка этой гипотезы важна для оценки роли гравитации в эволюции наземных позвоночных, а полученные данные могут быть использованы для подготовки и обеспечения длительных КП. Результаты проведенных исследований могут способствовать разработке новых подходов для компенсации возникающих отклонений, оптимизации когнитивных функций и коррекции перцепционно-моторных нарушений.

Выводы

1. Выявлены неспецифические цитоморфологические изменения в клетках Пуркинье вестибулярного мозжечка хрящепалых гекконов

(гиперхроматоз, хроматолиз и вакуолизация клеток), свидетельствующие об изменении функциональной нагрузки. Однако эти изменения являются обратимыми, отсутствовали грубые морфологические нарушения, в том числе в плотности дендритов в молекулярном слое заднего мозжечка. При этом не было обнаружено значимых различий между группами полета и контроля в морфологическом строении клеток Пуркинье и плотности распределения дендритов в переднем мозжечке, что может свидетельствовать о сохранении у хрящепалых гекконов в невесомости сенсомоторных функций.

2. Основным условием успешной адаптации гекконов к условиям невесомости является способность нервной системы компенсировать некорректную информацию, поступающую от вестибулярного анализатора тактильными сигналами.

Мы благодарны коллективу ГНЦ РФ – ИМБП РАН за организацию орбитальных экспериментов, расходные материалы и реактивы. Работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований, грант № 16-04-00815.

Список литературы

1. Bruce L.L. Adaptations of the vestibular system to short and long-term exposures to altered gravity // *Adv. Space Res.* 2003. V. 32. № 8. P. 1533–1539.
2. Koppelmans V., Bloomberg J.J., Mulavara A.P., Seidler R.D. Brain structural plasticity with spaceflight // *NPJ Microgravity*. 2016. Dec. 19;2:2. DOI: 10.1038/s41526-016-0001-9. eCollection 2016.
3. Clement G., Reschke M.F. *Neuroscience in Space*. N.Y., 2008.
4. Ross H.E. Haptic perception in space travel // *Human haptic perception: basics and applications* / M. Grunwald, ed. Basel; Boston; Berlin, 2008. P. 273–280.
5. Thornton W.E., Bonato F. Space motion sickness and motion sickness: symptoms and etiology // *Aviat. Space Environ. Med.* 2013. V. 84. № 7. P. 716–721.
6. Kalb R., Solomon D. Space exploration, Mars, and the nervous system // *Arch. Neurol.* 2007. V. 64. № 4. P. 485–490.
7. Slenzka K. Neuroplasticity changes during space flight // *Adv. Space Res.* 2003. V. 31. № 6. P. 1595–1604.
8. Oman C. Spatial orientation and navigation in microgravity // *Spatial processing in navigation, imagery and perception* / F. Mast, L. Jancke, eds. N.Y., 2007. P. 209–247.
9. Minor L.B. Physiological principles of vestibular function on earth and in space // *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1998. V. 118 (3 Pt 2). P. 5–15.
10. Cohen B., Yakushin S.B., Holstein G.R. et al. Vestibular experiments in space // *Adv. Space Biol. Med.* 2005. V. 10. P. 105–64.
11. Краснов И.Б., Красников Г.В. Клетки Пуркинье вестибулярного и проприцептивного отделов мозжечка крысы после 14-суточного космического полета // *Авиакосм. и экол. мед.* 2009. Т. 43. № 4. С. 43–47.
12. Krasnov I.B., Krasnikov G.V. Purkinje's cells in the vestibular and proprioceptive segments of rat's cerebellum following 14-day space flight // *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 2009. V. 43. № 4. P. 43–47.
13. Jamon M. The development of vestibular system and related functions in mammals: impact of gravity // *Front Integr. Neurosci.* 2014. V. 7. DOI:10.3389/fnint.2014.00011.
14. Holstein G.R., Kukielka E., Martinelli G.P. Anatomical observations of the rat cerebellar *nodulus* after 24 hr of spaceflight // *J. Gravit. Physiol.* 1999. V. 6. P. 47–50.
15. Краснов И.Б. Электронно-микроскопический анализ структурных элементов вестибулярного входа к клеткам Пуркинье нодулы крыс, находившихся в 9-суточном космическом полете // *Авиакосм. и экол. мед.* 2008. Т. 42. № 4. С. 20–27.
16. Krasnov I.B. Electron microscopy analysis of the structural elements of the vestibular input to *nodulus* Purkinje's cells in rats exposed to a 9-day space flight // *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 2008. V. 42. № 4. P. 20–27.
17. Sajdel-Sulkowska E.M., Nguona K., Sulkowski Z.L. et al. Purkinje cell loss accompanies motor impairment in rats developing at altered gravity // *Neuroreport*. 2005. V. 16. № 18. P. 2037–2040.
18. Bangma G.C., ten Donkelaar H. Afferent connections of the cerebellum in various types of reptiles // *J. Comp. Neurol.* 1982. V. 207. № 3. P. 255–273.
19. Хватов И.А., Гулимова В.И., Барабанов В.М. и др. Особенности адаптивного поведения хрящепалых гекконов в орбитальном эксперименте // *Экспериментальная психология*. 2014. Т. 7. № 3. С. 44–56.
20. Khvatov I.A., Gulimova V.I., Barabanov V.M. et al. Peculiar features of the adaptive behavior of thick-toed geckos in the orbital spaceflight experiment // *Eksperimental'naya psikhologiya*. 2014. V. 7. № 3. P. 44–56.
21. Barabanov V., Gulimova V., Berdiev R., Savelyev S. Object play in thick-toed geckos during a space experiment // *J. Ethol.* 2015. V. 33. № 2. P. 109–115.
22. Proshchina A., Kharlamova A., Barabanov V., Gulimova V., Savelyev S. Vestibular cerebellum of thick-toed geckos (*Chondrodactylus turnery* Gray, 1864) and C57/BL6N mice after the long-term space flight on the biosatellite «Bion-M1» // *J. Chem. Neuroanat.* 2017. V. 79. P. 69–75.
23. Дьячкова Л.Н. Изменения ультраструктуры соматосенсорной коры головного мозга белых крыс в условиях космического полета // *Известия РАН. Сер. Биологическая*. 2007. № 3. С. 372–375.
24. D'yachkova L.N. Ultrastructural changes in somatosensory cortex of albino rats during space flight // *Izvestiya Akademii Nauk. Seriya Biologicheskaya*. 2007. № 3. P. 372–375.

Поступила 19.09.2017

PURKINJE CELLS OF THICK-TOED GECKOS AFTER THE 30-DAYS SPACE FLIGHT

Proshchina A.E., Gulimova V.I., Barabanov V.M., Kharlamova A.S., Saveliev S.V.

Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 88–93

The primary goal of this study was to evaluate long term space flight effects on Purkinje cells of the thick-toed geckos cerebellum.

Geckos from the flight group have been flown on board «Bion-M1» satellite during 30 days. Flight conditions (feeding, diurnal rhythm, temperature) were reproduced for geckos from the delayed synchronous control group.

Cerebellar Purkinje cells were examined with Nissle staining and neuron-specific beta-III-tubulin immunohistochemistry.

Revealed nonspecific cytomorphological changes in Purkinje cells of the thick-toed geckos vestibular cerebellum (hyperchromatosis, chromatolysis and vacuolization), indicating a change in the functional load. However, these changes were reversible, there were no gross morphological disorders, including alterations of dendrite density in the molecular layer of the posterior cerebellum. At the same time, there were no significant differences between the flight and control groups in the morphological structure of Purkinje cells and the dendrite density in the anterior cerebellum, which may indicate the preservation of the thick-toed geckos sensorimotor functions in the microgravity.

We propose that nervous system is able to compensate incorrect information from vestibular system by tactile and visual signals.

Keywords: space flight, biosatellite «Bion-M1», brain, cerebellum, Purkinje cell, neuroplasticity, thick-toed geckos.

УДК 612.744.24:611.717/.718:612.014.462.8:577.125

МЕТАБОЛИЗМ СФИНГОЛИПИДОВ В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ ПЕРЕДНИХ И ЗАДНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ МЫШЕЙ ПРИ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОМ ВЫВЕШИВАНИИ РАЗНОЙ ДЛИТЕЛЬНОСТИ

Брындина И.Г., Шалагина М.Н., Овечкин С.В., Яковлев А.А.

Ижевская государственная медицинская академия Минздрава РФ

E-mail: i_bryndina@mail.ru

Сфинголипиды, включая керамид, играют важную роль в жизнедеятельности клеток. Керамид и его аналоги влияют на пролиферацию и апоптоз клеток, окислительные процессы, синтез белка, инсулиновый сигналинг и др. Функциональная разгрузка мышц приводит к увеличению в них уровня керамидов и кислой сфингомиелиназы. Основными путями образования керамидов являются синтез *de novo* и гидролиз сфингомиелина, а его деградация происходит с участием керамидаз. С целью выяснения механизмов аккумуляции керамидов в мышцах при гипогравитационной разгрузке проведен сравнительный анализ изменений керамидов (Cer), сфингомиелина (SM) и основных ферментов метаболизма сфинголипидов (кислой сфингомиелиназы – SMPD1, керамидазы ASAH2, сфингозинкиназы SPHK1 и сфингомиелинсинтазы SGMS1, ИФА) в *m. soleus* и *m. biceps brachii* мышей при 6-часовом и 14-суточном антиортостатическом вывешивании (АОВ). Установлено, что в *m. soleus* при АОВ повышается уровень Cer, SMPD1 и ASAH2 на фоне уменьшения SM. В *m. biceps brachii* обнаружено уменьшение ASAH2 и SPHK1, не сопровождавшееся изменением Cer и SM. Таким образом, при АОВ в разгруженных мышцах задних конечностей (*m. soleus*) изменения ферментов, участвующих в обмене сфинголипидов, имеют качественно иной характер по сравнению с нагруженными мышцами передних конечностей (*m. biceps brachii*). Основным путем аккумуляции керамидов в *m. soleus* как при кратковременной, так и при более длительной функциональной разгрузке является сфингомиелиназный гидролиз.

Ключевые слова: сфинголипиды, скелетные мышцы, антиортостатическое вывешивание.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 94–98.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-94-98

Одним из современных направлений в исследовании влияния гипогравитации на опорно-двигательный аппарат стало изучение роли сфинголипидов в механизмах атрофии и дисфункции скелетных мышц в условиях невесомости. К настоящему времени на земных моделях гипогравитации проведен ряд исследований, в которых показано, что функциональная разгрузка мышц приводит к увеличению в них уровня керамидов [1–4].

Керамид принадлежит к классу сфинголипидов, которые играют важную роль в жизнедеятельности клеток как структурные компоненты клеточных мембран и вторичные мессенджеры. Биоэффекторные функции керамидов, сфингозина и их фосфорилированных производных реализуются в таких процессах, как клеточный рост и апоптоз, синтез белка, инсулиновый сигналинг, окислительный стресс и др. [5, 6]. Керамид образуется в клетках путем синтеза *de novo*, в результате гидролиза сфингомиелина, а также из других сфинголипидов в дополнительном (*salvage*) пути [7].

Установлено, что керамид аккумулируется в камбаловидной мышце мышей при кратковременном (4 сут) и длительном (30 сут) антиортостатическом вывешивании (АОВ) [1, 2]. Авторы работы [3] наблюдали тот же эффект у крыс при 7-суточном вывешивании. В работе [4] показано, что на 14-е сутки вывешивания в камбаловидной мышце мышей наблюдается увеличение экспрессии серинпальмитойлтрансферазы 2 (SPT2) – одного из основных ферментов синтеза керамидов *de novo*. Достоверных изменений серинпальмитойлтрансферазы (SPT1) в этой мышце на 4-е сутки АОВ не обнаружено, а на 30-е сутки выявлен дефицит данного фермента [2].

Учитывая различия в функциональном состоянии мышц задних и передних конечностей, которые наблюдаются в условиях АОВ, в данной работе была поставлена цель провести сравнительный анализ изменений основных ферментов метаболизма сфинголипидов в *m. soleus* и *m. biceps brachii* мышей при кратковременном и более длительном антиортостазе.

Методика

Работа выполнена на 24 нелинейных белых мышках-самцах массой 25–28 г, содержащихся в стандартной обстановке вивария. опыты проводились с соблюдением требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента. Исследование одобрено

Этическим комитетом ФГБОУ ВО ИГМА № 502/1 от 6.09.2016 г. С целью функциональной разгрузки скелетных мышц животных подвергали вывешиванию под углом 30° к горизонтальной поверхности по Ильину и Новикову [8] в модификации Morey-Holton [9], при нормальном доступе к воде и пище. Длительность воздействия составляла 6 ч и 14 сут, контролем служили интактные мыши. После окончания опытов животных выводили из эксперимента путем декапитации под наркозом (хлоралгидрат в/б 0,1 мг/кг). Мышцы задних и передних конечностей (*m. soleus* и *m. biceps brachii*) извлекали, быстро замораживали в жидком азоте и хранили до исследования при температуре -80 °С. Для исследования образцы мышечной ткани (20 мг) гомогенизировали в 0,9%-ном растворе хлорида натрия, после чего с помощью стандартных наборов для иммуноферментного анализа (ELISA, Cusabio), согласно описанному протоколу, проводили количественную оценку ферментов, участвующих в метаболизме сфинголипидов: сфингомиелинсинтазы (церамидхолинфосфотрансферазы, SGMS1), кислой сфингомиелиназы (сфингомиелинфосфодиэстеразы, SMPD1), нейтральной церамидазы (ацилсфингозинамидогидролазы, ASAH2) и сфингозинкиназы (SPHK1).

Церамид и сфингомиелин в гомогенатах мышечной ткани определяли с помощью тонкослойной хроматографии [10]. Экстракцию липидов из гомогенатов мышечной ткани проводили по Фолчу [11]. Хлороформенный экстракт наносили на пластины силикагеля с УФ-индикатором (HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Германия) параллельно со стандартом (Avanti polar lipids, США) и подвергали разгонке [12]. Пластины проявляли в парах йода, после чего проводили детекцию сфинголипидов с помощью денситометра Сорбфил и программного обеспечения Sorbfil Videodensitometer (Россия). Полученные стандартные значения использовали для количественной оценки церамида.

Результаты исследований подвергали статистической обработке, достоверность проверяли с помощью U-критерия Манна – Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Результаты представляли как $M \pm m$ (среднее $\pm$ стандартная ошибка средней). Статистический анализ проводили в компьютерной программе Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

В условиях 6-часового АОВ в *m. soleus* в 2,5 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем возрастало количество церамида (рис. 1). Параллельно наблюдалось уменьшение сфингомиелина на $88 \pm 5,8$ % ($p < 0,05$). В *m. biceps brachii* уровни церамида и сфингомиелина не отличались от контрольных значений (данные не показаны).

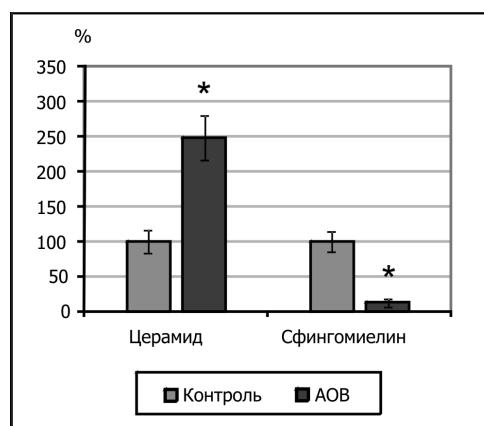


Рис. 1. Церамид и сфингомиелин в *m. soleus* мышей при 6-часовом АОВ (в % к контролю).

Здесь и на рис. 2 и 3: данные представлены как $M \pm m$. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем

После 6-часового вывешивания в обеих исследуемых мышцах наблюдались изменения экспрессии ферментов, участвующих в обмене сфинголипидов (рис. 2, 3). При этом направленность и степень этих изменений в разгруженной *m. soleus* и нагруженной *m. biceps brachii* существенно различались. Так, в *m. soleus* значительно возрастал уровень протеина кислой сфингомиелиназы (SMPD1) – прирост составил более чем 300 % ($p < 0,05$). Параллельно отмечалось двукратное увеличение уровня нейтральной церамидазы ASAH2 (на $107 \pm 31,8$ %; $p < 0,05$).

Повышение указанных ферментов сохранялось и на 14-е сутки воздействия. При этом SMPD1 повышалась на $110,5 \pm 22,8$ % ($p < 0,05$), а ASAH2 – на $129,8 \pm 36,5$ % ($p < 0,05$). Как при кратковременном, так и при более длительном антиортостатическом воздействии уровни SGMG1 и SPHK1 в *m. soleus* не отличались от контрольных значений (рис. 2).

Иная направленность изменений имела место в *m. biceps brachii*. К 6-му часу вывешивания количество ASAH2 и SPHK1 в данной мышце было снижено на 56 ± 14 % ($p < 0,05$) и 66 ± 12 % ($p < 0,05$) соответственно. К 14-м суткам уровень ASAH2 не отличался от контроля, а тенденция к понижению SPHK1 сохранялась (на 57 ± 11 %; $p = 0,056$). Помимо этого, была отмечена недостоверная тенденция к уменьшению уровня SGMG1 как через 6 ч, так и на 14-е сутки АОВ: на $61 \pm 12,7$ % ($p = 0,057$) и на 58 ± 10 % ($p = 0,063$) (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что как на самых ранних этапах функциональной разгрузки мышц (при 6-часовом АОВ), так и при более длительном воздействии (на 14-е сутки вывешивания) в *m. soleus* усиливается экспрессия кислой сфингомиелиназы (повышение SMPD1). В *m. biceps brachii* данный показатель при антиортостазе не изменяется. Ранее похожие результаты

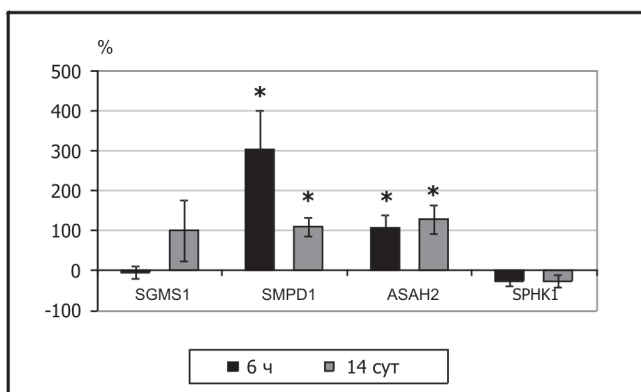


Рис. 2. Ферменты метаболизма сфинголипидов в *m. soleus* мышей при 6-часовом и 14-суточном АОВ (в % к контролю).

Здесь и на рис. 3: SGMS1 – сфингомиелинсинтаза; SMPD1 – кислая сфингомиелиназа; ASAH2 – нейтральная церамидаза; SPHK1 – сфингозинкиназа

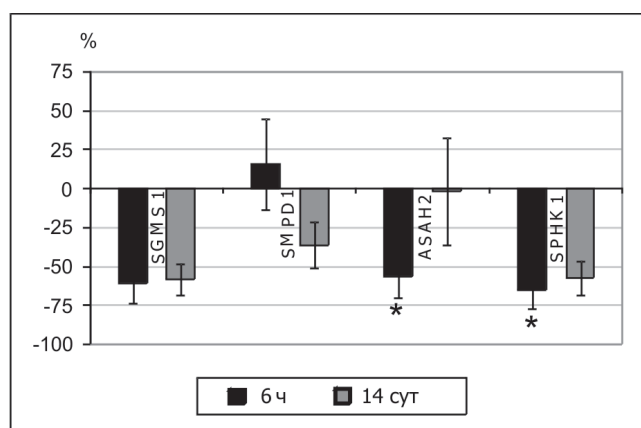


Рис. 3. Ферменты метаболизма сфинголипидов в *m. biceps brachii* мышей при 6-часовом и 14-суточном АОВ (в % к контролю)

были получены нами при 4-суточном АОВ [2]. Известно, что SMPD1 является лизосомальным ферментом, который в условиях клеточного стресса может транслоцироваться в клеточную мембрану и индуцировать гидролиз мембранного сфингомиелина с образованием церамида [13]. Церамид и его дериваты, как известно, являются внутриклеточными мессенджерами, участвующими в реализации эффектов сфинголипидного сигналинга [14].

Уровень другого фермента, участвующего в обмене церамида – нейтральной церамидазы (ASAH2), также возрастал в *m. soleus* как в остром 6-часовом, так и в хроническом 14-суточном экспериментах. Церамидаза катализирует гидролиз церамида в сфингозин, причем известно, что в образовании последнего данный путь является основным, поскольку сфингозин не синтезируется *de novo* [15]. Мы

предполагаем, что повышение экспрессии ASAH2, которое мы наблюдали в наших опытах, может быть фактором, предотвращающим избыточное накопление церамида и, таким образом, ограничивающим его возможные неблагоприятные эффекты в условиях функциональной разгрузки мышц. Известно, что церамид индуцирует инсулинорезистентность, оксидативный стресс, апоптоз и нарушение синтеза белка в скелетных мышцах [14].

Интересно отметить, что в *m. biceps brachii*, которая при АОВ нагружена в большей степени, чем у интактных животных, изменения ASAH2 имели противоположную по сравнению с *m. soleus* направленность: так, к 6-му часу вывешивания уровень фермента понижался, а к 14-м суткам не отличался от контроля. Наши результаты не противоречат данным [16], которые показали, что в скелетных мышцах при повышенной физической нагрузке наблюдается ингибирование церамидаз.

Сфингомиелинсинтаза SGMS1 не изменялась в *m. soleus*, вывешенной в течение 6 ч или 14 сут. В то же время была выявлена стойкая, хотя и недовольная, тенденция к ее уменьшению при АОВ в *m. biceps brachii*. Известно, что SGMS1 участвует в конечном этапе синтеза сфингомиелина путем переноса фосфорилхолина с фосфатидилхолина на церамид [17]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в условиях АОВ в *m. soleus* процесс деградации сфингомиелина значительно преобладает над его синтезом, тогда как в *m. biceps brachii* данный феномен не обнаружен.

Сфингозинкиназа SPHK1 в *m. soleus* не изменялась на протяжении всего эксперимента, а в *m. biceps brachii* была понижена после 6-часового АОВ, при сохранении той же тенденции к 14-м суткам. Сфингозинкиназа катализирует образование сфингозин-1-фосфата из сфингозина [18]. Известно, что сфингозин-1-фосфат является плейотропным липидом, участвующим в регуляции апоптоза, воспаления и других значимых физиологических процессов [6, 14]. На основании наших результатов можно предположить, что в *m. biceps brachii* образование сфингозин-1-фосфата при АОВ ограничено, тогда как в *m. soleus* этот процесс остается таким же, как в контроле.

Следует отметить, что при проведении исследования не учитывался тот факт, что *m. soleus* и *m. biceps brachii* различаются по составу мышечных волокон. Так, в *m. soleus* у мышей около 32 % волокон являются медленными оксидативными, а в *m. biceps brachii* таких волокон только около 1,5 % [19]. В данном исследовании основной интерес представляли принципиальные различия в обмене сфинголипидов в мышцах задних (разгруженных) и передних (нагруженных) конечностей у одних и тех же животных. В дальнейших исследованиях предполагается более дифференцированный подход с учетом характеристик мышечных фенотипов.

Выводы

1. Установлено, что разгрузка *m. soleus* при АОВ сопровождается уменьшением количества сфингомиелина, повышением церамида и кислой сфингомиелиназы (SMPD1) с параллельным усилением экспрессии нейтральной церамидазы (ASAH2). Данные эффекты выявлены как при кратковременном, так и более продолжительном АОВ.
2. В мышцах, подвергаемых при вывешивании большей, чем в обычных условиях, нагрузке (*m. biceps brachii*), уровни церамида и сфингомиелина остаются такими же, как у интактных особей, а изменения ферментов, участвующих в обмене сфинголипидов, имеют качественно иной характер по сравнению с разгруженной *m. soleus*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ (грант № 16-15-10220).

Список литературы

1. Брындина И.Г., Багаутдинов М.Р., Васильева Н.Н. и др. Церамиды скелетных мышц, печени и легких грызунов при хроническом эмоциональном стрессе и моделированной невесомости // Вестник урал. мед. акад. науки. 2012. № 2 (39). С. 108–109.
2. Брындина И.Г., Багаутдинов М.Р., Васильева Н.Н. et al. Ceramides in skeletal muscles, liver and lungs of rodents in chronic emotional stress and simulated weightlessness // Vestnik uрал'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki. 2012. № 2 (39). С. 108–109.
3. Брындина И.Г., Шалагина М.Н., Овечкин С.В., Овчинина Н.Г. Сфинголипиды скелетных мышц у мышей C57/Bl6 в условиях непродолжительной моделированной гипогравитации // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2014. Т. 100. № 11. С. 1280–1286.
4. Брындина И.Г., Шалагина М.Н., Овечкин С.В., Овчинина Н.Г. Sphingolipids in skeletal muscles of C57/Bl6 mice after short-term simulated microgravity // Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova. 2014. Т. 100. № 11. С. 1280–1286.
5. Salaun E., Lefevre-Orfila L., Cavey T., Martin B. et al. Myriocin prevents muscle ceramide accumulation but not muscle fiber atrophy during short-term mechanical unloading // J. Appl. Physiol. 2016. V. 120. № 2. P. 178–187.
6. Kwon O.S., Tanner R.E., Barrows K.M. et al. MyD88 regulates physical inactivity-induced skeletal muscle inflammation, ceramide biosynthesis signaling, and glucose intolerance // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2015. V. 309. № 1. P. E11–E21.
7. Дятловицкая Э.В., Кандыба А.Г. Биоэффекторные сфинголипиды как стимуляторы роста и выживаемости клеток // Биоорганическая химия. 2004. Т. 30. № 3. С. 227–233.
8. Dyatlovitskaya E.V., Kandyba A.G. Bioeffector sphingolipids as stimulators of cell growth and survival // Bioorganicheskaya khimiya. 2004. V. 30. № 3. P. 227–233.
9. Hannun Y.A., Obeid L.M. Principles of bioactive lipid signaling: lessons from sphingolipids // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2008. V. 9. № 2. P. 139–150.
10. Gault C.R., Obeid L.M., Hannun Y.A. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown // Adv. Exp. Med. Biol. 2010. V. 688. P. 1–23.
11. Ильин Е.А., Новиков В.Е. Стенд для моделирования физиологических эффектов невесомости в лабораторных условиях // Косм. биол. и авиакосм. мед. 1980. Т. 14. № 3. С. 79–80.
12. Il'yin E.A., Novikov V.E. Stand for modeling the physiological effects of weightlessness in laboratory experiments with rats // Kosmicheskaya biologiya i aviakosmicheskaya meditsina. 1980. V. 14. № 3. P. 79–80.
13. Morey-Holton E.R., Globus R.K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects // J. Appl. Physiol. 2002. V. 92. № 4. P. 1367–1377.
14. Биологические мембраны. Методы: Пер. с англ. / Дж. Финдлей, У. Эванз, ред. М., 1990.
15. Biological membranes: A practical approach: Transl. from Engl. / J.B.C. Findlay, W.H. Evans, eds. Moscow, 1990.
16. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. № 1. P. 497–509.
17. Boath A., Graf C., Lidome E. et al. Regulation and traffic of ceramide 1-phosphate produced by ceramide kinase: comparative analysis to glucosylceramide and sphingomyelin // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 13. P. 8517–8526.
18. Jin S., Yi F., Zhang F. et al. Lysosomal targeting and trafficking of acid sphingomyelinase to lipid raft platforms in coronary endothelial cells // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2008. V. 28. № 11. P. 2056–2062.
19. Bruni P., Donati C. Pleiotropic effects of sphingolipids in skeletal muscle // Cell Mol. Life Sci. 2008. V. 65. № 23. P. 3725–3736.
20. Hait N.C., Oskeritzian C.A., Paugh S.W. et al. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases // Biochim. Biophys. Acta. 2006 V. 1758. № 12. P. 2016–2026.
21. Błachnio-Zabielska A., Baranowski M., Zabielski P., Górski J. Effect of exercise duration on the key pathways of ceramide metabolism in rat skeletal muscles // J. Cell Biochem. 2008. V. 105. № 3. P. 776–784.
22. Ullman M.D., Radin N.S. The enzymatic formation of sphingomyelin from ceramide and lecithin in mouse liver // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 5. P. 1506–1512.
23. Pyne S., Lee S.C., Long J., Pyne N.J. Role of sphingosine kinases and lipid phosphate phosphatases in regulating spatial sphingosine 1-phosphate signaling in health and disease // Cell Signal. 2009. V. 21. № 1. P. 14–21.
24. Stickland N.C., Crook A.R., Sutton C.M. Effects of pituitary dwarfism in the mouse on fast and slow skeletal muscle // Acta Anat. (Basel). 1994. V. 151. № 4. P. 245–249.

Поступила 29.09.2017

SPHINGOLIPID METABOLISM IN MICE FORELIMB AND HINDLIMB SKELETAL MUSCLES UNDER ANTIORTHOSTATIC SUSPENSION OF DIFFERENT DURATIONS

Bryndina I.G., Shalagina M.N., Ovechkin S.V., Yakovlev A.A.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 94–98

Sphingolipids including ceramide play a pivotal role in the vital activity of cells. Ceramide and its analogs influence cell proliferation and apoptosis, oxidative processes, protein synthesis, insulin signaling, etc. The functional unloading of muscles leads to an increase in the levels of ceramide and acid sphingomyelinase. The main pathways of ceramide formation are the de novo synthesis and sphingomyelin hydrolysis, whereas its degradation is catalyzed by ceramidases. In order to elucidate the mechanisms of ceramide accumulation

in muscle under gravitational unloading, a comparative analysis of the changes in ceramide (Cer), sphingomyelin (SM) and the main enzymes of sphingolipid metabolism (acid sphingomyelinase SMPD1, ceramidase ASAH2, sphingosine kinase SPHK1 and sphingomyelin synthase SGMS1, ELISA) in m. soleus and m. biceps brachii of mice subjected to 6-hour and 14-day antiorthostatic suspension (AOS) was conducted. It has been revealed that, in m. soleus, the levels of Cer, SMPD1 and ASAH2 increase during AOS against the background of SM reduction. In m. biceps brachii, the decrease in ASAH2 and SPHK1 amounts was not accompanied by the changes of Cer and SM. Thus, the changes of enzymes involved in sphingolipid metabolism in unloaded hindlimb muscle (m. soleus) during AOS have a qualitatively different character compared to the loaded forelimb muscle (m. biceps brachii). Sphingomyelinase hydrolysis is one of the main pathways of ceramide accumulation in m. soleus during both short- and long-term functional unloading.

Key words: sphingolipids, skeletal muscle, antiorthostatic suspension.

УДК 576.32

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА БЕЛКА В ПОСТУРАЛЬНОЙ МЫШЦЕ КРЫСЫ В ПЕРИОД РЕАДАПТАЦИИ ПОСЛЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ

Мирзоев Т.М., Тыганов С.А., Петрова И.О., Шенкман Б.С.

Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

E-mail: tmirzoev@yandex.ru

Исследована динамика синтеза белка и молекулярные механизмы регуляции трансляции в камбаловидной мышце (*m. soleus*) крыс в течение периода восстановления (реадaptации) после функциональной разгрузки (антиорто-статического вывешивания). Повышенная интенсивность синтеза белка в *m. soleus* наблюдалась после 1 и 3 сут восстановления относительно контроля ($p < 0,05$). Также увеличение синтеза белка было отмечено после 7 сут реадaptации относительно группы вывешивания ($p < 0,05$). С помощью вестерн-блоттинга было обнаружено увеличение содержания рибосомальной киназы p70 (p70s6k) и белка, связывающего фактор инициации 4E (4E-BP1) после 3-суточной реадaptации и снижение после 7 сут восстановления относительно контроля ($p < 0,05$). Кроме того, на 3-и сутки реадaptации содержание фосфорилированной киназы гликогенсинтазы (GSK-3 β) было повышено по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Содержание фактора инициации трансляции 2B (eIF2B- ϵ) оказалось достоверно выше через 3 сут реадaptации относительно контроля ($p < 0,05$), при этом содержание фосфо-eIF2B- ϵ было достоверно повышено после 24 ч реадaptации по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Полученные данные характеризуют состояние внутриклеточных анаболических сигнальных систем в *m. soleus* в условиях восстановления после атрофии.

Ключевые слова: *m. soleus*, реадaptация, синтез белка, p-p70s6k, 4E-BP1, GSK-3 β .

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 99–105.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-99-105

Восстановление массы и функциональных способностей постуральных мышц млекопитающих после атрофии, вызванной длительным бездействием мышц вследствие воздействия невесомости или вынужденной иммобилизации, остается актуальным вопросом гравитационной физиологии и реабилитационной медицины. Переход от гравитационной разгрузки двигательного аппарата к земной гравитации сопровождается рядом событий, отражающих зависимость пластических свойств скелетной мускулатуры от режима сократительной активности. Таким образом, мы наблюдаем один из феноменов

«физиологической адаптации» биологических систем. Важным событием в процессе реадaptации (восстановления) атрофированной мышцы является изменение активности ключевых внутриклеточных сигнальных путей, регулирующих синтез белка. Согласно гипотезе авторов работ [1–3], существует принципиальная схожесть механизмов, задействованных в скелетной мышце в ранний период реадaptации и после выполнения эксцентрической нагрузки. Данная гипотеза была подтверждена отечественными и зарубежными исследователями, которые показали, что в первые дни реадaptации в постуральной мышце наблюдается как нарушение проницаемости сарколеммы для макромолекул [4, 5], так и повышенная активность цистеиновых протеаз кальпаинов [6] и соответственно снижение содержания ряда цитоскелетных белков [7]. С другой стороны, известно, что эксцентрическая нагрузка вызывает активацию синтеза белка и гипертрофию [8–10], следовательно, можно предположить, что в начальный период реадaptации могут быть задействованы компоненты сигнальной системы mTORC1, приводящие к увеличению скорости трансляции на рибосомах. Действительно, ранее было показано, что на разных этапах реадaptации в камбаловидной мышце грызунов происходит увеличение фосфорилирования таких сигнальных молекул, как Akt, GSK-3 β , p-70s6k [11–13], что может приводить к интенсификации белкового синтеза. Достоверное увеличение интенсивности синтеза белка в *m. soleus* крысы наблюдалось уже через 18 ч реадaptации после функциональной разгрузки [14]. Ключевая роль mTOR для реадaptации атрофированной мышцы была доказана авторами работ [15, 16], которые показали существенное замедленное восстановление синтеза белка и мышечной массы у гетерозиготных мышей по гену mTOR, а также у крыс при применении ингибитора mTORC1. Кроме канонического сигнального каскада IGF1-PI3K-Akt-mTORC1-p70s6k, существуют альтернативные mTORC1-независимые сигнальные пути, способные активировать синтез белка, в частности GSK-3 β -eIF2B и ERK-p90RSK [17, 18]. Однако в настоящее время в научной

Таблица

Масса животных и масса камбаловидной мышцы (*m. soleus*), нормированные к массе тела

Группа	Масса животных, г	Масса <i>m. soleus</i> , мг / масса животного, г
Контроль	232 ± 6	0,46 ± 0,015
14HS	226 ± 5	0,23 ± 0,016*
1R	227 ± 5,5	0,30 ± 0,017*, #
3R	228 ± 5,2	0,31 ± 0,015*, #
7R	230 ± 4,8	0,33 ± 0,023*,#
14R	239 ± 7	0,41 ± 0,014#

Примечание. 14HS – антиортостатическое вывешивание в течение 14 сут; 1R, 3R, 7R, 14R – реадаптация после функциональной разгрузки в течение 1, 3, 7 и 14 сут; n = 7 для каждой группы; * – достоверное отличие от группы контроль, p < 0,05; # – достоверное отличие от группы 14HS, p < 0,05.

литературе отсутствуют целостные представления о динамике синтеза белка и молекулярных механизмах, регулирующих синтез белка в постуральной мышце млекопитающих в период реадаптации после функциональной разгрузки. В связи с этим цель данного исследования заключалась в оценке динамики интенсивности синтеза белка и выявлении изменений изучаемых сигнальных молекул, которые могли бы повлиять на динамику белкового синтеза в камбаловидной мышце крысы на разных сроках реадаптации (1, 3, 7 и 14 сут) после моделируемой гравитационной разгрузки.

Методика

Животные и антиортостатическое вывешивание. В эксперименте использовались самцы крыс Вистар массой 220 ± 5 г, которые были случайным образом разделены на следующие группы: 1) контроль (n = 7); 2) 14HS (n = 7) – 14-суточное антиортостатическое вывешивание; 3) 1R (n = 7) – 1-суточная реадаптация после вывешивания; 4) 3R (n = 7) – 3-суточная реадаптация после вывешивания; 5) 7R (n = 7) – 7-суточная реадаптация после вывешивания; 6) 14R (n = 7) – 14-суточная реадаптация после вывешивания. Животные содержались в виварных условиях, получая стандартный корм и воду ad libitum. В исследовании использовалась стандартная модель антиортостатического вывешивания, позволяющая имитировать эффекты гипогравитации, вызывая атрофию мышц задних конечностей грызунов [19]. Эвтаназия животных проводилась посредством внутрибрюшинного введения 10%-ного раствора авертина (10 мл/кг). Все процедуры с животными были одобрены Комиссией

по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 392 от 15.05.2015 г.).

Метод оценки скорости трансляции белка *in vivo*. Интенсивность синтеза белка в *m. soleus* оценивалась с помощью метода пурамицинового мечения – SUnSET. Данный метод предполагает использование антибиотика пурамицина (структурного аналога тирозил-тРНК) и соответствующих антител для выявления количества пурамицина, встраивающегося в образующиеся пептидные цепи [20]. Было показано, что включение пурамицина в растущую полипептидную цепь ограничивает элонгацию, причем, когда пурамицин используется в низких концентрациях (40 нмоль/г), накопление конъюгированных с пурамицином пептидов отражает интенсивность белкового синтеза [21]. В дальнейшем интенсивность белкового синтеза выявляется с помощью вестерн-блоттинга. Для данного исследования был использован гидрохлорид пурамицина (Enzo Life Sciences, США) в дозе 40 нмоль/г, который вводился за 30 мин до эвтаназии животных (500 мкл на крысу внутрибрюшинно).

Выделение белка и вестерн-блоттинг. Камбаловидная мышца крысы извлекалась хирургическим путем под общим авертиновым наркозом. Затем мышцу взвешивали, фиксировали на картонной подложке с помощью Sakura Finetek Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, США) и замораживали в жидком азоте. Мышечные пробы хранили при температуре -80 °С. Для выделения белка на криостате Leica (Германия) при -20 °С замороженную мышечную ткань нарезают (80 срезов толщиной 20 мкм) в пробирки. Затем в пробирки с образцами добавляли охлажденный лизирующий буфер RIPA Lysis Buffer System (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, США) с 5 мМ EDTA 24 мкл/мл; 1 мМ Na₃VO₄ 20 мкл/мл; 1 мМ DTT 4 мкл/мл; 1 мМ PMSF 20 мкл/мл; 1 мМ аprotинин 5 мкл/мл; 1 мМ лейпептин 5 мкл/мл; 1 мМ пепстатин А 5 мкл/мл и коктейлем ингибиторов фосфатаз 40 мкл/мл (Phosphatase Inhibitor Cocktail B, sc-45045, Santa Cruz Biotechnology, США) из расчета 130 мкл буфера на 1 пробу. Затем проводили гомогенизацию и центрифугирование (в течение 15 мин при температуре +4 °С и 12 000 об/мин). После этого отбирали надосадочную жидкость и определяли концентрацию белка на спектрофотометре UV-2450 (Shimadzu, Япония) методом Bradford, измеряя поглощение на длине волны 595 нм. Концентрация белка в пробах рассчитывалась по калибровочной кривой. Электрофорез по методу Лэммли [22] проводили в 10%-ном разделяющем полиакриламидном геле в мини-системе Bio-Rad (США) в течение часа при силе тока 17 мА на 1 гель. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) осуществляли в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad, США) в течение 2 ч при температуре +4 °С и постоянном напряжении 100 В. Затем для проверки равной загрузки белка на все дорожки нитроцеллюлозную

мембрану красили краской Ponceau S. После этого мембрану отмывали от Ponceau S и блокировали в 4 %-ном растворе сухого молока в PBST (PBS + 0,1 % Tween 20) при комнатной температуре в течение часа. Затем проводили инкубацию (в течение 15 ч, +4 °C) с первичными антителами против p-70s6k (Thr 389) с разведением 1 : 2000 (sc-11759, Santa-Cruz, США), p70s6k (#9202, 1 : 1000, Cell Signaling, США), p-4E-BP-1 (Thr37/46) с разведением 1 : 1000 (#2855, Cell Signaling, США), 4E-BP-1 (1 : 1000, #9452, Cell Signaling, США), eIF2B-epsilon (1 : 1000, sc-9982, Santa-Cruz, США), phospho-eIF2B-epsilon (S539) (1 : 1000, ab4775, Abcam, США), p-GSK-3β (Ser 9) с разведением 1 : 1000 (#9322, Cell Signaling, США), GSK-3β с разведением 1 : 1000 (#12456, Cell Signaling, США), пуромидина (с разведением 1 : 3000, EQ0001 Kerafast Inc., Boston, США), а также моноклональными антителами Anti-GAPDH (G041, abm, Канада) в разведении 1 : 3000. После этого отмывали мембраны в PBST 5 раз по 5 мин. Затем мембраны инкубировали в течение часа с биотинилированными вторичными антителами goat anti-rabbit (sc-2004, Santa Cruz, США) в разведении 1 : 1000. Для выявления GAPDH и пуромидина использовали вторичные антитела goat anti-mouse в разведении 1 : 20 000 (#1706516, Bio-Rad, США). Далее проводили отмывку в PBST 5 раз по 5 мин. Белковые полосы определяли на мембране с помощью Star TM Substrate Kit (Bio-Rad, США). Для пуромидина измеряли оптическую плотность каждой целой дорожки. Анализ белковых полос проводили с использованием блот-сканера C-DiGit (LI-COR Biotechnology, США) и соответствующей программы Image Studio Digits. Полученный от белковых полос сигнал был нормализован к референсному белку GAPDH.

При статистической обработке определяли средние значения и стандартную ошибку ($M \pm SE$). Для оценки достоверности различий между группами проводили дисперсионный анализ с последующим применением критерия Тьюки для множественных сравнений. Достоверными считали отличия с уровнем значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Масса животных, масса камбаловидной мышцы. Масса крыс из экспериментальных групп достоверно не отличалась от массы контрольных животных (таблица), что могло косвенно свидетельствовать об отсутствии стресса во время экспериментальных воздействий. Отношение массы камбаловидной мышцы к массе животного оказалось достоверно ($p < 0,05$) ниже контрольных значений во всех экспериментальных группах животных, кроме группы 14-суточного восстановления (см. табл.). При этом достоверное ($p < 0,05$) увеличение массы *m. soleus* относительно группы 14-суточной функциональной

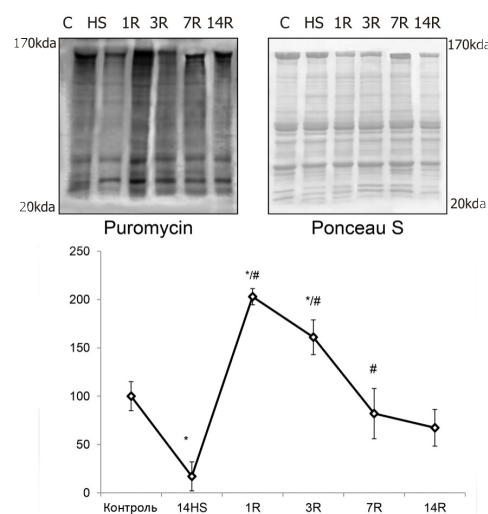


Рис. 1. Динамика интенсивности синтеза белка в камбаловидной мышце крысы в период реадaptации после функциональной разгрузки, выраженная в % относительно контрольной группы.

Данные представлены в % от группы контроль. Над гистограммой представлены соответствующие иммуноблот (слева) и окраска мембраны красителем Ponceau S (справа). Здесь и на рис. 2–5: 14HS – антиортостатическое вывешивание в течение 14 сут, 1R, 3R, 7R, 14R – реадaptация после функциональной разгрузки в течение 1, 3, 7 и 14 сут; $n = 7$ для каждой группы; * – достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$; # – достоверное отличие от группы 14HS, $p < 0,05$

разгрузки наблюдалось на 1, 3, 7 и 14-е сутки реадaptации (см. табл.).

Интенсивность синтеза белка в камбаловидной мышце. Антиортостатическое вывешивание в течение 14 сут привело к снижению интенсивности синтеза белка на 83 % ($p < 0,05$) относительно контрольных значений (рис. 1). Уже на начальном этапе (24 ч) реадaptации атрофированной мышцы наблюдалось резкое увеличение ($p < 0,05$) скорости синтеза белка как относительно группы вывешивания, так и относительно контроля. После 3 и 7 сут периода реадaptации интенсивность трансляции оставалась повышенной относительно контрольного уровня ($p < 0,05$), а к 14-м суткам уже не отличалась от контрольных значений (см. рис. 1).

Ключевые маркеры анаболических сигнальных путей в камбаловидной мышце. Содержание одного из субстратов mTORC1 – фосфо-p70s6k – достоверно снизилось после моделируемой гравитационной разгрузки на 25 % ($p < 0,05$) относительно контрольного уровня (рис. 2). Пониженное содержание фосфо-p70s6k сохранилось и после 24 ч реадaptации (см. рис. 2). Однако к 3-м суткам реадaptации произошло резкое увеличение содержания фосфо-p70s6k на 75 % ($p < 0,05$) относительно группы

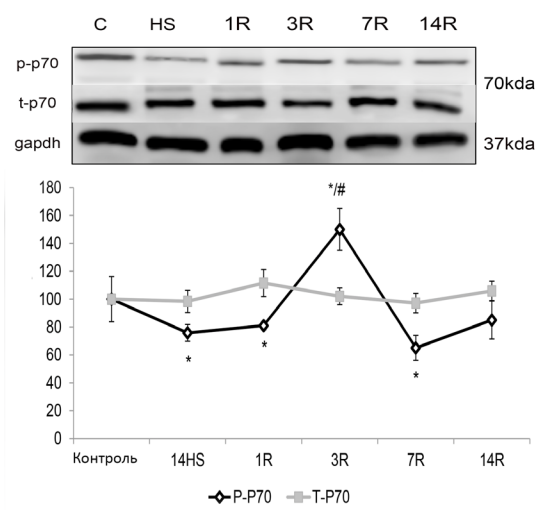


Рис. 2. Содержание тотальной и фосфорилированной форм р70s6k в камбаловидной мышце крысы, выраженное в процентах относительно контрольной группы. Здесь и на рис. 3–5: Данные представлены в % от группы контроль. Над гистограммой представлены соответствующие иммуноблоты

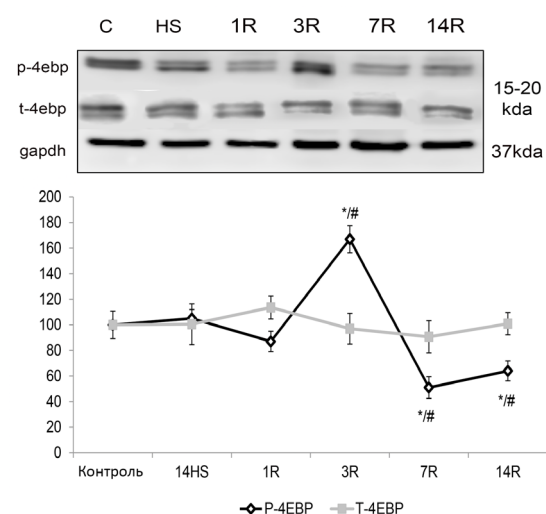


Рис. 3. Содержание тотальной и фосфорилированной форм 4E-BP1 в камбаловидной мышце крысы, выраженное в % относительно контрольной группы

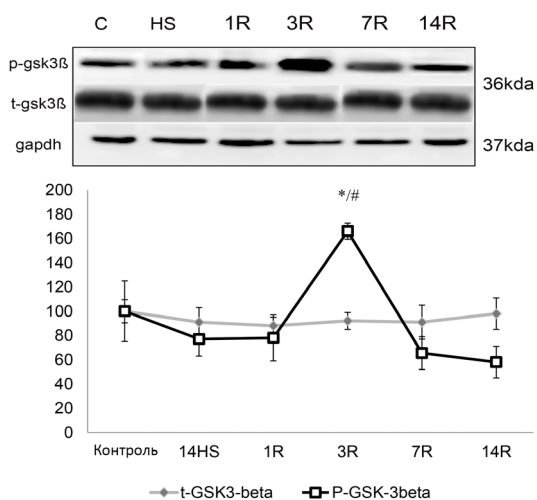


Рис. 4. Содержание тотальной и фосфорилированной форм GSK-3β в камбаловидной мышце крысы, выраженное в % относительно контрольной группы

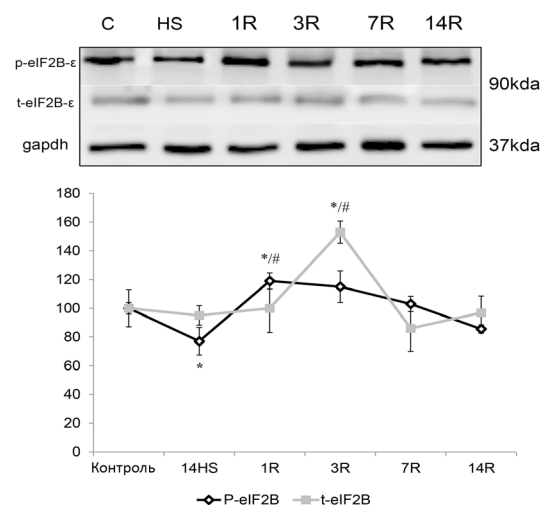


Рис. 5. Содержание тотальной и фосфорилированной форм eIF2B в камбаловидной мышце крысы, выраженное в % относительно контрольной группы

14HS и на 50 % ($p < 0,05$) относительно контроля (см. рис. 2). Через неделю после функциональной разгрузки содержание фосфо-р70s6k оказалось несколько сниженным относительно контроля ($p < 0,05$), а после 14-суточной реадaptации не отличалось от контрольных значений (см. рис. 2). Схожая динамика фосфорилирования наблюдалась и для другого субстрата системы mTOR – 4E-BP1. Так, на 3-и сутки реадaptации произошло резкое увеличение содержания фосфо-4E-BP1 на 67 %

($p < 0,05$) относительно контроля, а к 7-м суткам наблюдалось достоверное снижение ($p < 0,05$) фосфорилированной формы данного белка относительно 14HS и контроля (рис. 3). Содержание тотальных форм р70s6k (см. рис. 2) и 4E-BP1 (см. рис. 3) с течением реадaptации не изменялось. Фосфорилирование маркера mTORC1-независимого сигнального пути – GSK-3β – оказалось достоверно увеличенным ($p < 0,05$) через 3 сут периода реадaptации относительно контроля, однако содержание

тотальной формы GSK-3 β не изменялось (рис. 4). При этом содержание eIF2B в камбаловидной мышце крысы было также достоверно увеличено через 3 сут после окончания функциональной разгрузки (рис. 5). В то же время, содержание фосфо-eIF2B- ϵ было достоверно снижено после 14-суточной функциональной разгрузки на 23 % ($p < 0,05$) относительно контроля (см. рис. 5). Однако через сутки реадaptации степень фосфорилирования eIF2B увеличилась на 42 и 19 % ($p < 0,05$) относительно 14HS и контроля соответственно (см. рис. 5). При этом, судя по данным вестерн-блота, соотношение фосфорилированной и дефосфорилированной форм eIF2B- ϵ оказалось сниженным (см. рис. 5).

Исходя из обоснованной гипотезы, что ранний период реадaptации после функциональной разгрузки воспринимается скелетной мышцей как эксцентрическая нагрузка [1–3], можно было предположить, что интенсивность синтеза белка в 1-е сутки восстановления после моделируемой гравитационной разгрузки будет увеличена. Действительно, с помощью метода SUnSET мы обнаружили резкое увеличение скорости трансляции в *m. soleus* крысы через 24 ч реадaptации. Это согласуется с данными авторов работы [14], которые обнаружили достоверное усиление синтеза белка в камбаловидной мышце крысы через 18 ч реадaptации после 9-суточной функциональной разгрузки. Согласно нашим данным, повышенная скорость синтеза белка относительно контроля отмечалась и на 3-и сутки восстановления, но через неделю реадaptации достоверных отличий от контрольных значений уже не наблюдалось. Хорошо известно, что важнейшим регулятором синтеза белка в мышечных и других клетках является протеинкиназа mTOR, главными индикаторами активности которой являются p70s6k и 4E-BP1 [16]. В многочисленных исследованиях показано, что фосфорилирование данных субстратов mTOR приводит к активации процессов инициации трансляции белка посредством индуцирования сборки комплекса eIF4F и фосфорилирования рибосомального белка S6 [23–26]. В данном исследовании было измерено содержание фосфорилированных форм обоих субстратов mTORC1, которые показали схожую динамику в течение всего периода реадaptации. Так, через сутки реадaptации содержание фосфорилированных p70s6k и 4E-BP1 не отличалось от контроля, затем наблюдался рост на 3-и сутки и спад на 7-е сутки восстановления. Аналогичное увеличение фосфорилирования p70s6k и 4E-BP1 в *m. soleus* крысы на 3-и сутки восстановления после 10-суточной гипсовой иммобилизации или антиортостатического вывешивания было ранее показано рядом зарубежных авторов [11, 12]. Инициация трансляции белка может также регулироваться посредством mTOR-независимого сигнального пути Akt-GSK3 β -eIF2B [17]. Протеинкиназа B (Akt) может

снижать киназную активность GSK3 β через фосфорилирование по S9 [27]. Инактивирование GSK3 β может приводить к дефосфорилированию фактора инициации eIF2B- ϵ по S539, что, в свою очередь, позволяет активировать инициацию трансляции [28, 29]. В связи с этим в рамках данного исследования была установлена динамика фосфорилирования GSK3 β и eIF2B- ϵ . Повышенное фосфорилирование GSK3 β было отмечено после 3 сут реадaptации, что согласуется с данными авторов работы [13]. При этом было отмечено достоверное увеличение содержания тотальной формы eIF2B- ϵ в камбаловидной мышце на 3-и сутки реадaptации (отношение фосфорилированной к дефосфорилированной форме eIF2B- ϵ по данным вестерн-блота снижено), что могло активировать инициацию трансляции. Важно заметить, что резкое увеличение синтеза белка через 24 ч реадaptации не сопровождалось предполагаемым увеличением фосфорилированных форм таких сигнальных молекул, как GSK3 β , p70s6k или 4E-BP1, поэтому мы не можем говорить о механизмах, влияющих на трансляционную эффективность (увеличение скорости трансляции на данной рибосомной инфраструктуре). В то же время не исключено, что повышенная скорость синтеза белка на 1-е сутки реадaptации могла быть обусловлена увеличением трансляционной емкости (объем рибосомного аппарата). Возможно, на фоне пониженного фосфорилирования p70s6k на 14-е сутки гравитационной разгрузки мог активироваться рибосомальный биогенез, которому, принадлежит ключевая роль в регуляции мышечной массы [30]. Однако не исключена немедленная активация mTOR-зависимых механизмов при первых опорных нагрузках на мышцу. Это предположение связано с известной интерпретацией процессов острой реадaptации как процессов, сопровождающихся эксцентрическими нагрузками [1–3]. Известно, что серия эксцентрических сокращений скелетной мышцы уже через 30 мин может активировать mTOR [10]. Возможно, исследование сигнальных механизмов трансляции в первые часы после функциональной разгрузки позволит ответить на этот вопрос. Предполагаем, что длительное поддержание высокого уровня активности рибосомальных киназ в первые часы реадaptации могло привести к аутоингибированию по принципу обратной связи [31], в связи с чем к 24 ч реадaptации увеличение фосфо-p70s6k в *m. soleus* крысы не наблюдалось.

Выводы

Показана динамика интенсивности синтеза белка в камбаловидной мышце крысы в течение 14-суточной реадaptации после функциональной разгрузки. При этом проанализирована динамика содержания фосфорилированных форм p70s6k, 4E-BP1, GSK3 β ,

eIF2B – сигнальных молекул, которые могут быть вовлечены в регуляцию процесса биосинтеза белка в мышечном волокне.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-04-00530 и Программой фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

Список литературы

1. Riley D.A., Ellis S., Slocum G.R. et al. In-flight and postflight changes in skeletal muscles of SLS-1 and SLS-2 spaceflown rats // *J. Appl. Physiol.* 1996. V. 81. P. 133–144.
2. Krippendorf B.B., Riley D.A. Temporal changes in sarcomere lesions of rat adductor longus muscles during hindlimb reloading // *Anat. Rec.* 1994. V. 238. № 3. P. 304–310.
3. Riley D.A., Ellis S., Giometti C.S. et al. Muscle sarcomere lesions and thrombosis after spaceflight and suspension unloading // *J. Appl. Physiol.* 1992. V. 73. P. 33–43.
4. Kasper C.E. Sarcolemmal disruption in reloaded atrophic skeletal muscle // *J. Appl. Physiol.* 1995. V. 79. P. 607–614.
5. Gasnikova N.M., Shenkman B.S. Influence of rat hindlimb suspension on sarcolemmal dystrophin and its sensitivity to mechanical damage // *J. Gravit. Physiol.* 2005. V. 12. P. 125–126.
6. Enns D.L., Belcastro A.N. Early activation and redistribution of calpain activity in skeletal muscle during hindlimb unweighting and reweighting // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006. V. 84. P. 601–609.
7. Mirzoev T.M., Shenkman B.S., Ushakov I.B., Ogneva I.V. Desmin and α -actinin-2 content in rat soleus muscle in the dynamics of gravitational unloading and subsequent reloading // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2012. V. 444. P. 144–146.
8. Baar K., Esser K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 276. P. 120–127.
9. Spangenburg E.E., McBride T.A. Inhibition of stretch-activated channels during eccentric muscle contraction attenuates p70S6K activation // *J. Appl. Physiol.* 2006. V. 100. P. 129–135.
10. O'Neil T.K., Duffy L.R., Frey J.W., Hornberger T.A. The role of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidic acid in the regulation of mammalian target of rapamycin following eccentric contractions // *J. Physiol.* 2009. V. 587. P. 3691–3701.
11. Childs T.E., Spangenburg E.E., Vyas D.R., Booth F.W. Temporal alterations in protein signaling cascades during recovery from muscle atrophy // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2003. V. 258. P. 391–398.
12. Sugiura T., Abe N., Nagano M. et al. Changes in PKB/Akt and calcineurin signaling during recovery in atrophied soleus muscle induced by unloading // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005. V. 288. P. 1273–1278.
13. Van der Velden J.L., Langen R.C., Kelders M.C. et al. Myogenic differentiation during regrowth of atrophied skeletal muscle is associated with inactivation of GSK-3 β // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2007. V. 292. P. 1636–1644.
14. Taillandier D., Aurousseau E., Combaret L. et al. Regulation of proteolysis during reloading of the unweighted soleus muscle // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003. V. 35. P. 665–675.
15. Lang S.M., Kazi A.A., Hong-Brown L., Lang C.H. Delayed recovery of skeletal muscle mass following hindlimb immobilization in mTOR heterozygous mice // *PLoS One.* 2012. V. 7. e38910.
16. Bodine S.C., Stitt T.N., Gonzalez M. et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo // *Nat. Cell Biol.* 2001. V. 3. P. 1014–1019.
17. Glass D.J. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy // *Nat. Cell Biol.* 2003. V. 5. P. 87–90.
18. Roux P.P., Topisirovic I. Regulation of mRNA translation by signaling pathways // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. V. 4. a012252.
19. Morey-Holton E., Globus R. The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data // *J. Appl. Physiol.* 2002. V. 92. P. 1367–1377.
20. Goodman C., Mabrey D., Frey J. et al. Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique // *FASEB J.* 2011. V. 25. P. 1028–1039.
21. Schmidt E.K., Clavarino G., Ceppi M., Pierre P. SUNSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis // *Nat. Methods.* 2009. V. 6. P. 275–277.
22. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
23. Brunn G.J., Hudson C.C., Sekulić A. et al. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin // *Science.* 1997. V. 277. P. 99–101.
24. Lin T.A., Kong X., Haystead T.A. et al. PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation // *Ibid.* 1994. V. 266. P. 653–656.
25. Terada N., Patel H.R., Takase K. et al. Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and ribosomal proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 11477–11481.
26. Kawasome H., Papst P., Webb S. et al. Targeted disruption of p70(s6k) defines its role in protein synthesis and rapamycin sensitivity // *Ibid.* 1998. V. 95. P. 5033–5038.
27. Harwood A.J. Regulation of GSK-3: a cellular multiprocessor // *Cell.* 2001. V. 105. P. 821–824.
28. Welsh G.I., Miller C.M., Loughlin A.J. et al. Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin // *FEBS Lett.* 1998. V. 421. P. 125–130.
29. Pap M., Cooper G.M. Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 β signaling pathway // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. P. 578–586.

30. Chaillou T., Kirby T.J., McCarthy J.J. Ribosome biogenesis: emerging evidence for a central role in the regulation of skeletal muscle mass // J. Cell Physiol. 2014. V. 229. P. 1584–1594.

31. Hsieh C.T., Chuang J.H., Yang W.C. et al. Ceramide inhibits insulin-stimulated Akt phosphorylation through activation of Rheb/mTORC1/S6K signaling in skeletal muscle // Cell Signal. 2014. V. 26. P. 1400–1408.

Поступила 15.08.2017

SIGNALING PATHWAYS OF PROTEIN SYNTHESIS REGULATION IN RAT POSTURAL MUSCLE DURING RECOVERY AFTER HINDLIMB UNLOADING

Mirzoev T.M., Tyganov S.A., Petrova I.O., Shenkman B.S.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 99–105

Time course changes in the rate of protein synthesis and molecular mechanisms of translation regulation

were investigated in rat soleus muscle during recovery (reloading) from mechanical unloading (hindlimb suspension). An increased rate of protein synthesis in soleus was observed after one and 3 days of recovery compared to control ($p < 0.05$). A rise in protein synthesis was also detected after 7 days of reloading compared to suspended rats ($p < 0.05$). Using Western blotting, we detected an increase in ribosomal kinase p70 (p70s6k) and initiation factor 4E binding protein (4E-BP1) phosphorylation after 3-day reloading vs. control ($p < 0.05$) and a decrease in the phosphorylation of these proteins after 7 days of recovery relative to control ($p < 0.05$). In addition, 3-day reloading induced a significant increase in phosphorylated glycogen synthase kinase (GSK-3 β) vs. control ($p < 0.05$). The content of translation initiation factor 2B (eIF2B- ϵ) was significantly higher after 3 days of reloading vs. control ($p < 0.05$), whereas the content of phospho-eIF2B- ϵ was significantly increased after 24 hours of reloading compared with control ($p < 0.05$). Thus, we obtained new data about the state of intracellular anabolic signaling pathways in rat soleus during recovery after disuse-induced atrophy.

Key words: soleus muscle, reloading, protein synthesis, p70s6k, 4E-BP1, GSK-3 β .

УДК 612.111.2

ОБЪЕМ КРОВИ, ЕЕ КЛЕТОЧНЫЙ СОСТАВ И СОДЕРЖАНИЕ ВОДЫ В ТКАНЯХ МЫШЕЙ ПРИ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОМ ВЫВЕШИВАНИИ

Попова А.С.^{1, 2}, Лагерева Е.А.¹, Виноградова О.Л.¹, Андреев-Андреевский А.А.^{1, 2}

¹Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

E-mail: aandrievsky@gmail.com

Снижение объема плазмы, последующее снижение эритроцитарной массы и уменьшение объема крови – хорошо описанные элементы адаптации сердечно-сосудистой системы человека и крупных животных в условиях микрогравитации. У крыс при воздействии микрогравитации снижаются гематологические показатели, но не объем крови; у еще более мелких животных, мышей, реакция этих показателей на микрогравитацию не исследована.

В модели антиортостатического вывешивания показано постепенное снижение показателей красной крови мышей в течение первых 3 сут вывешивания на $\approx 8-10\%$; с 3-х по 7-е сутки вывешивания количество эритроцитов, гематокрит, содержание гемоглобина не изменялись. Объем крови, измеренный по разведению синего Эванса, и объем плазмы (расчетный) при вывешивании практически не изменялись. Содержание воды в ткани мышц задних конечностей транзиторно (на 1-е и 3-и сутки) снижалось (на $\approx 1\%$) и возрастало в слюнных железах ($+3\%$ на 7-е сутки); снижение содержания воды обнаружено также в почках, но не других обильно кровоснабжаемых тканях (мозге, легких).

Таким образом, у мелких четвероногих млекопитающих наблюдаются сходные с более крупными животными и человеком реакции гематологических показателей, но не изменения жидкостных объемов.

Ключевые слова: мыши, вывешивание, объем крови, гематокрит, содержание воды, микрогравитация.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 106–113.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-106-113

Выход плазмы из сосудистого русла [1], последующее снижение количества эритроцитов [2] и, таким образом, общее снижение объема крови [3] являются хорошо описанными элементами адаптации сердечно-сосудистой системы человека к микрогравитации в условиях реального космического полета (КП). Исчезновение в отсутствие воздействия гравитации гидростатического градиента давления, составляющего у человека в среднем 130 мм рт. ст. [4], считается ключевым фактором, инициирующим эти изменения [5]. Сходные реакции регистрируют у человека в наземных экспериментах

с использованием моделей «сухой» иммерсии [6] или антиортостатической гипокинезии [7], а также у крупных животных в условиях КП [8].

О перераспределении жидкости в организме космонавтов в условиях невесомости и при моделировании ее эффектов свидетельствуют увеличение центрального венозного давления [9], снижение объема нижних конечностей [10], отечность лица [10]. Считается, что именно перераспределение жидкости инициирует цепь регуляторных влияний, приводящих к изменению системных гемодинамических показателей: некоторому повышению частоты сокращений сердца [11], снижению артериального давления и/или сердечного выброса [11] в КП, а также к ортостатической неустойчивости в послеполетный период [12].

В то же время в 30-суточном космическом полете «Бион-М1» у мышей при помощи вживляемых телеметрических датчиков были зарегистрированы полетная тахикардия, снижение устойчивости к линейным перегрузкам при спуске космического аппарата по сравнению с реакцией на перегрузки при запуске, а также увеличение частоты сокращений сердца и пульсовой стоимости бега в послеполетный период [13]. Эти наблюдения, а также многочисленные данные о морфофункциональных перестройках кровеносных сосудов мышей после КП [14, 15] позволяют говорить о выраженной адаптации сердечно-сосудистой системы мышей к условиям микрогравитации. Примечательно, что реакции некоторых показателей работы сердечно-сосудистой системы у мышей напоминают изменения у человека, по крайней мере, описанные до внедрения эффективных мер профилактики негативного воздействия микрогравитации.

Очевидно, что у мышей, в силу малого размера тела и передвижения на 4 лапах, гидростатический градиент давления в наземных условиях пренебрежимо мал и, по-видимому, не может служить причиной наблюдаемых после КП изменений функции сердечно-сосудистой системы. В настоящее время неизвестно, наблюдается ли у мышей в условиях КП перераспределение жидкости, также отсутствуют

систематические наблюдения гематологических показателей мышей при воздействии микрогравитации. Поэтому в данном исследовании проведена оценка изменений объема крови, гематологических показателей и содержания воды в тканях мышей с использованием модели антиортостатического вывешивания.

Методика

Работа выполнена на 194 самцах мышей линии BALB/C возрастом 3–4 мес и массой 23–27 г. Животные были получены из питомника лабораторных животных «Пушино» и использованы в работе после 14 сут адаптации. В течение всего эксперимента животные имели неограниченный доступ к комбикорму (Ассортимент-Агро, Россия) и питьевой воде. При проведении эксперимента соблюдали требования гуманного обращения с лабораторными животными, изложенные в Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях.

Животные были случайным образом распределены на 6 экспериментальных групп по длительности вывешивания: 0; 0,5; 1; 2; 3 и 7 сут. После вывешивания у всех животных определяли объем циркулирующей крови по разведению синего Эванса, а также забирали кровь для гематологического исследования и, у части животных, ткани – для определения содержания воды.

Подготовка животных к эксперименту состояла во вживлении внутривенных катетеров для введения красителя и адаптации к содержанию в клетках для вывешивания. Вживление катетеров проводили под комбинированным наркозом (30 мг/кг зоветила («Вирбак», Франция) в сочетании с 5 мг/кг ксилазина (Фармамэйджист Лтд., Венгрия) внутрибрюшинно). После подготовки операционного поля делали разрез кожи на шее животного выше правой ключицы, раздвигали мышцы и выделяли участок яремной вены длиной около 5 мм. На краниальный конец выделенного участка вены накладывали шелковую лигатуру 5-0 и через прокол в стенке вены вводили в нее катетер из полиэтиленовой трубки диаметром 0,6 мм на глубину 12–13 мм, что обеспечивало положение конца катетера в верхней полой вене вблизи предсердия. Катетер фиксировали в сосуде при помощи лигатур и сульфакрилатного клея (ФНПЦ «Алтай», Россия) и выводили из-под кожи на холке животного. Кожу зашивали полиглактиновой нитью 5-0 («Политехмед», Россия) и фиксировали швы сульфакрилатным клеем. В послеоперационный период до пробуждения мышам подкожно вводили 5%-ный раствор глюкозы из расчета 10 мл/кг/ч и согревали при помощи электрогрелки. После операции мышей рассаживали в

клетки для вывешивания для послеоперационного восстановления и адаптации к новым условиям содержания. Клетки были изготовлены из плексигласа и имели решетчатое дно площадью 20 x 30 см и продольную перекладину для прикрепления животных на высоте 24 см от пола.

Через 2 сут после вживления катетеров мышей подвергали антиортостатическому вывешиванию [16], для чего при помощи лейкопластыря фиксировали на хвосте животных проволоочное кольцо, которое через вертлюг соединяли легкой алюминиевой цепочкой с перекладиной клетки. Угол вывешивания составлял 30–40°. Для контроля за состоянием животных мышей ежедневно взвешивали с сохранением антиортостатического положения.

Объем циркулирующей крови оценивали методом разведения синего Эванса [17] после окончания вывешивания с сохранением антиортостатического положения тела. Мышей наркотизировали изофлураном («Бакстер», США) и при помощи стеклянного микрошприца («Гамильтон», Швейцария) объемом 50 мкл вводили 100 мкл/кг 2%-ного раствора синего Эванса через внутривенный катетер; раствор красителя вымещали из катетера 10 мкл физиологического раствора (0,9 % NaCl). Через 3 мин после введения красителя проводили торакотомию и забирали кровь из сердца. Собранную кровь стабилизировали гепарином (≈ 200 ед/мл) и разделяли на 2 аликвоты: а) для определения гематологических показателей; б) для приготовления плазмы и анализа концентрации синьки. Плазму получали центрифугированием при 2000 g в течение 5 мин. Для осаждения белков к плазме добавляли 50%-ный раствор охлажденной (+4 °C) трихлоруксусной кислоты в объемном соотношении 2 : 1, затем центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Полученный супернатант разбавляли 96%-ным этанолом в соотношении 9 : 1 в лунках микропланшета (Nunc, США). Концентрацию синьки определяли на планшетном спектрофотометре Plate Screen («Хоспитекс», Италия) при длине волны 492 нм. Концентрацию красителя в крови рассчитывали по калибровочным кривым, приготовленным с использованием крови животных-доноров и идентичной пробоподготовки. Гематологические показатели определяли при помощи автоматического ветеринарного анализатора «Гемалайт 1280» («Диксион», Россия) и набора гематологических контрольных материалов («R&D Системс», США).

Для определения содержания воды извлекали головной мозг, легкие, почки, слюнные железы, трехглавую мышцу голени и трехглавую мышцу плеча. Образцы тканей сразу после извлечения помещали в эппендорфы и герметизировали лабораторной пленкой парафильм. Массу исследуемых тканей определяли дважды: до (влажную) и после сушки (сухую) в течение 8 ч при 105 °C в сухожаровом

шкафу (Binder, Германия) с точностью $\pm 0,01$ мг при помощи весов Discovery DV215CD (Ohaus, США).

Статистический анализ данных проводили методом однофакторного дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением групп по Сидуку или Тьюки с использованием программного обеспечения Prism (версия 6, GraphPad, США). Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего.

Результаты и обсуждение

Как показано на рис. 1, объем крови мышей, оцененный по разведению синего Эванса, составлял до вывешивания $85,7 \pm 4,5$ мл/кг и за время вывешивания значимо не изменялся ($F(5,79) = 0,36$; $p = 0,8775$). Расчетный объем плазмы ($48,2 \pm 2,9$ мл/кг до вывешивания) за 7 сут вывешивания также значимо не изменялся ($F(5,79) = 0,68$; $p = 0,6413$).

Гематокрит ($F(5,144) = 2,40$; $p = 0,0401$), количество эритроцитов ($F(5,142) = 2,85$; $p = 0,0175$) и концентрация гемоглобина ($F(5,142) = 3,66$; $p = 0,0038$) за время вывешивания имели сходную динамику: показатели постепенно снижались, достигая минимума на 3-и сутки, после чего оставались стабильными (рис. 1). Так, до вывешивания гематокрит составлял $44,8 \pm 0,7$ %, а на 3-и сутки вывешивания – $41,1 \pm 1,8$ %, таким образом, снижение составило $8,1 \pm 3,9$ %. В отсутствие значимых различий при попарном сравнении величин гематокрита на разных сроках вывешивания с фоновыми значениями результаты апостериорного анализа на линейный тренд ($R^2 = 0,0719$; $p = 0,0010$) свидетельствуют о прогрессирующем снижении гематокрита по мере увеличения длительности вывешивания. Изменение количества эритроцитов было сходным и составляло $9,8 \pm 4,5$ % на 3-и сутки вывешивания ($7,88 \pm 0,39$ по сравнению с $8,74 \pm 0,21$ млн/мкл на 3-и сутки и до вывешивания соответственно); линейный тренд был значим ($R^2 = 0,0738$; $p = 0,0009$), но различия в количестве эритроцитов при попарном сравнении не достигали уровня значимости. Содержание гемоглобина значимо отличалось от фоновых значений на 3-и и 7-е сутки вывешивания и достигало $11,0 \pm 4,3$ и $9,9 \pm 2,7$ % соответственно, также был значим линейный тренд ($R^2 = 0,1008$; $p < 0,0001$).

Антиортостатическое вывешивание приводило к изменению среднего объема эритроцита (см. рис. 1; $F(5,142) = 2,47$; $p = 0,0355$), который по сравнению с фоном увеличивался на 7-е сутки вывешивания с $50,0 \pm 0,5$ до $52,2 \pm 0,7$ фл ($+4,4 \pm 1,4$ %).

Содержание воды в тканях вывешенных мышей во время вывешивания изменялось с различной динамикой (рис. 2). Так, содержание воды в тканях

мозга ($F(3,39) = 1,04$; $p = 0,3867$) и легких ($F(3,38) = 1,37$; $p = 0,2663$) при вывешивании практически не изменялось. Ткань почек в первые дни вывешивания теряла воду ($F(3,38) = 7,14$; $p = 0,0006$); наиболее выраженное снижение наблюдали на 1-е сутки ($-1,93 \pm 0,52$ %), несколько менее выраженное – на 3-и ($-1,24 \pm 0,24$ %), после чего на 7-е сутки содержание воды в ткани почек практически достигало фоновых значений. В ткани слюнных желез содержание воды постепенно (тест на линейный тренд – $R^2 = 0,3872$; $p < 0,0001$) увеличивалось и на 7-е сутки вывешивания достигало $73,39 \pm 0,26$ % по сравнению с $70,99 \pm 0,37$ до вывешивания ($+3,38 \pm 0,37$ %).

Содержание воды в мышцах голени ($F(3,38) = 8,63$; $p = 0,0002$) на 1-е и 3-и сутки вывешивания снижалось на ≈ 1 %, после чего возвращалось к фоновым значениям, а небольшое по величине снижение содержания воды в мышцах плеча не достигало уровня статистической значимости ($F(3,38) = 2,65$; $p = 0,0628$).

Обнаружено, что в модели антиортостатического вывешивания у мышей наблюдались снижение гематокрита, числа эритроцитов и содержания гемоглобина при относительно неизменных объемах крови и плазмы. Содержание воды в ткани мышц задних конечностей снижалось и возрастало в слюнных железах; снижение содержания воды было обнаружено также в почках, но не других обильно кровоснабжаемых тканях (мозге, легких). Таким образом, у мелких четвероногих млекопитающих наблюдались сходные с более крупными животными и человеком реакции гематологических показателей но не изменения жидкостных объемов.

Снижение числа эритроцитов, гематокрита и других показателей красной крови являются хорошо известным последствием КП и моделирования эффектов микрогравитации в наземных условиях у человека [2]. Применительно к крысам имеются данные, свидетельствующие как о снижении показателей красной крови [18, 19], так и об отсутствии изменений [20] или даже о повышении числа эритроцитов [21]. У других видов грызунов изменений гематокрита при моделировании воздействия микрогравитации не наблюдали [22]. Тем не менее после КП отмечали снижение числа эритроцитов [23], обусловленное снижением устойчивости клеток красной крови к гемолизу [24]. Высказывались предположения, что при этом преимущественно разрушаются старые клетки [24], однако существуют экспериментальные свидетельства об обратном, а именно преимущественном разрушении молодых клеток – нецитоллизе [3].

Описано также снижение среднего объема эритроцитов при антиортостатическом вывешивании крыс [25], что противоречит нашим результатам об увеличении объема эритроцитов у мышей на

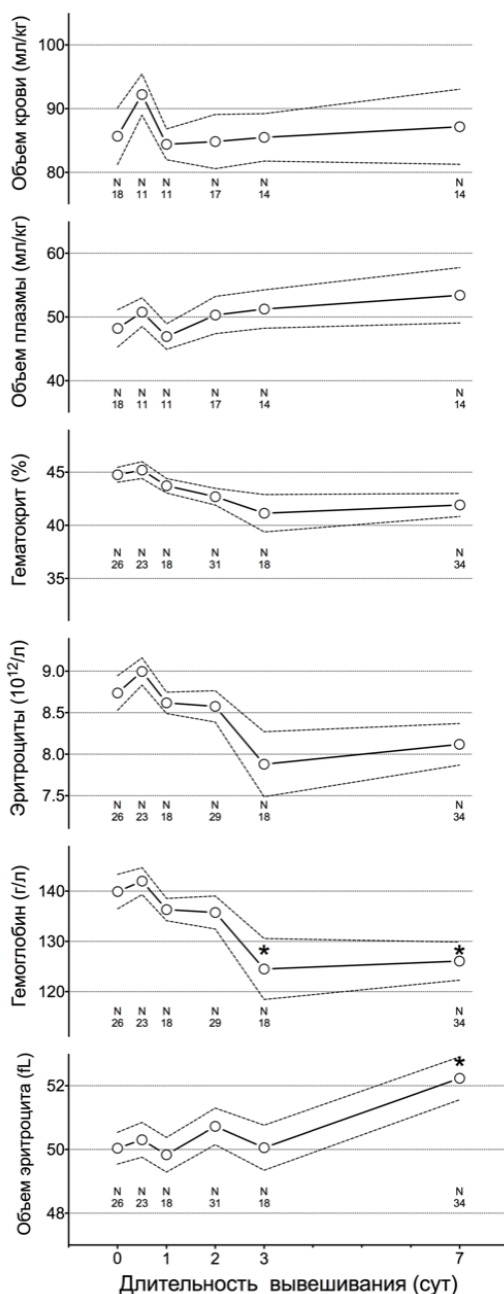


Рис. 1. Динамика объема крови и плазмы и гематологических показателей мышей за 7 сут антиортостатического вывешивания.

* – $p < 0,05$ по сравнению со значениями до вывешивания, тест Сидака. Величина выборки приведена на каждом из графиков под соответствующей временной точкой

поздних сроках вывешивания. Интересно, что изменения претерпевают не только количество красных кровяных клеток, но и свойства их мембран, в том числе жесткости [26], а также формы клеток [27]. В совокупности эти изменения могут способствовать снижению вязкости крови [28], однако экспериментальные исследования вязкости крови

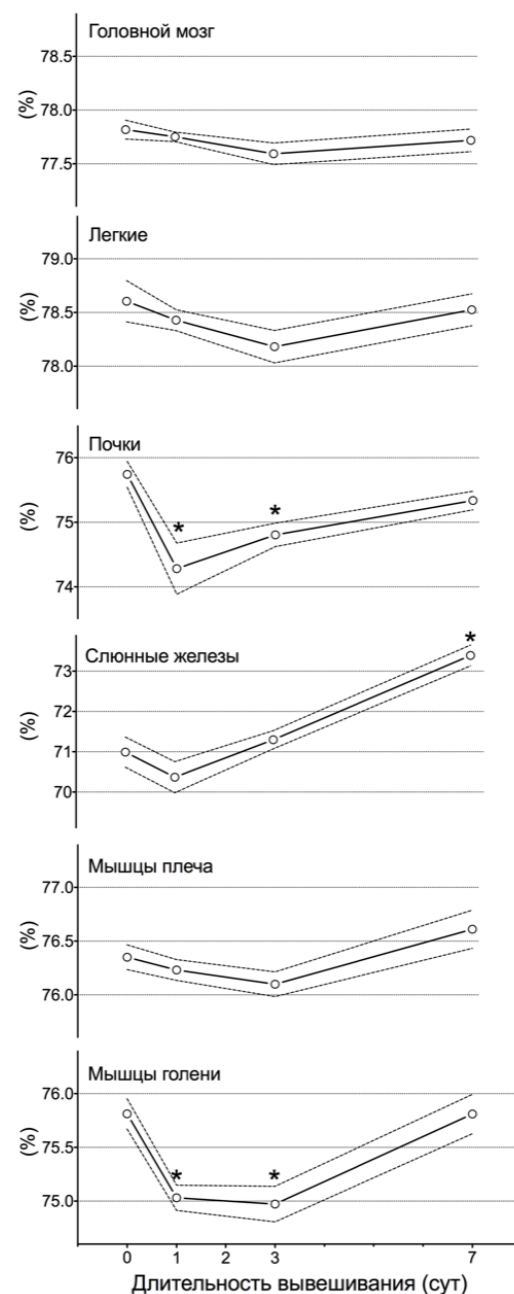


Рис. 2. Содержание воды в тканях мышей при антиортостатическом вывешивании.

* – $p < 0,05$ по сравнению со значениями до вывешивания, тест Сидака. 0-е сут – $n = 11$; 1-е сут – $n = 9$; 3-и сут – $n = 10$; 7-е сут – $n = 12$

крыс после антиортостатического вывешивания не выявили изменения реологических свойств [29]. В этой связи следует упомянуть, что нормальное содержание эритроцитов в крови мышей крайне велико в связи с малыми размерами эритроцитов и высокой скоростью метаболизма у этих мелких животных; таким образом, поддержание вязкости

крови может требовать более выраженных, чем у крупных животных с более низким количеством эритроцитов, изменений эритроцитарной массы.

При исследовании костного мозга крыс после полетов на спутниках «Космос-936» и «Космос-1129» было обнаружено угнетение гемопоэза, что проявлялось в снижении количества гемопоэтических стволовых клеток [30]. Исследования гемопоэтических клеток выявили их гравитационную чувствительность и угнетение пролиферативной активности в условиях моделируемой микрогравитации [31]. Помимо этого, возможно увеличение депонирования клеток в ретикулоэндотелиальной системе [23]. Полученные результаты о снижении гематологических показателей у мышей хорошо согласуются с опубликованными ранее данными о гематологических показателях у животных и человека в условиях КП и наземных модельных экспериментов. Учитывая данные о гравитационной чувствительности гемопоэтических клеток красной крови, можно предположить, что снижение гематологических показателей не зависит от массы тела.

Измерения объема крови и других жидкостных объемов у мышей в условиях реальной микрогравитации или моделирования ее эффектов ранее не проводились. У крыс в модели антиортостатического вывешивания с использованием диэтилентриамин пентаацетата, меченного технецием, было показано перераспределение жидкости в основных органах и изменение соотношения масса органа – масса тела после 14-суточного вывешивания. С учетом различий в массе тела контрольных и вывешенных крыс авторы сделали заключение, что паттерны восстановления баланса жидкости после вывешивания в органах различны [5]. С использованием этой же модели авторы работы [1] обнаружили повышение давления межклеточной жидкости в тканях шеи. С использованием метода разведения синего Эванса, использованного и в нашей работе, авторы исследования [32] показали отсутствие изменений жидкостных объемов у вывешенных крыс. Следует отметить, что объем крови не изменялся по сравнению с «прикрепленными» животными, в то время как у прикрепленных животных объем крови был существенно выше, чем у свободноподвижных. Это наблюдение подчеркивает важность контрольной группы в исследованиях на животных, а также комплексную природу модели антиортостатического вывешивания, включающей, наряду с собственно изменением положения тела и разгрузкой задних конечностей, и элементы гипокинезии и изоляции, которые сами по себе оказывают выраженное воздействие на социальных грызунов, мышей и крыс, используемых в данной модели [33]. В экспериментах на более крупных животных было обнаружено снижение объема плазмы у обезьян после КП [8] и

свидетельство перераспределения жидкости, а именно повышение давления ликвора при моделировании воздействия микрогравитации у кроликов [34]. Изменения жидкостных объемов у человека – снижение объема плазмы и объема межклеточной жидкости – показаны с использованием самых различных методов [4, 11, 35]. Отсюда следует, что изменение жидкостных объемов характерно для человека и более крупных животных, а у мелких животных выражено незначительно.

Использованный нами метод измерения объема крови заслуживает отдельного рассмотрения. Разведение синего Эванса является одним из наиболее давно используемых методов определения объема крови [36], однако ему свойственен ряд ограничений. Так, измерение объема при помощи синего Эванса дает существенно завышенные результаты, что выявляется при сопоставлении результатов, полученных с использованием более точных методов [37, 38]. Столь же широко, как и для измерения объема крови, синий Эванс используют для измерения проницаемости сосудов [38]. Поэтому, предположение, лежащее в основе использования данного метода для измерения объема крови, а именно распределение красителя только во внутрисосудистом объеме, заведомо не соответствует действительности. Более того, повышение проницаемости сосудов является описанным последствием моделирования воздействия микрогравитации, при этом проницаемость повышается в достаточной степени для экстравазации альбумина [39]. Альбумин, в свою очередь, является основным (в силу большого содержания в крови) переносчиком многих соединений, в том числе синего Эванса, что могло приводить к кажущемуся увеличению объема крови. В случае же, если объем крови в действительности уменьшался, экстравазация красителя могла привести к кажущемуся отсутствию различий в измеренном с использованием этого красителя объеме крови между контрольными и вывешенными животными. Таким образом, использованный нами метод имеет существенные недостатки, а полученные данные об объеме крови мышей – требуют подтверждения с использованием более точных методов.

Наконец, было обнаружено изменение содержания жидкости в тканях вывешенных мышей. Следует отметить, что содержание жидкости в ткани – высокостабильный показатель, о чем свидетельствуют и полученные результаты. Так, коэффициент вариации для содержания воды для большинства исследованных тканей не превышал 1 %. Небольшая величина обнаруженных нами изменений содержания воды в тканях не означает их малой значимости. Было выявлено транзитное снижение содержания воды в тканях почек и мышц задних конечностей и увеличение в тканях слюнных желез.

Сходное снижение содержания воды в тканях мышц задней конечности было ранее описано у вывешенных крыс [40]. «Очевидный» вывод об увеличении содержания жидкости в тканях передней (нижней у вывешенных) части тела и снижении в тканях задней (верхней), т.е. о перераспределении жидкости при моделировании воздействия микрогравитации, тем не менее представляется недостаточно обоснованным. Так, в тканях головного мозга и легких, столь же обильно перфузируемых, как и почки, но расположенных топографически в передней (нижней у вывешенной мыши) части тела, изменений содержания воды не обнаруживалось. Кроме того, в тканях мышц передних конечностей содержание воды не только не увеличивалось, но и, напротив, несколько снижалось. Можно предположить, что повышенная физическая активность передних конечностей у вывешенных животных создавала условия для более интенсивного дренирования тканей мышц плеча. В то же время данные об увеличении содержания воды в тканях слюнных желез представляются достаточно убедительными, поскольку железистая ткань имеет более «рыхлую» структуру и для нее характерен высокий оборот воды в связи с экзокринной функцией, за счет этого, вероятно, ткани слюнных желез более восприимчивы к накоплению жидкости. В связи с этим гидростатический градиент, создаваемый при вывешивании мышей, по-видимому, недостаточен для выраженного перераспределения жидкости в переднюю часть тела, по крайней мере, для более «плотных» тканей. В целом на 1–3-и сутки вывешивания, по-видимому, происходит снижение содержания воды в тканях мышей вне зависимости от их топографического положения в теле. Очевидно, что использованный метод оценки не позволяет сделать заключение о том, было ли это снижение обусловлено изменением объема внутрисосудистой, меж- или внутриклеточной жидкости.

Сопоставление полученных результатов о реакции гематологических показателей и жидкостных объемов на антиортостатическое вывешивание у мышей с данными, полученными на более крупных животных и человеке, позволяет высказать предположение о независимости от размеров организма реакции гематологических показателей на воздействие реальной микрогравитации или моделирование ее эффектов. Напротив, реакция жидкостных объемов, по-видимому, тем больше, чем больше размеры тела. Снижение гематокрита, а также изменение реологических свойств эритроцитов могут сопровождаться изменением вязкости крови, а значит, и механического (через напряжение сдвига) воздействия на эндотелий сосудов, что может лежать в основе морфофункциональной перестройки артерий и вен различных сосудистых бассейнов после КП у мышей [14, 15]. Изменения сосудов, в

свою очередь, могут быть одной из причин реакций системных гемодинамических показателей, наблюдаемых у мышей во время и после КП [13].

Выводы

У мелких четвероногих млекопитающих наблюдаются сходные с более крупными животными и человеком реакции гематологических показателей, но не изменения жидкостных объемов.

Работа выполнена в соответствии с Планом фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

Список литературы

1. Parazynski S.E., Hargens A.R., Tucker B. et al. Transcapillary fluid shifts in tissues of the head and neck during and after simulated microgravity // J. Appl. Physiol. 1991. V. 71. № 6. P. 2469–2475.
2. Поляков В.В., Иванова С.М., Носков В.Б. и др. Гематологические исследования в условиях длительных космических полетов // Авиакосм. и экол. мед. 1998. Т. 32. № 2. С. 9–18.
3. Polyakov V.V., Ivanova S.M., Noskov V.B. et al. Hematological investigations in the conditions of long-term space flights // Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina. 1998. V. 32. № 2. P. 9–18.
4. De Santo N.G., Cirillo M., Kirsch K.A. et al. Anemia and erythropoietin in space flights // Semin. Nephrol. 2005. V. 25. № 6. P. 379–387.
5. Hargens A.R., Watenpaugh D.E., Breit D.A. Control of circulatory function in altered gravitational fields // Physiologist. 1992. V. 35 (Suppl.). P. 80–83.
6. Deeve D.B., Young R. S., Wang S. et al. Changes in organ perfusion and weight ratios in post-simulated micro-gravity recovery // Acta Astronaut. 2001. V. 50. № 7. P. 445–452.
7. Ларина И.М., Кусто М.-А., Пастушкова Л.Х. и др. Состояние водно-электролитного обмена, функции почек и микроциркуляторного русла кожи обследуемых во время 7-суточной «сухой» иммерсии // Авиакосм. и экол. мед. 2008. Т. 42. № 5. С. 29–34.
8. Larina I.M., Kusto M.-A., Pastushkova L.Kh. et al. Water-electrolyte metabolism, renal function and cutaneous microcirculation in human subjects during 7-day dry immersion // Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina. 2008. V. 42. № 5. P. 29–34.
9. Иванова С.М., Моруков Б.В., Ярлыкова Ю.В. и др. Состояние системы красной крови у мужчин при длительной антиортостатической гипокинезии // Там же. 2005. Т. 39. № 6. С. 17–22.
10. Ivanova S.M., Morukov B.V., Yarlykova Yu.V. et al. The red blood system in men during long-term head-down bed rest // Ibid. 2005. V. 39. № 6. P. 17–22.

8. *Gazenko G., Ilyin E.A.* Physiological investigations of primates onboard biosatellites Cosmos-1514 and Cosmos-1667 // *Physiologist*. 1987. V. 30. (Suppl.). P. 31–34.
9. *Foldager N., Andersen T.A., Jessen F.B. et al.* Central venous pressure in humans during microgravity // *J. Appl. Physiol.* 1996. V. 1. № 1. P. 408–412.
10. *Kirsch K.A., Baartz F.J., Gunga H.C., Röcker L.* Fluid shifts into and out of superficial tissues under microgravity and terrestrial conditions // *Clin. Investig.* 1993. V. 71. № 9. P. 687–689.
11. *Norsk P., Asmar A., Damgaard M., Christensen N.J.* Fluid shifts, vasodilatation and ambulatory blood pressure reduction during long duration spaceflight // *J. Physiol.* 2015. V. 593 (Pt. 3). P. 573–584.
12. *Фомина Г.А., Котовская А.Р., Почуев В.И., Жернавков А.Ф.* Изменения гемодинамических механизмов, обеспечивающих ортостатическую устойчивость человека в длительных космических полетах // *Авиакосм. и экол. мед.* 2005. Т. 39. № 6. С. 9–17.
- Fomina G.A., Kotovskaya A.R., Pochuev V.I., Zhernavkov A.F.* Rearrangement of the hemodynamic mechanisms of orthostatic tolerance of humans on long-term space missions // *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 2005. V. 39. № 6. P. 9–17.
13. *Andreev-Andrievskiy A.A., Popova A.S., Lloret J.-C. et al.* «Bion-M1»: First continuous blood pressure monitoring in mice during a 30-day spaceflight // *Life Sci. Space Res. (Amst.)*. 2017. V. 13. P. 19–26.
14. *Taylor C.R., Hanna M., Behnke B.J. et al.* Spaceflight-induced alterations in cerebral artery vasoconstrictor, mechanical, and structural properties: implications for elevated cerebral perfusion and intracranial pressure // *FASEB J.* 2013. V. 27. № 6. P. 2282–2292.
15. *Sofronova S.I., Tarasova O.S., Gaynullina D. et al.* Spaceflight on the «Bion-M1» biosatellite alters cerebral artery vasomotor and mechanical properties in mice // *J Appl Physiol.* 2015. V. 118. № 7. P. 830–838.
16. *Ильин Е.А., Новиков В.Е.* Стенд для моделирования физиологических эффектов невесомости в лабораторных условиях // *Косм. биол. мед.* 1980. Т. 14. № 3. С. 79–80.
- Ilyin E.A., Novikov V.E.* Modeling weightlessness for studying its physiologic effects in rat experiments // *Kosmicheskaya biologiya i meditsina*. 1980. V. 14. № 3. P. 79–80.
17. *Wang H.L., Lai T.W.* Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples // *Sci. Rep.* 2014. V. 10. № 4:6588. P. 1–7.
18. *Brizzee B.L., Walker B.R.* Altered baroreflex function after tail suspension in the conscious rat // *J. Appl. Physiol.* 1990. V. 69. № 6. P. 2091–2096.
19. *Dunn C.D., Johnson P.C., Lange R.D.* Regulation of hematopoiesis in rats exposed to antiorthostatic hypokinetic/hypodynamia: II. Mechanisms of the «anemia» // *Aviat. Space Environ. Med.* 1986. V. 57. №1. P. 36–44.
20. *Allebban Z., Gibson L.A., Lange R.D. et al.* Effects of spaceflight on rat erythroid parameters // *J. Appl. Physiol.* 1996. V. 81. № 1. P. 117–122.
21. *Lange R.D., Andrews R.B., Gibson L.A. et al.* Hematological measurements in rats flown on Spacelab shuttle, SL-3 // *Am. J. Physiol.* 1987. V. 252. № 2. P. 216–221.
22. *Hu H.X., Du F.Y., Fu W.W. et al.* A dramatic blood plasticity in hibernating and 14-day hindlimb unloading Daurian ground squirrels (*Spermophilus dauricus*) // *J. Comp. Physiol. B.* 2017. V. 187. № 5–6. P. 869–879.
23. *Udden M.M., Driscoll T.B., Pickett M.H. et al.* Decreased production of red blood cells in human subjects exposed to microgravity // *J. Lab. Clin. Med.* 1995. V. 125. № 4. P. 442–449.
24. *Серова Л.В., Леон Г., Чельная Н.А., Сидоренко Л.А.* Влияние невесомости на резистентность эритроцитов in vivo и in vitro // *Авиакосм. и экол. мед.* 1993. Т. 27. № 2. С. 54–57.
- Serova L.V., Leon G.A., Chel'naya N.A., Sidorenko L.A.* The effect of weightlessness on erythrocyte resistance in vivo and in vitro // *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 1993. V. 27. № 2. P. 54–57.
25. *Dunn C.D., Johnson P.C., Lange R.D. et al.* Regulation of hematopoiesis in rats exposed to antiorthostatic, hypokinetic/hypodynamia: I. Model description // *Aviat. Space Environ. Med.* 1985. V. 56. № 5. P. 419–426.
26. *Иванова С.М., Ярлыкова Ю.В., Лабетская О.И. и др.* Влияние факторов космического полета на периферическую красную кровь человека // *Авиакосм. и экол. мед.* 1998. Т. 32. № 1. С. 35–40.
- Ivanova S.M., Yarlykova Yu.V., Labetskaya O.I. et al.* The effect of spaceflight factors on human peripheral red blood // *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 1998. V. 32. № 1. P. 35–40.
27. *Иванова С.М., Моруков Б.В., Максимов Г.В. и др.* Исследование морфофункциональных свойств клеток красной крови у человека в условиях 7-суточной «сухой» иммерсии // *Там же*. 2009. Т. 43. № 1. С. 43–47.
- Ivanova S.M., Morukov B.V., Maksimov G.V. et al.* Investigation of the morphofunctional properties of human red blood cells under the conditions of 7-day dry immersion // *Ibid.* 2009. V. 43. № 1. P. 43–47.
28. *Lampe L., Wienhold K., Meyer G. et al.* Effects of simulated microgravity (HDT) on blood fluidity // *J. Appl. Physiol.* 1992. V. 73. № 4. P. 1366–1369.
29. *Ryou M.* The role of blood viscosity in the regulation of hematocrit in tail-suspended rats (*Rattus Norvegicus*) treated with pentoxifylline. Master's thesis. Emporia State University, USA, 2003.
30. *Vacek A., Tkadlecek L., Shvets V.N. et al.* Space flight effects on haemopoietic stem cells of the bone marrow of rats // *Cell Tissue Kinet.* 1982. V. 15. № 6. P. 643–649.
31. *Zheng L., Liu J.-Z., Hu Y.-W. et al.* Simulated microgravity, erythroid differentiation, and the expression of transcription factor GATA-1 in CD34+ cells // *Aviat. Space Environ. Med.* 2011. V. 82. № 5. P. 513–517.
32. *Bouzeghrane F., Fagette S., Somody L. et al.* Restraint vs. hindlimb suspension on fluid and electrolyte balance in rats // *J. Appl. Physiol.* 1996. V. 80. № 6. P. 1993–2001.

33. Tsvirkun D., Bourreau J., Mieuset A. et al. Contribution of social isolation, restraint, and hindlimb unloading to changes in hemodynamic parameters and motion activity in rats // PLoS One. 2012. V. 7. № 7. e39923. Epub 2012 Jul. 2.

34. Tatebayashi K., Asai Y., Maeda T. et al. Effects of head-down tilt on the intracranial pressure in conscious rabbits // Brain Res. 2003. V. 977. № 1. P. 55-61.

35. Leach C.S., Rambaut P.C. Endocrine responses in long-duration manned space flight // Acta Astronaut. 1975. V. 2. № 1-2. P. 115-127.

36. Hopper J., Tabor H., Winkler A.W. Simultaneous measurements of the blood volume in man and dog by means of Evans blue dye, T1824, and by means of carbon monoxide. I. Normal subjects // J. Clin. Invest. 1944. V. 23. № 5. P. 628-635.

37. Stott W.T., Dryzga M.D., Ramsey J.C. Blood-flow distribution in the mouse // J. Appl. Toxicol. 1983. V. 3. № 6. P. 310-312.

38. Wish L., Furth J., Storey R.H. Direct determinations of plasma, cell, and organ-blood volumes in normal and hypervolemic mice // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1950. V. 74. № 3. P. 644-648.

39. Lockette W., Brennaman B. Atrial natriuretic factor increases vascular permeability // Aviat. Space Environ. Med. 1990. V. 61 № 12. P. 1121-1124.

40. Истомина В.Э., Ларина И.М., Шенкман Б.С. Влияние десмопрессина на водный обмен у крыс при антиортостатическом вывешивании // Авиакосм. и экол. мед. 2008. Т. 43. № 4. С. 47-51.

Istomina V.E., Larina I.M., Shenkman B.S. Desmopressin effect on water turnover in suspended rats // Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina. 2009. V. 43. № 4. P. 47-51.

BLOOD VOLUME, HEMATOLOGICAL PARAMETERS AND TISSUE WATER CONTENT IN HINDLIMB-UNLOADED MICE

Popova A.S., Lagereva E.A., Vinogradova O.L., Andreev-Andrievskiy A.A.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 106-113

Reduction of plasma volume, consequent decrease of erythrocyte mass and blood volume decrease are the well documented elements of cardiovascular adaptation to microgravity in humans and larger animals. In rats, exposure to microgravity results in decrease of hematological parameters, while blood volume is not affected; in still smaller animals, mice, reaction of these parameters to microgravity has not been studied.

Using the hindlimb unloading model we found that parameters of red blood in mice decrease gradually over the first 3 days of unloading by approximately 8-10 %, but there is no further change of red blood cell count, hematocrit and hemoglobin content between 3rd and 7th days of unloading. There is virtually no change of blood volume estimated by Evans blue dilution and the calculated plasma volume. Water content transiently (days 1-3) decreased in hindlimb muscles (by ≈ 1 %) and was elevated in the salivary glands (+3 % on 7th day); decrease of water content was also found in kidneys, but not in other amply perfused tissues (brain, lungs).

In summary, in small quadruped mammals changes of hematological parameters in modeled microgravity are similar to those observed in larger animals and humans, unlike fluid volumes, that remain unaffected.

Key words: mice, hindlimb unloading, blood volume, hematocrit, water content, microgravity.

Поступила 15.10.2017

УДК 612.74

ИЗМЕНЕНИЕ СИНТЕЗА БЕЛКА В ИЗОЛИРОВАННОЙ *M. SOLEUS* КРЫСЫ В ОТВЕТ НА ЭКСЦЕНТРИЧЕСКУЮ НАГРУЗКУ НА ФОНЕ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОГО ВЫВЕШИВАНИЯ

Тыганов С.А., Петрова И.О., Мирзоев Т.М., Шенкман Б.С.

Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

E-mail: sentackle@yandex.ru

Цель данной работы состояла в оценке изменения уровня синтеза белка в постуральной мышце крысы в ответ на однократную эксцентрическую нагрузку на фоне антиортостатического вывешивания разной длительности. Крысы Wistar были случайным образом распределены на 4 группы: контроль, 1HS (антиортостатическое вывешивание в течение 1 сут), 3HS (3-суточное вывешивание) и 7HS (7-суточное вывешивание). Сразу после окончания антиортостатического вывешивания камбаловидные мышцы крыс помещались в экспериментальную установку для последующего эксцентрического сокращения (ЭС) *ex vivo*, после чего проводилось измерение интенсивности синтеза белка с помощью методики SUnSET, а также содержания фосфорилированных форм анаболических маркеров методом вестерн-блоттинга. Было показано, что прирост синтеза белка в ответ на эксцентрическую нагрузку на фоне вывешивания достоверно ниже, чем в контроле. Похожая динамика наблюдалась для p70s6k (маркер mTORC1). Очевидно, снижение прироста синтеза белка в ответ на серию ЭС на фоне функциональной разгрузки может быть связано со снижением механо-зависимого ответа сигнального пути mTORC1-p70s6k.

Ключевые слова: антиортостатическое вывешивание, камбаловидная мышца, синтез белка, эксцентрические сокращения, p90RSK, p70s6k, GSK-3 β .

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 114–119.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-114-119

Одним из ключевых последствий космического полета (КП) является мышечная атрофия. В условиях невесомости мышца неизбежно подвергается функциональной разгрузке. Исходя из этого, в настоящее время остро стоит вопрос об исследовании механизмов развития атрофии от бездействия (*disuse atrophy*). Мышечное волокно способно изменять свои физиологические свойства за относительно короткий промежуток времени в ответ на измененную механическую нагрузку. Этот ответ включает в себя преобразование внешнего механического сигнала в биохимический ответ в виде внутриклеточных сигнальных каскадов (механотрансдукция), регулирующих различные

процессы в клетке [1]. При этом наиболее выраженным эффектом от силовой тренировки обладают эксцентрические сокращения, которые способствуют ускоренному развитию мышечной гипертрофии [2]. Ключевым анаболическим сигнальным путем, активирующимся в ответ на механические стимулы, является сигнальный каскад mTORC1/p70S6k [3–5], принимающий непосредственное участие в активации белкового синтеза. Помимо протеинкиназы mTORC1, регуляция инициации трансляции может осуществляться через такие сигнальные белки, как киназа гликогенсинтазы 3 β (GSK-3 β) и рибосомальная киназа p90 (p90RSK) [6, 7]. А так же было показано, что ключевая роль в механозависимой активации mTORC1 и синтеза белка в скелетной мышце принадлежит фосфатидной кислоте, которая способна непосредственно связываться с комплексом mTORC1 и активировать синтез белка в обход PI3K-AKT сигнального пути [8]. Однако до сих пор не существует убедительных данных о молекулярных механизмах анаболической реализации внешнего механического сигнала в мышечном волокне на фоне функциональной разгрузки [9]. В связи с этим цель данного исследования заключалась в оценке ответа скорости белкового синтеза, а также ключевых регуляторов трансляции на серию эксцентрических сокращений (ЭС) *m. soleus* крысы на фоне функциональной разгрузки различной продолжительности. Мы предположили, что анаболический ответ на ЭС в постуральной мышце крысы на фоне моделируемой гравитационной разгрузки может быть снижен по сравнению с контрольными значениями.

Методика

В исследовании использовалось 28 самцов крыс породы Wistar массой 220 ± 5 г, которые были случайным образом разделены на 4 группы (по 7 животных в каждой группе): контроль, 1HS (вывешивание в течение 1 сут), 3HS (вывешивание в течение 3 сут), 7HS (вывешивание в течение 7 сут). Животные группы контроль содержались в

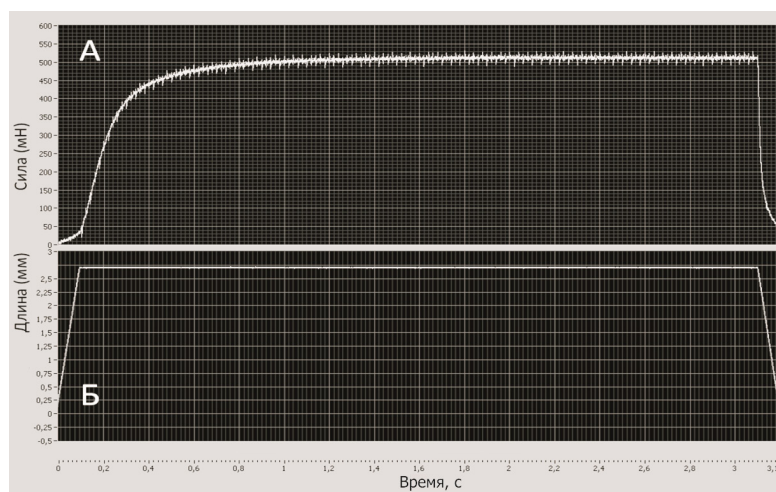


Рис. 1. Графическое изображение одного ЭС.

А – усилие, которое развивает мышца за одно растяжение;
Б – изменение длины мышцы

виварных условиях, получая стандартный корм и воду *ad libitum*. Антиортостатическое вывешивание задних конечностей с целью моделирования гравитационной разгрузки проводилось по стандартной методике Ильина – Новикова в модификации Morey-Holton [10, 11]. Материалом исследования служила камбаловидная мышца (*m. soleus*) крысы.

Программа эксперимента и все манипуляции, выполняемые с животными, были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН (протокол № 421 от 14.04.2016 г.).

Эксцентрические сокращения (ЭС) изолированной камбаловидной мышцы

Данная методика основана на протоколе, изложенном в работе [8]. Выделенная камбаловидная мышца помещалась в раствор Кребса – Ханзеляйта (120 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 5 mM, Hepes) с постоянной перфузией карбогеном (95 % O₂ + 5 % CO₂) и поддержанием температуры на уровне 37 °C. Камбаловидная мышца крысы присоединялась шелковыми нитками за сухожилия одним концом к динамометру/генератору усилия, а другим – к неподвижному фиксатору. Затем для мышцы, с помощью серии одиночных (0,5 мс) сокращений подбирались оптимальная длина, при которой развивалась наибольшая сила (L₀). Эксцентрические сокращения осуществлялись с помощью стимуляции электрическим полем (80 V, 50 Hz в течение 3 с). Во время стимуляции мышца растягивалась на 15 % от L₀ (время растяжения и возврата на прежнюю длину – 50 мс) [12]. Каждое сокращение сопровождалось 10-секундным перерывом, во время которого мышца находилась при L₀. Измерения параметров сокращения и растяжения мышцы проводились в непрерывном

режиме с частотой 2000 Гц с использованием DMC/DMA software (Aurora Scientific, ON, Канада). Схематическое изображение одного цикла ЭС представлено на рис. 1. После окончания 30-минутной серии сокращений мышца оставалась в указанном растворе еще в течение 30 мин, после чего немедленно замораживалась в жидком азоте. Мышца другой конечности находилась в перфузируемом растворе в течение 60 мин. Показатели максимального тетанического сокращения нормировались на площадь поперечного сечения мышцы (отношение веса мышцы к оптимальной длине, умноженной на плотность мышцы – 1,07 г/см³) [13].

Оценка скорости синтеза белка *in vivo*

Интенсивность синтеза белка в *m. soleus* оценивалась с помощью метода пурамицинового мечения – SUnSET [14]. Данный метод предполагает использование антибиотика пурамицина (структурного аналога тирозил-тРНК) и соответствующих антител для выявления количества пурамицина, встраивающегося в образующиеся пептидные цепи [14]. В дальнейшем интенсивность белкового синтеза выявляется с помощью вестерн-блоттинга. Для нашего исследования был использован гидрохлорид пурамицина (Enzo Life Sciences), который вводился за 30 мин до эвтаназии животных (доза 40 нмоль/г – 500 мкл на крысу внутривенно).

Определение содержания фосфорилированных форм p70s6k, GSK-3β, p90RSK с помощью вестерн-блоттинга

С помощью криостата делали срезы мышечной ткани *m. soleus* толщиной 20 мкм, которые затем помещали в охлажденный RIPA Lysis Buffer System (с добавлением 0,5M EDTA 24 мкл/мл; Na₃VO₄ 20 мкл/мл; DTT 4 мкл/мл; PMSF 20 мкл/мл; аprotинин 5 мкл/мл; лейпептин 5 мкл/мл; пепстатин А 5 мкл/мл; Phosphatase Inhibitor Cocktail B 40 мкл/мл) из расчета 130 мкл буфера на одну пробу. Затем проводили гомогенизацию и центрифугирование (в течение 15 мин, при температуре +4 °C и 12 000 об/мин). После этого отбирали надосадочную жидкость и определяли концентрацию белка на спектрофотометре UV-2450 (Shimadzu, Япония), измеряя поглощение на длине волны 595 нм. Концентрация белка в пробах рассчитывалась по калибровочной кривой. Электрофорез по методу Лэммли проводили в 10%-ном разделяющем полиакриламидном геле в мини-системе Bio-Rad (США) в течение часа при силе тока 17 мА на 1 гель. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) осуществляли в системе mini Trans-Blot (Bio-Rad, США)

Таблица

Масса крыс и отношение массы *m. soleus* к массе тела крысы

Группа	Масса животных, г	Масса <i>m. soleus</i> , мг/масса животного, г
Контроль	220 ± 8	0,40 ± 0,011
1HS	214 ± 3	0,42 ± 0,013
3HS	222 ± 10	0,372 ± 0,015
7HS	210 ± 7	0,336 ± 0,018*

Примечание. Данные представлены в виде средних значений и стандартная ошибка средней; * – $p < 0,05$ по сравнению с группой контроль.

в течение 2 ч при температуре +4 °C и постоянном напряжении 100 В. Затем, для проверки равной загрузки белка на все дорожки, нитроцеллюлозная мембрана красилась краской Ponceau S. После этого мембрану отмывали от Ponceau S и блокировали в 4%-ном растворе сухого молока в PBST (PBS + 0,1 % Tween 20) при комнатной температуре в течение часа. Затем проводили инкубацию (в течение 15 ч, +4 °C) с первичными антителами против фосфо-p70S6K (Thr389, 1 : 2000; Santa Cruz Biotechnology, США), фосфо-p90RSK1 (90 kDa ribosomal protein S6 kinase; T3591S363, 1 : 1000; Abcam, США), фосфо-GSK-3 β (Ser 9, 1 : 1000; Cell Signaling Technology, США), пуромизин (1 : 3000; Kerafast Inc., Boston, Massachusetts, США) и глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (GAPDH) (1 : 4000; Abcam, США). После этого отмывали мембраны в PBST 5 раз по 5 мин. Затем мембраны инкубировали в течение часа с биотинилированными вторичными антителами goat anti-rabbit (Santa Cruz, США) в разведении 1 : 1000. Для выявления GAPDH и пуромизина использовали вторичные антитела goat anti-mouse в разведении 1 : 20 000 Kit (Bio-Rad, США). Далее проводили отмывку в PBST 5 раз по 5 мин. Белковые полосы выявляли на мембране с помощью Star TM Substrate Kit (Bio-Rad, США). Анализ белковых полос проводили с использованием блот-сканера C-DiGit (LI-COR Biotechnology, США) и соответствующей программы Image Studio Digits. Полученный от белковых полос сигнал был нормализован к референсному белку GAPDH.

Данные представлены как средние значения и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Достоверность различий между группами определяли с помощью ANOVA. Достоверность между интактной мышцей и мышцей, подвергшейся ЭС, была установлена с помощью парного t-критерия. Достоверными считали отличия с уровнем значимости $p < 0,05$.

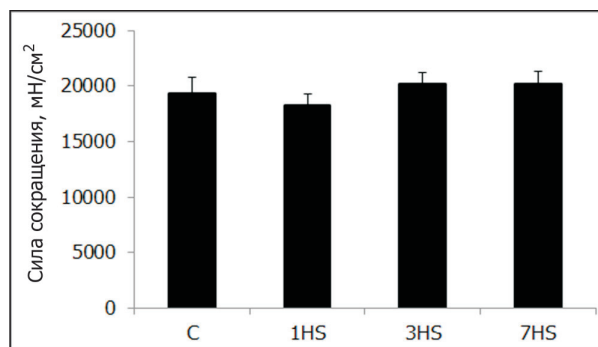


Рис. 2. Средняя сила сокращения изолированной *m. soleus*, нормированная к площади поперечного сечения мышцы. Здесь и на рис. 3–6: C – контроль; 1HS, 3HS, 7HS – антиортостатическое вывешивание в течение 1, 3 и 7 сут

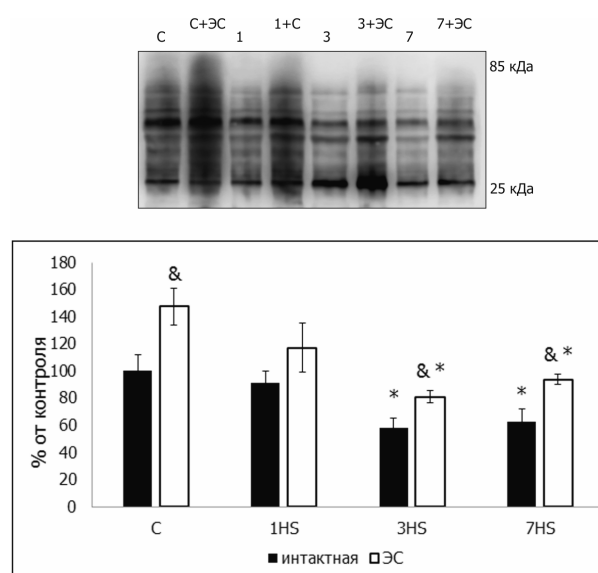


Рис. 3. Скорость синтеза белка в *m. soleus* крысы, измеренная методом пуромизинового мечения.

Здесь и на рис. 4–6: данные представлены в виде средних значений и стандартная ошибка средней; * – достоверное отличие групп «вывешивание» и «вывешивание + ЭС» от соответствующих контрольных групп ($p < 0,05$); & – достоверное отличие интактных мышц от мышц с эксцентрикой ($p < 0,05$)

Результаты и обсуждение

Масса животных и масса камбаловидной мышцы

Масса крыс из экспериментальных групп (1HS, 3HS и 7HS) достоверно не отличалась от массы контрольных животных (таблица). Масса камбаловидной мышцы, нормированная к массе тела животного, достоверно снизилась на 16 % ($p < 0,05$) относительно контроля после 7-суточного вывешивания (см. табл.).

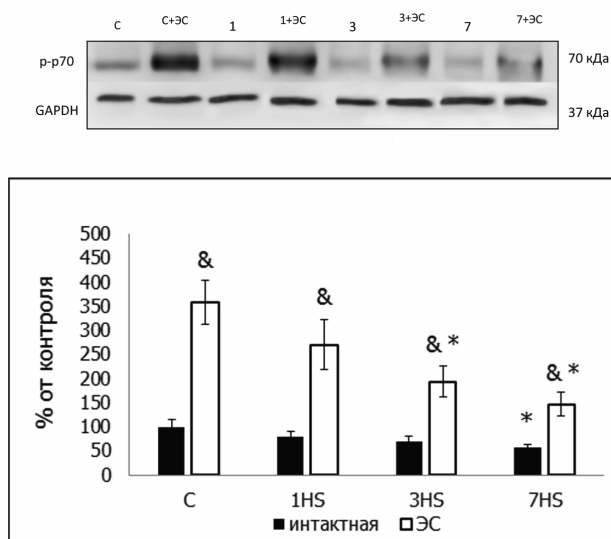


Рис. 4. Содержание фосфорилированной формы p70s6k в *m. soleus* крысы

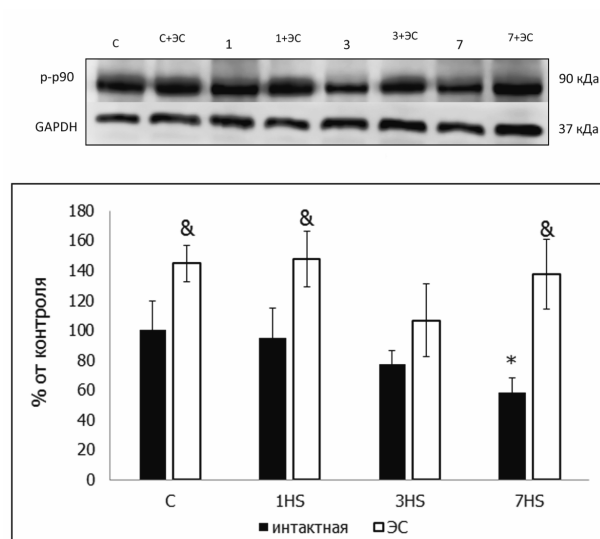


Рис. 5. Содержание фосфорилированной формы p90RSK в *m. soleus* крысы

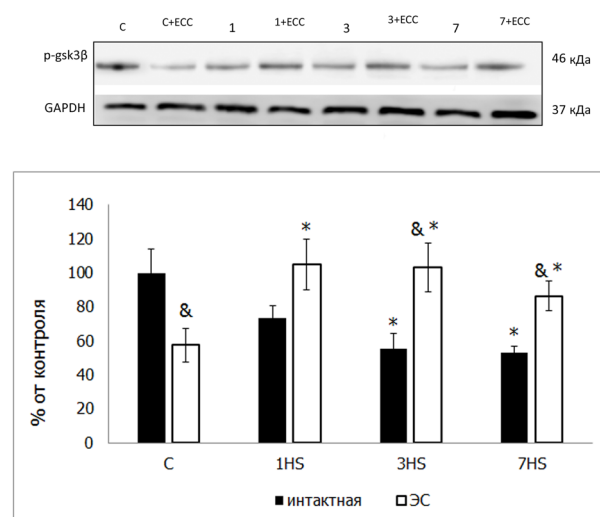


Рис. 6. Содержание фосфорилированной формы GSK-3β в *m. soleus* крысы

Механические показатели мышечного сокращения и площадь поперечного сечения камбаловидной мышцы

В результате проведения теста на однократную эксцентрическую нагрузку (серию ЭС) были получены данные о силе, нормированной на поперечное сечение мышцы. Среднее напряжение, развиваемое мышцами, не различалось между группами (рис. 2).

Содержание фосфорилированных форм маркеров синтеза белка и уровень синтеза белка

Уровень синтеза белка, измеренный пуромидиновым методом после ЭС, достоверно увеличился

($p < 0,05$) относительно интактных мышц для всех групп животных за исключением группы 1HS. В интактных мышцах достоверное снижение синтеза белка относительно контроля наблюдалось на 3-и и 7-е сутки вывешивания. Для мышц после ЭС снижение синтеза белка наблюдалось также к 3-м и 7-м суткам вывешивания (рис. 3).

Содержание фосфорилированной формы рибосомальной киназы p-70s6k оказалось достоверно увеличено ($p < 0,05$) в мышцах с ЭС относительно интактных групп для всех групп животных. Это увеличение достоверно снизилось на 52 % от группы контроль к группе 3HS. Что касается интактных мышц, то достоверное снижение на 44 % ($p < 0,05$) от контроля наблюдалось только к 7-м суткам вывешивания. Схожее снижение на 46 % ($p < 0,05$) наблюдалось для мышц с ЭС, но уже к 3-м суткам вывешивания (рис. 4).

Содержание фосфорилированной формы рибосомальной киназы p-90RSK достоверно ($p < 0,05$) увеличилось в мышцах с ЭС относительно интактных мышц, за исключением группы 3HS. Сравнение с контролем групп вывешенных животных по интактным мышцам выявило достоверное снижение на 42 % ($p < 0,05$) только к 7-м суткам вывешивания. Это снижение не зафиксировано в мышцах с ЭС (рис. 5).

Содержание фосфорилированной формы киназы гликогенсинтазы (p-GSK-3β) в группе контроль и группе 1HS не изменилось ($p < 0,05$) в мышцах с ЭС относительно интактных мышц. Однако для групп 3HS и 7HS наблюдался достоверный прирост ($p < 0,05$) уровня фосфорилирования. Сравнение с контролем групп вывешенных животных по интактным мышцам выявило достоверное снижение

на 45 % ($p < 0,05$) к 3-м суткам вывешивания. Для групп с ЭС, напротив, зафиксировано достоверное увеличение уровня фосфорилирования во всех группах вывешивания (рис. 6).

Данные о синтезе белка и фосфорилировании анаболических маркеров (p70s6k, p90RSK, GSK-3 β) в интактной *m. soleus* крысы в целом согласуются с ранее полученными данными как нашей лаборатории [15–17], так и результатами ряда зарубежных исследователей [18–21].

Важным результатом данного исследования явилось то, что впервые показано нарастающее снижение прироста интенсивности белкового синтеза и активации системы mTORC1 (судя по фосфорилированной p70S6k) в *m. soleus* крысы в ответ на ЭС *ex vivo* на фоне функциональной разгрузки задних конечностей.

Можно было бы предположить, что снижение анаболического ответа после ЭС связано со значительным уменьшением силы сокращения *m. soleus* в результате гравитационной разгрузки. Однако нормированная к ППС средняя сила сокращения достоверно не отличалась между исследуемыми группами животных, что говорит о том, что снижение ответа mTORC1 не было связано с уменьшением удельного напряжения камбаловидной мышцы при ЭС. Полученные результаты заставляют обратить внимание, прежде всего, на ответ mTORC1, поскольку именно его «нижележащая» киназа p70S6k снижает уровень ЭС-индуцированного фосфорилирования после экспозиции животного в условиях разгрузки. Этого не происходит с рибосомальной киназой p90RSK, что, по-видимому, может свидетельствовать о том, функциональная разгрузка не оказывает влияния на активность сигнального пути ERK/p90RSK в ответ на серию ЭС. Что касается GSK-3 β , то можно предположить, что динамика фосфорилирования данной киназы могла быть связана с изменением содержания гликогена в норме и в условиях разгрузки, когда происходит накопление гликогена в мышечных волокнах. Однако точный механизм регуляции активности GSK-3 β в ответ на ЭС на фоне разгрузки остается неизвестным.

Снижение анаболического ответа (прежде всего прироста синтеза белка) в ходе функциональной разгрузки могло быть обусловлено нарушением как непосредственно механосенсорных структур мышечного волокна, так и сигнальных молекул, вовлеченных в механотрансдукцию. Так, потенциальными механосенсорами, воспринимающими внешний механический сигнал и проводящим его к вторичным мессенджерам, могли быть как фокальная адгезивная киназа [22, 23], так и стретч-чувствительные кальциевые каналы [24]. Кроме того, важная роль в передаче механического сигнала от поверхности мышечного волокна к анаболическим регуляторным белкам может принадлежать

цитоскелету [25]. В частности, уменьшение содержания цитоскелетного белка десмина вследствие разгрузки, ранее показанное в нашей лаборатории [26], могло внести вклад в нарушение проведения механического сигнала к mTORC1 в *m. soleus* крысы на фоне гравитационной разгрузки.

Выводы

1. Снижение прироста синтеза белка в ответ на серию ЭС на фоне функциональной разгрузки может быть связано со снижением механо-зависимого ответа сигнального пути Akt-mTORC1-p70s6k.
2. Обнаруженный феномен может свидетельствовать о снижении эффективности анаболической механосигнализации в условиях моделируемой гравитационной разгрузки.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-34-60055 мол_а_дк.

Список литературы

1. Hornberger T.A. Mechanotransduction and the regulation of mTORC1 signaling in skeletal muscle // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011. V. 43. P. 1267–1276.
2. Tsumiyama W., Oki S., Takamiya N. et al. Aerobic interval exercise with an eccentric contraction induces muscular hypertrophy and augmentation of muscular strength in rats // *J. Phys. Ther. Sci.* 2015. V. 27. P. 1083–1086.
3. Hornberger T.A., Stuppard R., Conley K.E. et al. Mechanical stimuli regulate rapamycin-sensitive signalling by a phosphoinositide 3-kinase-, protein kinase B- and growth factor-independent mechanism // *Biochem. J.* 2004. V. 380. P. 795–804.
4. Baar K., Esser K. Phosphorylation of p70(S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 276. P. 120–127.
5. Drummond M.J., Fry C.S., Glynn E.L. et al. Rapamycin administration in humans blocks the contraction-induced increase in skeletal muscle protein synthesis // *J. Physiol.* 2009. V. 587. P. 1535–1546.
6. Glass D.J. Signaling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy // *Nat. Cell Biol.* 2003. V. 5. P. 87–90.
7. Roux P.P., Topisirovic I. Regulation of mRNA translation by signaling pathways // *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 2012. V. 4.
8. O'Neil T.K., Duffy L.R., Frey J.W., Hornberger T.A. The role of phosphoinositide 3-kinase and phosphatidic acid in the regulation of mammalian target of rapamycin following eccentric contractions // *J. Physiol.* 2009. V. 587. P. 3691–3701.
9. Ochi E., Ishii N., Nakazato K. Time course change of IGF1/Akt/mTOR/p70s6k pathway activation in rat gastrocnemius muscle during repeated bouts of eccentric exercise // *J. Sports Sci. Med.* 2010. V. 9. P. 170–175.

10. Ilyin E.A., Novikov V.E. Stand for modelling the physiological effects of weightlessness in laboratory experiments with rats // *Kosmicheskaya biologiya i aviakosmicheskaya meditsina*. 1980. V. 14. P. 79–80.
11. Morey-Holton E.R., Globus R.K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects // *J. Appl. Physiol.* (1985). 2002. V. 92. P. 1367–1377.
12. Burry M., Hawkins D., Spangenburg E.E. Lengthening contractions differentially affect p70s6k phosphorylation compared to isometric contractions in rat skeletal muscle // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2007. V. 100. P. 409–415.
13. Gollnick P.D., Timson B.F., Moore R.L., Riedy M. Muscular enlargement and number of fibers in skeletal muscles of rats // *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* 1981. V. 50. P. 936–943.
14. Goodman C.A., Mabrey D.M., Frey J.W. et al. Novel insights into the regulation of skeletal muscle protein synthesis as revealed by a new nonradioactive in vivo technique // *FASEB J.* 2011. V. 25. P. 1028–1039.
15. Lysenko E.A., Turtikova O.V., Kachaeva E.V. et al. Time course of ribosomal kinase activity during hindlimb unloading // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2010. V. 434. P. 223–226.
16. Mirzoev T.M., Tyganov S.A., Lomonosova Yu.N. et al. Signaling pathways regulating protein synthesis in rat soleus muscle during early stages of hindlimb unloading // *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal imeni I.M. Sechenova*. 2015. V. 101. P. 1299–1308.
17. Mirzoev T., Tyganov S., Vilchinskaya N. et al. Key markers of mTORC1-dependent and mTORC1-independent signaling pathways regulating protein synthesis in rat soleus muscle during early stages of hindlimb unloading // *Cell Physiol. Biochem.* 2016. V. 39. P. 1011–1020.
18. Loughna P., Goldspink G., Goldspink D.F. Effect of inactivity and passive stretch on protein turnover in phasic and postural rat muscles // *J. Appl. Physiol.* (1985). 1986. V. 61. P. 173–179.
19. Fluckey J.D., Dupont-Versteegden E.E., Knox M. et al. Insulin facilitation of muscle protein synthesis following resistance exercise in hindlimb-suspended rats is independent of a rapamycin-sensitive pathway // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004. V. 287. P. E1070–1075.
20. Dupont E., Cieniewski-Bernard C., Bastide B., Stevens L. Electrostimulation during hindlimb unloading modulates PI3K-AKT downstream targets without preventing soleus atrophy and restores slow phenotype through ERK // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011. V. 300. P. 408–417.
21. Gwag T., Lee K., Ju H. et al. Stress and signaling responses of rat skeletal muscle to brief endurance exercise during hindlimb unloading: a catch-up process for atrophied muscle // *Cell Physiol. Biochem.* 2009. V. 24. P. 537–546.
22. Fluck M., Carson J.A., Gordon S.E. et al. Focal adhesion proteins FAK and paxillin increase in hypertrophied skeletal muscle // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 277. P. 152–162.
23. Durieux A. C., Desplanches D., Freyssen D., Fluck M. Mechanotransduction in striated muscle via focal adhesion kinase // *Biochem. Soc. Trans.* 2007. V. 35. P. 1312–1313.
24. Spangenburg E.E., McBride T.A. Inhibition of stretch-activated channels during eccentric muscle contraction attenuates p70S6K activation // *J. Appl. Physiol.* (1985). 2006. V. 100. P. 129–135.
25. Ingber D.E. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again // *FASEB J.* 2006. V.20. P.811–827.
26. Mirzoev T.M., Biriukov N.S., Veselova O.M. et al. Parameters of fibers cell respiration and desmin content in rat soleus muscle at early stages of gravitational unloading // *Biofizika*. 2012. V. 57. P. 509–514.

Поступила 30.06.2017

CHANGES IN PROTEIN SYNTHESIS IN ISOLATED RAT *M. SOLEUS* AFTER BOUT OF ECCENTRIC CONTRACTIONS UNDER HINDLIMB UNLOADING CONDITION

Tyganov S.A., Petrova I.O., Mirzoev T.M., Shenkman B.S.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 114–119

The aim of the study was to evaluate changes in protein synthesis in isolated rat *m. soleus* after single bout of eccentric contractions under hindlimb unloading condition of various duration. Thirty-two adult male Wistar rats weighing 220 ± 5 g were randomly divided into 4 groups: 1) Control (vivarium cage control days followed by ex vivo bout of eccentric contractions (EC)); 2) 1HS (HS for 1 day followed by ex vivo bout of EC) 3) 3HS (HS for 3 days); 4) 7HS (HS for 7 days). Upon completion of the EC, muscles were subjected to Western blot analyses in order to determine the content of phosphorylated forms of the key anabolic markers. We found that increase in protein synthesis after EC was significantly higher in Control group compared to HS groups. We also observed similar effects for p70s6k (mTORC1 marker). The results of the study suggests that increase in protein synthesis after EC under hindlimb unloading condition is probably connected to mechanosensitive response of mTORC1-p70s6k pathway.

Key words: hindlimb unloading, *m. soleus*, protein synthesis, p90s6k, p70s6k, GSK-3 β .

УДК 576.3

СОСТОЯНИЕ ЦИТОСКЕЛЕТА КЛЕТОК ЯИЧНИКОВ И СЕМЕННИКОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*, ПРОШЕДШИХ ПОЛНЫЙ ЦИКЛ ГАМЕТОГЕНЕЗА В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕННОГО ВНЕШНЕГО МЕХАНИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Куприянова М.С.^{1, 2}, Локтев С.С.¹, Орлов О.И.¹, Огнева И.В.^{1, 2}

¹Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России

E-mail: iogneva@yandex.ru

Группы виргинных имаго *Drosophila melanogaster* экспонировали в условиях, моделирующих микрогравитацию (с использованием *random position machine* – RPM) в течение полного цикла оогенеза у самок (80 ч) и сперматогенеза у самцов (192 ч). Контрольные группы содержались в аналогичных условиях, но при неизменной ориентации в гравитационном поле. По окончании воздействия извлекали яичники и семенники для последующего определения в них относительного содержания актина и тубулина с помощью вестерн-блоттинга, относительного содержания мРНК генов, кодирующих цитоскелетные белки и факторы отцовского и материнского эффектов, методом количественной полимеразной цепной реакции с предварительной обратной транскрипцией.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в тканях семенников и яичников имаго *Drosophila melanogaster*, экспонированных на RPM, изменений в относительном содержании тубулина и актина (кроме снижения на 26 % в яичниках), практически не отмечалось, несмотря на значительные в основном разнонаправленные в яичниках и семенниках изменения содержания мРНК генов, кодирующих цитоскелетные белки. Снижение относительного содержания мРНК генов материнского эффекта *Swallow (Swa)*, *Nanos (Nos)* и *Torso (Tor)*, являющихся морфогенами передних, задних и терминального сегментов соответственно, имели место и в яичниках, и в семенниках имаго *Drosophila melanogaster* после пребывания на RPM, что может свидетельствовать о роли силы тяжести в распределении морфогенов и раннем развитии зародыша.

Ключевые слова: микрогравитация, цитоскелет, оогенез, сперматогенез, актин, тубулин.

Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 7 (спецвыпуск). С. 120–128.

DOI: 10.21687/0233-528X-2017-51-7-120-128

Взаимодействие живой клетки с внешним механическим полем является эволюционно обусловленным процессом, однако механизм развития реакции клетки на его изменения до сих пор остается малоизученным.

В условиях изменения силы тяжести было показано, что у клеток, которые культивировали в

этих условиях, наблюдали изменения клеточного профиля, обусловленные, вероятно, изменением структуры цитоскелета [1–7], что может быть связано с изменением уровня экспрессии генов, кодирующих цитоскелетные белки и соответствующих участников сигнальных каскадов [8–14]. Реорганизация цитоскелета также может приводить к изменению дифференцировочного потенциала стволовых клеток, наблюдавшегося при моделировании эффектов невесомости [15, 16], в частности, эмбриональные стволовые клетки снижают свою способность к образованию эмбрионидных тел [17, 18]. Вышеуказанное позволяет предположить, что ранние этапы эмбриогенеза, зависящие в том числе и от состояния гамет, могут быть особенно зависимы от внешнего механического поля.

Одним из наиболее удобных объектов для изучения влияния силы тяжести на развитие многоклеточного организма является плодовая мушка *Drosophila melanogaster*, имеющая достаточно короткий жизненный цикл, наряду с хорошо изученной генетикой развития. Поэтому целый ряд экспериментов в условиях космического полета (КП) был проведен на разных линиях *Drosophila melanogaster*, в которых было показано, что оплодотворение, эмбриогенез и личиночная стадия приводят к появлению нормальных имаго в условиях невесомости [19, 20]. После 44,5-суточного полета спутника «Фотон-М4» и последующего 12-суточного полета на борту российского сегмента Международной космической станции (2014, Россия) мы также получили имаго *Drosophila melanogaster* 3–5-го поколений без аномалий эмбрионального развития [21]. Однако у этих же мух через 3 поколения пребывания в условиях силы тяжести Земли в яичниках содержание цитоскелетных белков и соответствующих мРНК было достоверно снижено [22]. После 7-суточного полета Challenger (1985, США) увеличивались количество и размер яйцеклеток имаго *Drosophila melanogaster* линии Oregon R, а примерно 25 % эмбрионов не развились во взрослых особей [23], хотя тем же авторам не удалось воспроизвести

Таблица

Последовательность праймеров и размер продуктов

Ген	Последовательность праймера, прямой/обратный (5'...3')	Размер продукта, п.о.
Гены, кодирующие компоненты актинового и тубулинового цитоскелета		
<i>Act57B</i> (актин 57B, бета-актин)	ccccatccactgtttaatcg/ tcggggaagttgttaggttc	115
<i>Act87E</i> (актин 87E, бета-актин)	aggaaccgcgattgttaacag/ tcttgtgtctctcaactcctc	96
<i>Act5C</i> (актин 5C, гамма-актин)	gacgaggatggtcttgattc/ gtggtccgctcttttcac	149
<i>Arp3</i> (<i>Arp2/3</i> комплекс, субъед. 3)	cccaataaatggtggacgtg/ accgcgtgtagaagcaaac	119
<i>Tmod</i> (тропомодулин)	gacaaccaatccaaccaacc/ ctgacgtccaattcatgtcg	70
<i>Svil</i> (супервиллин)	atgaggggtggatcagcttg/ ttgaagcactggagttgcac	120
<i>Fim</i> (фимбрин)	agacctaccgcaattggatg/ agttgacaatacccgcttg	126
<i>Actn</i> (альфа-актинин)	acaagccgaacattgaggag/ gcgttccatcggtagtgtg	96
<i>Betatub85D</i> (бета-тубулин 2B)	gtggcggcgatgaataatag/ atgctaaggcccaagatcc	119
<i>Msp5</i> (гомолог <i>СКАР5</i>)	aaataacccccgaggaattg/ cttatttcgcccagaagctg	127
<i>Tcp1</i> (<i>Т-комплекс1</i>)	caagatcattggtgctgacg/ cacggggtctgtgatttc	83
<i>Cct5</i> (<i>Т-комплекс1</i> , шаперонин 5)	ggagtgcataaaactccaagg/ caccaccgtaacaatacgc	143
<i>T-cp1eta</i> (субъединица 7 <i>Tcp-1</i>)	atcgtgtctctcaagaagg/ caggcattgatgttgacac	71
Гены материнского и отцовского эффекта		
<i>Bicoid</i> (<i>bcd</i> – передняя группа генов)	tcccttcgatttgatcttg/ cgtgcattgatattggttcg	220
<i>Exuperantia</i> (<i>exu</i> – передняя группа)	agggtaagcgggaactgtt/ ggatatccagctccaggaca	189
<i>Swallow</i> (<i>swa</i> – передняя группа)	tcggatttcgcataaaaag/ ctccaaaatggcgctgtat	166
<i>Nanos</i> (<i>nos</i> – задняя группа)	tgtggcgaaacatgctgat/ tctcaciaaagacgcagtg	237
<i>Torso</i> (<i>tor</i> – терминальная группа)	atgaaccaaacgcagaggac/ tttgctcctgcctgaactt	202
<i>Sneaky</i> (<i>snky</i> – отцовский эффект)	ggtgagcatgaagtccgatt/ ttcgcagaatgttgctc	226

эти эффекты при улучшении оксигенации мух [24]. Следует отметить, что и в сперматозоидах часто-та доминантных летальных мутаций в условиях КП была выше, нежели в контроле, причем особенно в незрелых формах: сперматидях и сперматоцитах [25–27].

В связи с вышеизложенным целью данной рабо-ты была оценка состояния цитоскелета и экспрессии генов материнского и отцовского эффектов, опре-деляющих ранние этапы эмбрионального развития, в герминативных тканях (яичниках и семенниках) плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, полный цикл гаметогенеза в которых проходил в условиях измененной силы тяжести.

Методика

Виргинных имаго плодовой мушки *Drosophila melanogaster* линии Canton S возрастом 2 дня по-мещали в пробирки типа Falcon объемом 50 мл (по 30 особей в каждую пробирку) с воздухопроницае-мой крышкой, содержащие стандартную для разве-дения дрозофилы среду следующего состава: вода – 1000 мл, агар-агар – 7 г, сахарный песок – 40 г, манная крупа – 40 г, пекарские дрожжи – 25 г, про-пионовая кислота – 10 мл.

Самцы и самки содержались отдельно друг от друга. Пробирки экспериментальных групп разме-щали на random position machine (RPM), которая

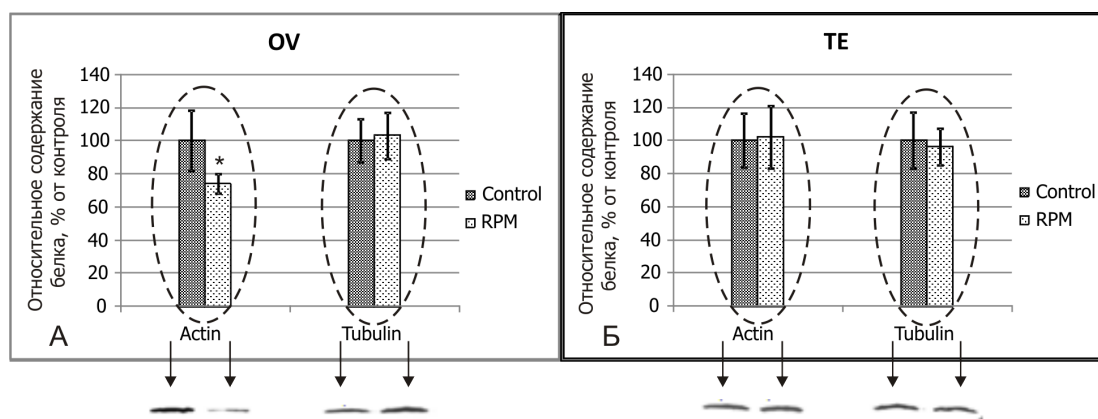


Рис. 1. Относительное содержание общего актина (Actin) и тубулина (Tubulin) в яичниках (А) и семенниках (Б). Здесь и в рис. 2–5: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

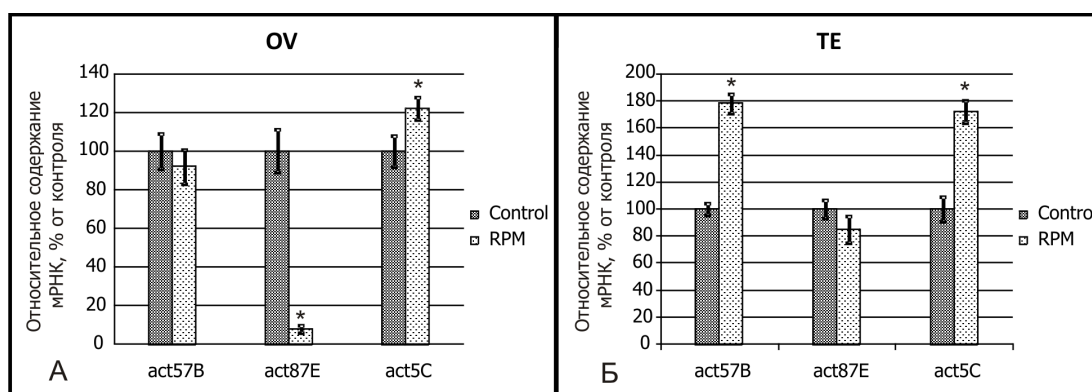


Рис. 2. Относительное содержание мРНК генов, кодирующих изоформы актина в яичниках (А) и семенниках (Б). *Act57B* и *Act87E* – изоформы бета-актина; *Act5C* – изоформа гамма-актина

обеспечивает 3D разнонаправленное относительно вектора силы тяжести вращение [28], и экспонировали при температуре +23 °С. Одновременно с этим контрольные группы находились в стандартных условиях 1 G при той же температуре. Длительность эксперимента, проводимого на самках, составляла 80 ч (полный цикл оогенеза), на самцах – 192 ч (полный цикл сперматогенеза).

По окончании воздействия у мух экспериментальных и контрольных групп извлекали герминативные ткани и немедленно замораживали для последующего выделения белков и мРНК.

Выделение тотального белка из семенников и яичников, как и денатурирующий электрофорез, проводили по методу Лэмли с помощью системы Bio-Rad (США). Опираясь на измерение концентрации, в каждую лунку наносили одинаковое количество белка. Перенос на нитроцеллюлозную мембрану проводили по методу, описанному в работе [29].

Для определения каждого белка были использованы специфические моноклональные антитела в разведениях, рекомендованных фирмами-производителями: для актина – антитела на основе

иммуноглобулинов мыши (Pierce Thermoscientific, США) в разведении 1:100, для бета-тубулина – антитела на основе иммуноглобулинов кролика (Pierce Thermoscientific, США) в разведении 1:1000. В качестве вторичных антител использовали биотинилированные козы антитела против IgG мыши (Sigma, Германия) в разведении 1:20 000, против IgG кролика (Jackson ImmunoResearch Lab., Inc., США) в разведении 1:10 000. Далее все мембраны обрабатывали раствором стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (Sigma, Германия) в разведении 1:8 000. Белковые полосы выявляли с помощью 3,3'-диаминобензидаина (Merck, США).

Для анализа полученных данных была использована программа ImageJ.

Для определения содержания мРНК генов, кодирующих ряд цитоскелетных и метаболических белков, выделяли тотальную РНК из замороженных яичников и семенников мух, используя RNeasy Micro Kit (Qiagen, Германия), согласно инструкции производителя. Обратную транскрипцию осуществляли, используя в качестве затравки d(T)15 и 500 нг РНК. Для оценки содержания мРНК исследуемых генов

проводили ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, подобранных с помощью программы Primer3Plus (таблица). Для идентификации продукта использовали кривые плавления, для оценки уровня различий в содержании мРНК генов-мишеней – метод 2(-DeltaDeltaC(T)) [30].

Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью ANOVA, используя для оценки достоверности отличий между группами постхоковский t-тест с уровнем значимости $p < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm SE$, где M – среднее арифметическое; SE – ошибка среднего значения.

Результаты и обсуждение

В клетках яичников *Drosophila melanogaster*, прошедших полный цикл оогенеза в условиях, моделирующих эффекты микрогравитации, относительное содержание основного компонента микрофиламентов, участвующих в формировании сократительного кольца, – актина снижалось на 26 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рис. 1, А). При этом изменений в содержании тубулина, основного компонента микротрубочек, которые формируют веретено деления, не было отмечено. Более того, в клетках семенников после 192 ч экспонирования на RPM (полный цикл сперматогенеза) не было обнаружено изменений содержания ни актина, ни тубулина (см. рис. 1, Б).

Однако полученные ранее данные при исследовании яичников 3-го поколения *Drosophila melanogaster* после КП [22], а также личинок *Drosophila melanogaster* сразу после 44,5-суточного полета спутника «Фотон-М4» [21] свидетельствовали о снижении содержания данных белков. Следует отметить, что, несмотря на снижение содержания этих основных белков, участвующих в структурной организации процесса клеточного деления, в условиях космического эксперимента были получены 3 поколения мух [21]. Последнее косвенно может свидетельствовать о том, что в герминативных тканях имаго *Drosophila melanogaster* это снижение либо отсутствовало, либо было физиологически незначимым, что, по-видимому, наблюдали в данном эксперименте. Соответственно возникает вопрос о регуляции подобного паттерна цитоскелетных белков в герминативных тканях в условиях невесомости, что приводит к необходимости оценки уровня содержания мРНК соответствующих генов.

Относительное содержание мРНК генов, кодирующих изоформы актина (бета-актина *Act57B* и *Act87E*, гамма-актина – *Act5C*), в яичниках и семенниках менялось по-разному.

Так, в яичниках содержание мРНК изоформы *Act87E* в группе, экспонированной на RPM, снизилось более чем на 90 % ($p < 0,05$) относительно контрольной группы, а содержание мРНК *Act57B* и *Act5C* – достоверно не изменилось (рис. 2, А).

В то же время в семенниках в группе «RPM» не изменилось содержание мРНК *Act87E*, а содержание мРНК *Act57B* и *Act5C* увеличилось на 78 и 72 % ($p < 0,05$) относительно контроля (см. рис. 2, Б).

Таким образом, в яичниках *Drosophila melanogaster*, экспонированных в условиях моделирования эффектов микрогравитации, имело место существенное снижение относительного содержания мРНК генов, кодирующих изоформы актина, хотя снижение содержания белка было не столь выраженным. При этом в семенниках, наоборот, содержание мРНК изоформ актина было выше после экспонирования на RPM в течение полного цикла сперматогенеза, однако содержание белка при этом не менялось. Сопоставляя эти данные, можно предположить, что регуляция белкового паттерна в герминативных тканях имаго *Drosophila melanogaster* в условиях измененного внешнего механического поля осуществляется, вероятно, как на уровне трансляции, так и на уровне транскрипции. Однако каким образом запускается механизм подобной регуляции, остается неясным. Ранее мы предполагали, что это может быть связано с изменением организации актинового цитоскелета на ранних этапах пребывания в условиях микрогравитации и может находить свое отражение в изменении в том числе и экспрессии генов, кодирующих актин-связывающие белки [31]. Поэтому далее оценили относительное содержание мРНК генов, кодирующих ряд белков, связывающих как мономеры, так и филаменты актина.

Относительное содержание мРНК генов, связывающихся с мономерами актина *Arpc3A* (субъединица комплекса Arp 2/3, который играет роль в нуклеации актиновых филаментов, в их образовании *de novo* [32]) и *Tmod* (блокирует элонгацию актиновых филаментов [33]), в группе «RPM» в клетках яичников снижалось на 27 % ($p < 0,05$) и 59 % ($p < 0,05$) соответственно относительно уровня контрольной группы, а в семенниках, наоборот, повышалось – на 28 % ($p < 0,05$) и 57 % ($p < 0,05$) соответственно (рис. 3, А, Б).

Аналогично менялось относительное содержание мРНК генов, продукты которых связываются с филаментами актина. Так, после экспонирования на RPM содержание мРНК фимбрина *Fim* (белок может связываться с F-актином в подмембранном цитоскелете и выступать в качестве основного организатора трехмерной актиновой сети в клетке [34]) и альфа-актинина *Actn* (белок связывает кортикальный цитоскелет с мембраной и обеспечивает его взаимодействие с цитоплазматическими сигнальными белками [35]) в яичниках снизилось на 35 % ($p < 0,05$) и 87 % ($p < 0,05$) соответственно, в семенниках возросло на 54 % ($p < 0,05$) и 96 % ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с контролем.

Однако содержание мРНК гена, кодирующего супервиллин (*Svil*), который также связывается с филаментами актина и негативно регулирует стресс-фибриллы, фокально-адгезивные контакты и адгезию клеток на субстрате [36], менялось однонаправленно в яичниках и семенниках мух, прошедших полный цикл гаметогенеза в условиях измененного внешнего механического поля. Так, содержание мРНК *Svil* в яичниках группы «RPM» было снижено на 38 % ($p < 0,05$) относительно контрольной группы, в семенниках – на 46 % ($p < 0,05$).

Относительное содержание мРНК бета-тубулина (*Betaturb*) как в яичниках (рис. 4, А), так и в семенниках (см. рис. 4, Б) в группе «RPM» не менялось относительно контроля, что коррелирует с неизменным уровнем содержания этого белка.

Однако содержание мРНК генов, кодирующих белки, связывающиеся с микротрубочками и участвующие в формировании веретена деления, менялось. Относительное содержание мРНК генов *Msp*, *Tcp1*, *Cct7* в яичниках снижалось после 80 ч экспонирования на RPM на 91, 25 и 61 % ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с контролем. В семенниках содержание мРНК *Msp* также снижалось после 196 ч на RPM на 32 % ($p < 0,05$). При этом содержание мРНК *Cct7* менялось незначительно, а количество мРНК *Tcp1* увеличилось на 25 % ($p < 0,05$) относительно контроля.

Белки *TCP1*, *CCT5* и *CCT7* являются субъединицами шаперонин-содержащего t-комплекса полипептидов 1 [37], который участвует в фолдинге цитоплазматических белков, в частности актина и тубулина, что не противоречит полученным данным о содержании этих белков (см. рис. 1). MSPS (mini spindles) – это цитоскелетный белок семейства XMAP215/Dis1 белков, связывающий микротрубочки между собой и с мембраной, участвуя тем самым в организации тубулинового цитоскелета. Кроме того, XMAP215 участвует в формировании веретена деления в соматических клетках [38]. Поскольку и в яичниках, и в семенниках относительное содержание мРНК *Msp* снижалось, но предыдущие результаты свидетельствуют о возможности получения нескольких поколений в условиях невесомости, то можно, так же как для актина и тубулина, предположить наличие ир-регуляции ее трансляции в герминативных тканях и/или в ранних зародышах, поскольку после слияния гамет начинают транслироваться предсинтезированные в них мРНК, в том числе и генов материнского и отцовского эффектов, продукты которых направляют формирование эмбриона. Поэтому мы решили определить также содержание мРНК генов материнского и отцовского эффектов в герминативных тканях мух, прошедших полный цикл гаметогенеза на RPM.

Относительное содержание мРНК *Sneaky*, гена отцовского эффекта, являющегося,

по-видимому, одним из инициаторов развития зародыша [39, 40], в семенниках имаго *Drosophila melanogaster*, экспонированных на RPM в течение всего цикла сперматогенеза, не изменялось относительно контроля (рис. 5, Б).

Содержание мРНК гена *Bicoid Bcd*, гена материнского эффекта, в яичниках группы «RPM» не изменилось в сравнении с контрольной группой (см. рис. 5, А). В раннем зародыше *Bicoid* участвует в становлении переднезадней оси и является морфогеном передней части [41, 42].

Для закоривания мРНК *Bicoid* на переднем конце необходимы *Exuperantia Exu* [42] и *Swallow Swa* [42]. Относительное содержание мРНК *Exu* в яичниках и семенниках не менялось при экспонировании на RPM. Однако уровень мРНК *Swa* в группе «RPM» в яичниках снижался на 45 %, а в семенниках – на 62 % ($p < 0,05$) относительно контроля.

Относительное содержание мРНК гена *Nanos Nos*, являющегося морфогеном задней части [42], в яичниках группы «RPM» снижалось на 61 %, в семенниках – на 46 % ($p < 0,05$) относительно контроля.

Также в группе «RPM» снижалось и содержание мРНК вероятного морфогена терминальных сегментов *Torso Tor* [43]: в яичниках – на 48 %, в семенниках – на 50 % ($p < 0,05$) относительно контроля.

Суммируя эти результаты, можно полагать, что наиболее значительные изменения уровня мРНК генов отцовского и материнского эффектов в условиях, моделирующих пребывание в невесомости, характерны для морфогенов задней и терминальной групп. Несмотря на это, как уже отмечалось, в невесомости возможно получение нескольких поколений плодовой мушки, не имеющих аномалий развития [19–21, 24]. Тем не менее клеточные механизмы, лежащие в основе такой «нормализации» в раннем развитии, до сих пор остаются неясными.

Выводы

Полученные результаты позволяют предположить, что ориентация яичников и семенников в поле силы тяжести во время оогенеза и сперматогенеза в имаго играет одну из основных ролей в поддержании уровня мРНК ключевых генов, продукты которых участвуют в раннем развитии зародыша *Drosophila melanogaster*:

– в тканях семенников и яичников имаго *Drosophila melanogaster*, полный цикл гаметогенеза которых проходил при экспонировании на RPM, изменений в относительном содержании тубулина и актина (кроме снижения на 26 % в яичниках) практически не отмечалось, несмотря на значительные в основном разнонаправленные в яичниках и семенниках изменения содержания мРНК генов, кодирующих цитоскелетные белки;

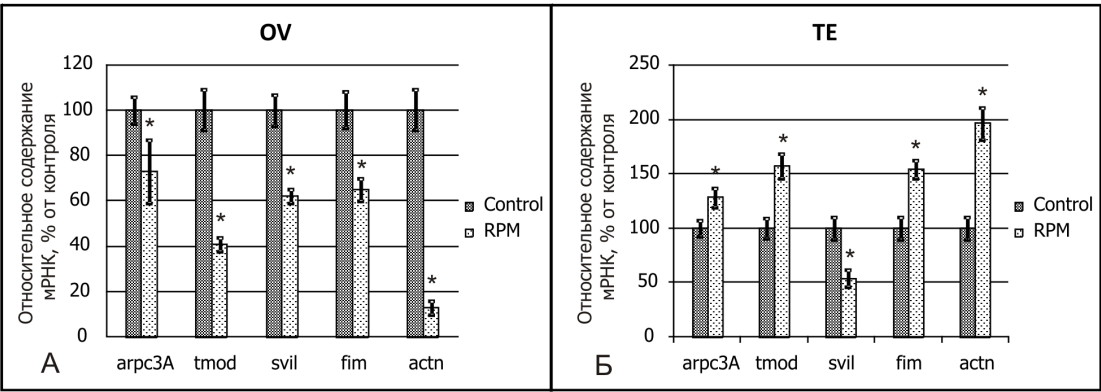


Рис. 3. Относительное содержание мРНК генов, кодирующих актин-связывающие белки в яичниках (А) и семенниках (Б). *Arpc3A* – субъединица 3 комплекса *Arp2/3*; *Tmod* – тропомодулин; *Svil* – супервиллин; *Fim* – фимбрин; *Actn* – альфа-актинин

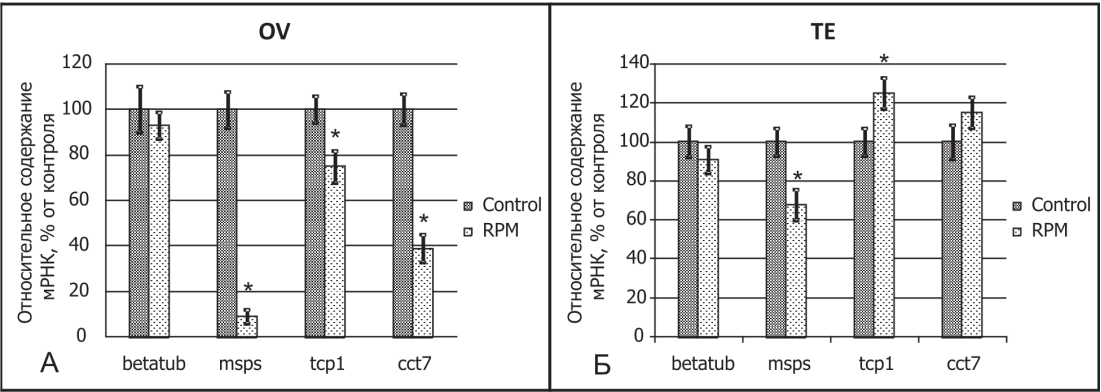


Рис. 4. Относительное содержание мРНК генов, кодирующих компоненты тубулинового цитоскелета в яичниках (А) и семенниках (Б). *Betatub* – бета-тубулин 2В; *Msp* – гомолог *SKAP5*; *Tcp1* – Тср-комплекс 1; *Cct7* – шаперонин 7 Тср-комплекса 1

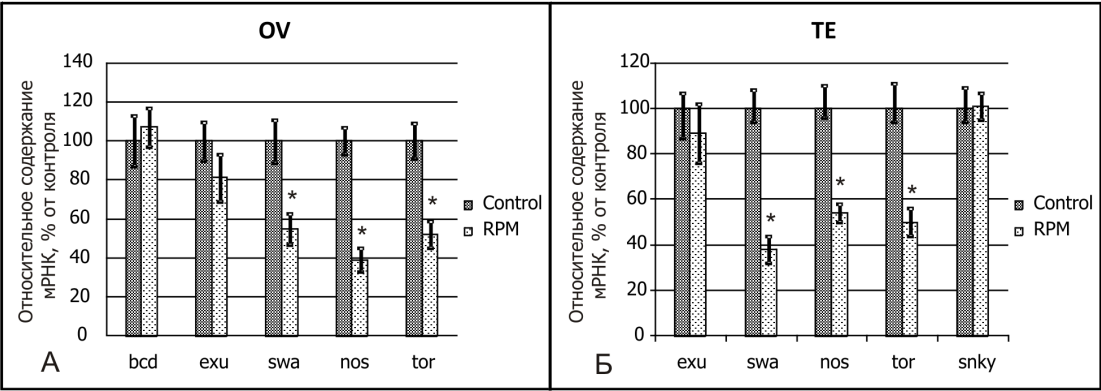


Рис. 5. Относительное содержание мРНК генов материнского и отцовского эффекта в яичниках (А) и семенниках (Б). *Bcd* – Bicoid; *Exu* – Exuperantia; *Swa* – Swallow; *Nos* – Nanos; *Tor* – Torso; *Snky* – Sneaky

– снижение относительного содержания мРНК генов материнского эффекта *Swallow (Swa)*, *Nanos (Nos)* и *Torso (Tor)* имело место и в яичниках, и в семенниках имаго *Drosophila melanogaster* после пребывания в течение 80 и 192 ч соответственно в условиях, моделирующих эффекты микрогравитации.

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам лаборатории клеточной физиологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН зав. лаб., д.м.н., чл.-корр. РАН Л.Б. Буравковой, А.Ю. Ратушному за возможность использования RPM в этом исследовании.

Работа поддержана программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Программой фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

Список литературы

1. Sakar D., Nagaya T., Koga K. et al. Culture in vector-averaged gravity environment in a clinostat results in detachment of osteoblastic ROS 17/2.8 Cells // *Environ. Medicine*. 1999. V. 43. № 1. P. 22–24.
2. Uva B.M., Masini M.A., Sturla M. et al. Clinorotation-induced weightlessness influences the cytoskeleton of glial cells in culture // *Brain Res*. 2002. V. 934. P. 132–139.
3. Gaboyard S., Blachard M.P., Travo B.T. et al. Weightlessness affects cytoskeleton of rat utricular hair cells during maturation in vitro // *NeuroReport*. 2002. V. 13. № 16. P. 2139–2142.
4. Plett P.A., Abonour R., Frankovitz S.M. et al. Impact of modeled microgravity on migration, differentiation and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells // *Experimental Hematol*. 2004. V. 32. P. 773–781.
5. Kacena M.A., Todd P., Landis W.J. Osteoblasts subjected to spaceflight and simulated space shuttle launch conditions // *In Vitro Cell Dev. Biol. – Animal*. 2004. V. 39. № 10. P. 454–459.
6. Crawford-Young S.J. Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis // *Int. J. Dev. Biol*. 2006. V. 50. № 2–3. P. 183–191.
7. Schatten H., Lewis M.L., Chakrabarti A. Spaceflight and clinorotation cause cytoskeleton and mitochondria changes and increases in apoptosis in cultured cells // *Acta Astronaut*. 2001. V. 49. № 3–10. P. 399–418.
8. Gershovich P.M., Gershovich J.G., Buravkova L.B. Simulated microgravity alters actin cytoskeleton and integrin-mediated focal adhesions of cultured human mesenchymal stromal cells // *J. Grav. Physiol*. 2008. V. 15. № 1. P. 203–204.
9. Zayzafoon M., Gathings W.E., McDonald J.M. Modeled microgravity inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and increases adipogenesis // *Endocrinol*. 2004. V. 145. № 5. P. 2421–2432.
10. Meyers V.E., Zayzafoon M., Gonda S.R. et al. Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells // *J. of Cellular Biochemistry*. 2004. V. 93. № 4. P. 697–707.
11. Meyers V.E., Zayzafoon M., Douglas J.T. et al. RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity // *J. of Bone and Mineral Res*. 2005. V. 20. № 10. P. 1858–1866.
12. Dai Z.Q., Wang R., Ling S.K. et al. Simulated microgravity inhibits the proliferation and osteogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells // *Cell Proliferation*. 2007. V. 40. № 5. P. 671–684.
13. Patel M.J., Liu W., Sykes M.C. et al. Identification of mechanosensitive genes in osteoblasts by comparative microarray studies using the rotating wall vessel and the Random Positioning Machine // *J. of Cellular Biochemistry*. 2007. V. 101. № 3. P. 587–599.
14. Pan Z., Yang J., Guo C. et al. Effects of hindlimb unloading on ex vivo growth and osteogenic/adipogenic potentials of bone marrow derived mesenchymal stem cells in rats // *Stem Cells and Development*. 2008. V. 17. № 4. P. 795–804.
15. Sordella R., Jiang W., Chen G.C. et al. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis // *Cell*. 2003. V. 113. № 2. P. 147–158.
16. McBeath R., Pirone D.M., Nelson C.M. et al. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment // *Developmental Cell*. 2004. V. 6. № 4. P. 483–495.
17. Buravkova L.B., Romanov Y.A., Konstantinova N.A. et al. Cultured stem cells are sensitive to gravity changes // *Acta Astronaut*. 2008. V. 63. № 5–6. P. 603–608.
18. Konstantinova N.A., Buravkova L.B., Manuilova E.S. et al. The effects of gravity vector randomization on mouse embryonic stem cells in vitro // *J. of Gravit. Physiol*. 2006. V. 13. № 1. P. 149–150.
19. Parfyonov G.P., Platonova R.N., Tairbekov M.G. et al. Biological experiments carried out aboard the biological satellite «Cosmos-936» // *Life Sci. and Space Res*. 1979. V. 17. P. 297–301.
20. Парфенов Г.П. Развитие организмов в состоянии невесомости // *Косм. иссл*. 1964. Вып. 2. С. 330–335.
21. Parfenov G.P. Development of organisms in a state of weightlessness // *Kosmicheskie issledovaniya*. 1964. V. 2. P. 330–335.
22. Огнева И.В., Белякин С.Н., Сарантсева С.В. The development of *Drosophila melanogaster* under different duration space flight and subsequent adaptation to earth gravity // *PLoSOne*. 2016 Nov 18. V. 11. № 11.
23. Куприянова М.С., Усик М.А., Огнева И.В. Содержание цитоскелетных белков в ооцитах третьего поколения плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, полученных после 44,5-суточного космического полета // *Авиакосм. и экол. мед*. 2016. Т. 50. № 4. С. 27–34.
24. Kupriyanova M.S., Usik M.A., Ogneva I.V. Cytoskeletal proteins content in the oocytes of the third generation

of the fruit fly *Drosophila melanogaster*, obtained after 44.5-day space flight // *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 2016. V. 50. № 4. P. 27–34.

23. Vernos I., Gonzalez-Jurado J., Calleja M. et al. Microgravity effects on the oogenesis and development of embryos of *Drosophila melanogaster* laid in the Space shuttle during the Biorack experiment (ESA) // *Int. J. Dev. Biol.* 1989. V. 33. № 2. P. 213–226.

24. Marco R., Bengurira A., Sanchez J. et al. Effects of the space environment on *Drosophila melanogaster* development. Implications of the IML-2 // *Exp. J. Biotechnol.* 1996. V. 47. P. 179–190.

25. Парфенов Г.П. Возникновение доминантных летальных мутаций у дрозофилы при космическом полете на корабле-спутнике // *Искусственные спутники Земли*. М., 1961. Вып. 10. С. 69–71.

Parfenov G.P. Appearance of dominant lethal mutations in *Drosophila* during space flight on the satellite // *Iskusstvennye sputniky Zemli*. Moscow, 1961. V. 10. P. 69–71.

26. Парфенов Г.П. Причины летальности зародышевых клеток у дрозофилы после полетов кораблей «Восток-3» и «Восток-4» // *Косм. иссл.* 1964. Вып. 2. С. 335–342.

Parfenov G.P. Reasons of the lethality in *Drosophila* germ cells after the spaceflights «Vostok-3» and «Vostok-4» // *Kosmicheskie issledovaniya*. 1964. V. 2. P. 335–342.

27. Парфенов Г.П. Генетические исследования в космосе // *Там же*. 1967. Вып. 5. С. 633–635.

Parfenov G.P. Genetic researches in space // *Ibid.* 1967. V. 5. P. 633–635.

28. Van Loon J.J.W.A. Some history and use of the Random Positioning Machine, RPM, in gravity related research // *Adv. Space. Res.* 2007. V. 39. P. 1161–1165.

29. Towbin H., Staehlin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application // *Proc. Natl. AcadSci. USA*. 1970. V. 76. P. 4350–4354.

30. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method // *Methods*. 2001. V. 2. P. 402–408.

31. Ogneva I.V. Cell mechanosensitivity: mechanical properties and interaction with gravitational field // *Biomed. Res. Int.* 2013.

32. Pollard T.D., Borisy G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments // *Cell*. 2003. V. 112. P. 453–465.

33. Wear M.A., Cooper J.A. Capping protein: new insights into mechanism and regulation // *Trends Biochem. Sci.* 2004. V. 29. P. 418–428.

34. Janji B., Giganti A., De Corte V. et al. Phosphorylation on Ser5 increases the F-actin-binding activity of L-plastin and promotes its targeting to sites of actin assembly in cells // *J. Cell Sci.* 2006. V. 119. P. 1947–1960.

35. Baron M.D., Davison M.D., Jones P. et al. The structure and function of alpha-actinin // *Biochem. Soc. Trans.* 1987. V. 15. P. 796–798.

36. Crowley J.L., Smith T.C., Fang Z. et al. Supravillin reorganizes the actin cytoskeleton and increases invadopodial efficiency // *Mol. Biol. Cell*. 2009. V. 20. № 3. P. 948–962.

37. Knee K.M., Sergeeva O.A., King J.A. Human TRiC complex purified from HeLa cells contains all eight CCT subunits and is active in vitro // *Cell Stress Chaperones*. 2013. V. 18. P. 137–144.

38. Gergely F., Draviam V.M., Raff J.W. The ch-TOG/XMAP215 protein is essential for spindle pole organization in human somatic cells // *Genes Dev.* 2013. V. 17. P. 336–341.

39. Fitch K.R., Yasuda G.K., Owens K.N. et al. Paternal effects in *Drosophila*: implications for mechanisms of early development // *Curr. Top. Dev. Biol.* 1998. V. 38. P. 1–34.

40. Fitch K.R., Wakimoto B.T. The paternal effect gene ms (3) sneaky is required for sperm activation and the initiation of embryogenesis in *Drosophila melanogaster* // *Dev. Biol.* 1998. V. 197. № 2. P. 270–282.

41. Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* // *Nature*. 1980. Oct. 30. V. 287. № 5785. P. 795–801.

42. Gilbert S.F. *Developmental Biology*. 2013.

43. Stevens L.M., Frohnhöfer H.G., Klingler M. et al. Localized requirement for torso-like expression in follicle cells for development of terminal anlagen of the *Drosophila* embryo // *Nature*. 1990. Aug. 16. V. 346. № 6285. P. 660–663.

Поступила 11.09.2017

DROSOPHILA MELANOGASTER OVARY AND TESTES CELLS CYTOSKELETON AFTER COMPLETE GAMETOGENESIS CYCLE UNDER CHANGED EXTERNAL MECHANICAL FIELD

Kupriyanova M.S., Loktev S.S., Orlov O.I., Ogneva I.V.

Aviakosmicheskaya i Ekologicheskaya Meditsina (Russia). 2017. V. 51. № 7 (special issue). P. 120–128

Virgin imago groups were subjected to microgravity modeling conditions (with Random Position Machine – RPM) during complete oogenesis cycle in females (80 hours) and complete spermatogenesis cycle in males (192 hours). Control groups were under the same condition, however in constant orientation in mechanical field. Immediately after experiment ovary and testis were extracted for further actin and tubulin relative content investigation with western-blotting method, relative mRNA content of genes coding cytoskeletal proteins and both paternal and maternal factors effects with quantitative polymerase chain reaction (qPCR) method after preliminary reverse transcription.

The results obtained shows that there are almost no changes in relative actin and tubulin content (besides actin content decrease in ovary by 26 %) in both Drosophila

melanogaster imago ovary and testes tissues exposed with RPM. Despite considerable and mostly opposite directed in ovary and testis mRNA relative content of genes, coding cytoskeletal proteins. Maternal factor Swallow (Swa), Nanos (Nos) and Torso (Tor), being correspondingly anterior and posterior terminal segment morphogenes, mRNA drop

took place in Drosophila melanogaster imago ovary as well as in testis due to RPM operation. This could point to the gravitation role in morphogene distribution and embryos early development.

Keywords: microgravity, cytoskeleton, oogenesis, spermatogenesis, actin, tubulin.