

ВЛИЯНИЕ ВИБРОСТИМУЛЯЦИИ ОПОРНЫХ ЗОН СТОПЫ У КРЫС НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МЫШЦ ГОЛЕНИ И СОДЕРЖАНИЕ В НИХ N2A-ИЗОФОРМЫ ТАЙТИНА В УСЛОВИЯХ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ

© 2014 г. Т.В. Балтина, М.В. Кузнецов, А.А. Еремеев, М.Э. Балтин

Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

E-mail: tvbaltina@gmail.com

Поступила в редакцию 01.11.13 г.

Изучено влияние вибростимуляции опорных зон стопы на функциональное состояние мышц голени и содержание в них N2A-изоформы тайтина у крыс в условиях моделируемой микрогравитации (модель вывешивания). Результаты исследования показали, что вибростимуляция опорных зон стопы у крысы в условиях гравитационной разгрузки может уменьшить падение амплитуды моторного ответа мышц голени и нежелательное снижение содержания тайтина.

Ключевые слова: гравитационная разгрузка, модель вывешивания, вибростимуляция, рецепторы опоры, моторный ответ, N2A-изоформа тайтина.

Исследования двигательной системы в невесомости и моделирующих ее условиях выявили изменения функционального состояния всех звеньев нейромоторного аппарата [1–4]. Механическая разгрузка скелетных мышц во время космических полетов или их наземной имитации вызывает атрофию скелетных мышц, которая особенно затрагивает антигравитационную мускулатуру нижних конечностей [2,5]. Атрофия характеризуется снижением мышечного объема, массы, силы мышцы, изменением гистохимических характеристик, а также снижением нервно-мышечной функции [6–9]. Показано, что атрофические изменения в мышцах, в частности в *m. soleus*, сопровождаются значительным снижением содержания тайтина – гигантского саркомерного белка, играющего важную роль в поддержании высокоупорядоченной саркомерной структуры и контрактильной функции мышц [10–13].

В качестве одной из причин подобных изменений в условиях микрогравитации предполагается ограничение опорной афферентации [14,15] и, по всей вероятности, вследствие этого изменение протеолиза и синтеза ряда белков. Данные, полученные при тестировании членов экипажа в условиях космического полета [16] и в модельных экспериментах на земле [17,18], показали, что увеличение притока сенсорной информации к двигательным центрам при применении механического давления на опорные зоны стопы приводит к активации мышц нижних конечностей, что сопровождается снижением

или предотвращением их атрофии. Известно, что использование компенсатора опорной разгрузки приводило к уменьшению развития атрофических процессов и предотвращало снижение содержания тайтина в *m. soleus* человека в условиях «сухой» иммерсии [19,20]. Характеристики и пространственная локализация кожных рецепторов стопы у человека [21,22] и крысы [23] описаны, однако информации о потенциальной пользе их стимуляции для предотвращения атрофии при разгрузке недостаточно.

В этом исследовании представлены результаты изменения параметров моторного ответа и содержания N2A-изоформы тайтина в мышцах голени крысы в условиях моделируемой микрогравитации при вибростимуляции опорных зон стопы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на нелинейных лабораторных крысах массой 180–200 г в соответствии с правилами обращения с лабораторными животными с соблюдением всех биоэтических норм.

В качестве модели гравитационной разгрузки использовали метод вывешивания, описанный в работе [24].

В эксперименте животные были разделены на три группы:

«контроль» – интактные животные ($n = 6$);

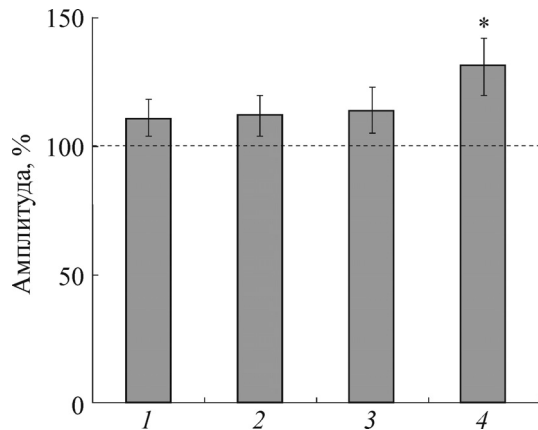


Рис. 1. Значения амплитуды моторного ответа трехглавой мышцы голени крысы на разных сроках гравитационной разгрузки. По оси абсцисс обозначены сутки воздействия опорной разгрузки: 1 – 7-е сутки, 2 – 14-е сутки, 3 – 21-е сутки, 4 – 35-е сутки; по оси ординат – значения амплитуды моторного ответа, выраженные в процентах по отношению к контролю. Прерывистой линией обозначены контрольные значения, принятые за 100%. * – Достоверность, $p < 0,05$.

«ГР» – гравитационная разгрузка от 7 до 35 суток ($n = 36$);

«ГР+ВС» – 7-суточная гравитационная разгрузка в сочетании с ежедневной вибростимуляцией опорных зон стопы ($n = 12$);

Вибростимуляцию осуществляли циклами – по шесть раз в течение трех часов каждый день в условиях 7-суточной гравитационной разгрузки (длительность одного цикла вибростимуляции составила 20 мин, интервал между циклами – 10 мин, амплитуда колебаний – 0,5 мм; частота – 50 Гц). Использовали стимулятор оригинальной конструкции, который был разработан на кафедре физиологии человека и животных Казанского федерального университета.

Через 7, 14, 21 и 35 суток воздействия гравитационной разгрузки регистрировали электрофизиологические показатели трехглавой мышцы голени. Регистрировали моторный ответ мышцы. Определяли максимальную амплитуду и порог возникновения ответов [25].

Для исследования изоформного состава тайтина были взяты образцы камбаловидной мышцы от каждой группы крыс ($n = 18$). ДСН-гель-электрофорез проводили по методу, описанному в работе [26]. Денситометрическую обработку гелей проводили с помощью компьютерной программы Total Lab 1.11. Количество тайтина оценивали по отношению к содержанию тяжелых цепей миозина [13]. Иммуноблоттинг тайтина проводили по методу [27]. Использовали моноклональные антитела Т11

(Sigma, США) к участку молекулы тайтина в I-диске саркомера. В качестве вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, использовали кроличьи антитела против IgG мышей. Белковые полосы выявляли с помощью 3,3'-диаминобензидина.

При статистическом анализе результатов использовали t -критерий Стьюдента. Критерием значимости считался уровень – 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние гравитационной разгрузки задних конечностей на амплитуду моторных ответов трехглавой мышцы голени крысы. Амплитуда моторного ответа трехглавой мышцы крысы через семь суток после разгрузки составила $111 \pm 7\%$ по сравнению с контролем ($p > 0,05$). В дальнейшем амплитуда увеличивалась и на 14-е сутки составила $112 \pm 8\%$ ($p > 0,05$); через 21 сутки – $114 \pm 9\%$ ($p > 0,05$); через 35 суток – $131 \pm 11\%$ по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Результаты представлены на рис. 1.

Поскольку мы не получили достоверных изменений амплитуды ответов трехглавой мышцы голени в первые недели эксперимента, хотя из литературных данных известно, что в этот период атрофия мышц уже развивается, далее был проведен анализ амплитуды моторных ответов отдельных головок этой мышцы.

Мы ограничились 7-ю и 14-ю сутками гравитационной разгрузки, поскольку показано, что максимальная атрофия в мышцах задней конечности крысы в этих условиях наблюдается в этом временном интервале [17].

Амплитуда моторного ответа медиальной головки икроножной мышцы крысы через семь суток после разгрузки составила $74 \pm 15\%$ ($p < 0,05$), по сравнению с контролем. В дальнейшем амплитуда ответа увеличивалась и на 14-е сутки составила $85 \pm 16\%$ ($p < 0,05$). Амплитуда моторного ответа латеральной головки икроножной мышцы крысы через 7 суток после разгрузки составила $104 \pm 10\%$ ($p > 0,05$), на 14-е сутки – $105 \pm 12\%$ ($p > 0,05$) по отношению к контрольным значениям.

На седьмые сутки гравитационной разгрузки амплитуда моторного ответа камбаловидной мышцы составила $43 \pm 11\%$ ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. В дальнейшем амплитуда увеличивалась и на 14-е сутки составила $74 \pm 16\%$ ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Результаты представлены на рис. 2.

Влияние 3-часовой вибростимуляции опорных зон стопы крысы на амплитуду моторных

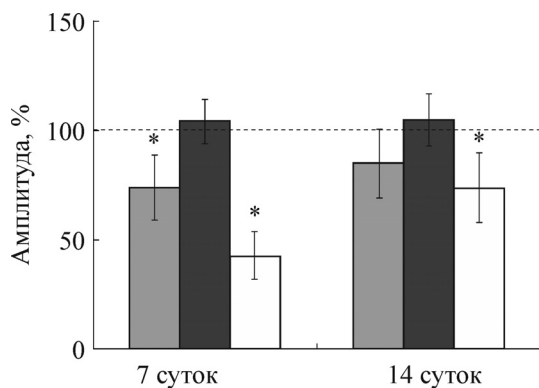


Рис. 2. Значения амплитуды моторного ответа мышц голени крысы на разных сроках гравитационной разгрузки. По оси абсцисс обозначены сутки воздействия гравитационной разгрузки; по оси ординат – значения амплитуды моторного ответа, выраженные в процентах по отношению к контролю. Прерывистой линией обозначены контрольные значения, принятые за 100%; светло-серым цветом, обозначены значения амплитуды моторного ответа медиальной головки икроножной мышцы; темно-серым цветом – латеральной головки икроножной мышцы, белым – камбаловидной мышцы.

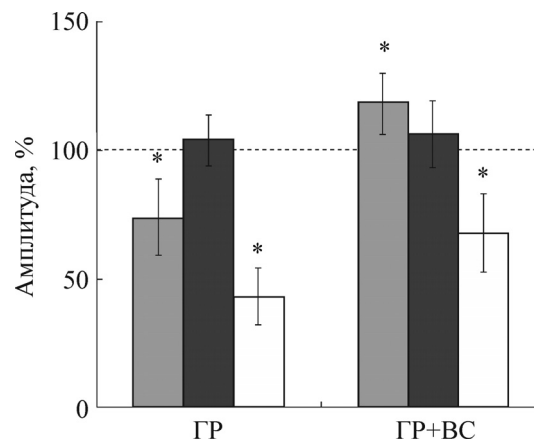


Рис. 3. Значения амплитуды моторных ответов мышц голени крысы при сочетанном влиянии вибростимуляции опорных зон стопы и 7-суточной гравитационной разгрузки. ГР – группа с гравитационной разгрузкой, ГР+ВС – группа с сочетанием гравитационной разгрузки с вибростимуляцией опорных зон стопы. Остальные обозначения, как на рис. 2.

ответов и на содержание тайтина в трехглавой мышце голени на фоне гравитационной разгрузки. При сочетанном влиянии 3-часовой вибростимуляции опорных зон стопы и 7-суточной гравитационной разгрузки максимальная амплитуда моторного ответа латеральной головки икроножной мышцы не изменилась по сравнению с контролем, а амплитуда ответа медиальной головки икроножной мышцы увеличилась и составила $118 \pm 12\%$ от контрольных значений ($p < 0,05$). Амплитуда моторного ответа камбаловидной мышцы составила $68 \pm 15\%$ по сравнению с данными, полученными при исследовании интактных животных ($p < 0,05$). Результаты представлены на рис. 3.

При этом в камбаловидной мышце у крыс при сочетанном влиянии 3-часовой вибростимуляции опорных зон стопы и 7-суточной гравитационной разгрузки (группа «ГР+ВС» на рисунке) содержание N2A-изоформы тайтина снизилось лишь на 11% по сравнению с содержанием тайтина в камбаловидной мышце крыс контрольной группы. Увеличение относительного количества N2A-изоформы тайтина сопровождалось снижением содержания T2-фрагмента в камбаловидной мышце у крыс группы с применением вибростимуляции опорных зон стопы («ГР+ВС») в 1,5 раза по сравнению с группой без стимуляции («ГР»). Результаты представлены на рис. 4.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенного исследования показали, что амплитуда моторного ответа трехглавой мышцы голени крысы существенно не различалась у контрольной группы крыс и животных, находившихся в условиях гравитационной разгрузки. Однако мышечная атрофия должна была проявиться при вывешивании снижением амплитуды моторных ответов на 7-е–14-е сутки, что наблюдалось в не используемых мышцах [28]. В наших экспериментах мы не получили подобного эффекта при регистрации ответов с целой мышцей. Учитывая, что гравитационная разгрузка по-разному влияет на мышцы нижних конечностей крысы [29,30], мы решили провести снятие моторного ответа для каждой головки мышцы.

Раздельное тестирование головок трехглавой мышцы голени показало, что амплитуда моторного ответа медиальной головки икроножной и камбаловидной мышц крысы в условиях моделируемой гравитационной разгрузки снижается по отношению к контрольным значениям, причем в камбаловидной мышце такое снижение более выражено. Для объяснения некоторых из эффектов разгрузки в литературе обсуждается уменьшение опорной афферентации, играющей роль в регуляции позы и локомоций [14,30,31]. Авторы работы [1] предположили, что снижение сократительных свойств скелетных мышц при переходе к невесомости обуславливается рефлекторным снижением мышечного тонуса, обуславливаемым в

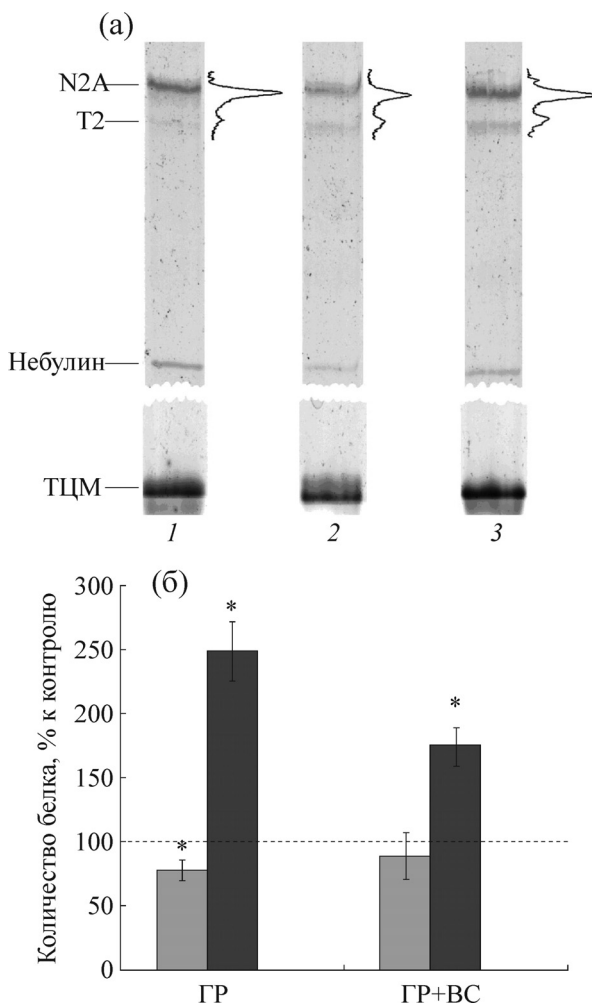


Рис. 4. Изменения изоформного состава тайтина в камбаловидной мышце крысы в условиях гравитационной разгрузки и в сочетании с вибростимуляцией опорных зон стопы. (а): 1 – «контроль»; 2 – «ГР»; 3 – «ГР+ВС»; Указаны белковые полосы: тяжелых цепей миозина; небулина – цитоскелетного белка тонких нитей; T2-фрагмента тайтина и N2A-изоформы тайтина и профили интенсивности оптической плотности полос тайтина на геле. (б) – По оси ординат: отношение количества N2A-изоформы тайтина (светло-серые столбцы) и T2-фрагмента (темно-серые столбцы) к тяжелым цепям миозина по результатам денситометрии белковых полос на электрофореграммах, выраженное в % по отношению к контролю. Остальные обозначения, как на рис. 3.

свою очередь устранением опоры. В дальнейшем это предположение было подтверждено в ряде исследований, показавших, что снижение скоростно-силовых характеристик в условиях микрогравитации существенно отличается в разных мышцах, будучи более выраженным в тонических мышцах («антигравитационных») [5,8]. В экспериментах на крысах было показано, что электромиографическая активность камба-

ловидной мышцы снижается уже через 15 мин вывешивания [30,32]. Аналогичные изменения электромиографической активности камбаловидной и икроножной мышц наблюдали у обезьян после космического полета [33]. Наши результаты также показали снижение амплитуды моторного ответа в камбаловидной мышце крыс, что, по всей вероятности, является следствием трофических изменений в мышце [19]. Однако вклад в это снижение могло вносить и уменьшение содержания тайтина, играющего важную роль в поддержании саркомерной структуры и контрактильной функции мышц [34].

Известно, что механическая стимуляция опорных зон стопы (и у крысы, и у человека), во время гравитационной разгрузки может предотвратить мышечную атрофию и снижение содержания тайтина. Кроме того, было обнаружено, что при использовании поверхностного механического давления на стопу предотвращается атрофия мышечных волокон типа I и в меньшей степени мышечных волокон типа II [19,35].

Наши результаты также подтверждают данные других авторов [17,18] о том, что механическая стимуляция опорных зон стопы крысы во время гравитационной разгрузки может предотвратить мышечную атрофию и снижать содержание тайтина. В нашем исследовании мы показали, что вибростимуляция опорных зон стопы предотвращает атрофию икроножной мышцы, большая часть волокон которой представлена мышечными волокнами типа II. Вероятнее всего это связано с тем, что использование вибростимуляции направлено на активацию окончаний Руффини или телец Пачини, расположенных глубже в коже.

Таким образом, результаты данного исследования показали, что в условиях гравитационной разгрузки вибростимуляция опорных зон стопы у крысы предотвращает снижение амплитуды моторного ответа и деградацию тайтина в икроножной и камбаловидной мышце крысы, что может свидетельствовать и о снижении степени выраженности атрофических изменений в этих мышцах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-04-01746а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. I. Kozlovskaya, I. Dmitrieva, L. Grigorieva, et al., in: *Stance and Motion. Facts and Concepts*, Ed. by V.S. Gurfinkel, M.Ye. Ioffe, J. Massion (Plenum, N-Y., 1988), pp. 37–48.

2. V. R. Edgerton and R. R. Roy, *Adv. Space Biol. Med.* **4**, 33 (1994).
3. M. F. Reschke, W. H. Paloski, J. J. Bloomberg, et al., *Brain Res. Rev.* **28** (1–2), 102 (1998).
4. E. Nagy, L. Bognar, A. Csengery, et al., *Int. Tinnitus J.* **6** (2), 120 (2000).
5. R. H. Fitts, D. R. Riley, and J. J. Widrick, *J. Appl. Physiol.* **89** (2), 823 (2000).
6. K. M. Baldwin, *Med. Sci. Sports Exerc.* **28** (10), 101 (1996).
7. M. M. Bammann, M. S. Clarke, D. L. Feedback, et al., *J. Appl. Physiol.* **84** (1), 157 (1998).
8. C. Kourtidou-Papadeli, A. Kyparos, M. Albani, et al., *Acta Astronaut.* **54** (10), 737 (2004).
9. D. B. Thomason and F. W. Booth, *J. Appl. Physiol.* **68** (1), 1 (1990).
10. T. Toursel, L. Stevens, H. Granzier, and Y. Mounier, *J. Appl. Physiol.* **92**, 1465 (2002).
11. B. S. Shenkman, T. L. Nemirovskaya, I. N. Belozeroва, et al., *J. Gravit. Physiol.* **9** (1), 139 (2002).
12. И. М. Вихлянец, С. Л. Малышев, Б. С. Шенкман и З. А. Подлубная, *Биофизика* **49** (6), 995 (2004).
13. И. М. Вихлянец и З. А. Подлубная, *Биофизика* **53** (6), 1058 (2008).
14. А. И. Григорьев, И. Б. Козловская и Б. С. Шенкман, *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова* **90** (5), 508 (2004).
15. R. Roll, J. C. Gilhodes, J. P. Roll, et al., *Exp. Brain Res.* **122** (4), 393 (1998).
16. C. S. Layne, G. W. Lange, C. J. Pruett, et al., *Acta Astronaut.* **43** (3–6), 107 (1998).
17. L. De-Doncker, F. Picquet, and M. Falempin, *J. Appl. Physiol.* **89** (6), 2344 (2000).
18. L. De-Doncker, M. Kasri, and M. Falempin, *Exp. Neurol.* **201** (2), 368 (2006).
19. Б. С. Шенкман, З. А. Подлубная, И. М. Вихлянец и др., *Биофизика* **49** (5), 881 (2004).
20. И. М. Вихлянец, З. А. Подлубная, Б. С. Шенкман и И. Б. Козловская, *Докл. РАН* **407** (5), 692 (2006).
21. F. A. Sonnenborg, O. K. Andersen, and L. Arendt-Nielsen, *Clin. Neurophysiol.* **111** (5), 2160 (2000).
22. M. Trulsson, *Exp. Brain Res.* **137** (1), 111 (2001).
23. J. W. Leem, W. D. Willis, and J. M. Chung, *J. Neurophysiol.* **69** (5), 1684 (1993).
24. E. R. Morey-Holton and R. K. Globus, *J. Appl. Physiol.* **92** (4), 1367 (2002).
25. Т. В. Балтина, А. А. Еремеев и И. Н. Плещинский, *Рос. физиол. журн. им. И.М.Сеченова* **91** (5), 481 (2005).
26. R. Tatsumi and A. Hattori, *Anal. Biochem.* **224** (1), 28 (1995).
27. H. Towbin, T. Staehlin, and J. Gordon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** (9), 4350 (1979).
28. J. Duchateau and K. Hainaut, *J. Physiol. (Lond.)* **422**, 55 (1990).
29. E. A. Ilyin and V. S. Ogahov, *Adv. Space Res.* **9** (11), 11 (1989).
30. F. Kawano, A. Ishihara, J. L. Stevens, et al., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287** (1), 76 (2004).
31. V. Dietz, *Clin. Neuro-physiol.* **114** (8), 1379 (2003).
32. Y. Ohira, T. Nomura, F. Kawano, et al., *J. Gravit. Physiol.* **9** (2), 49 (2002).
33. R. R. Roy, S. C. Bodine, D. J. Pierotti, et al., *J. Gravit. Physiol.* **6** (2), 55 (1999).
34. R. Horowitz, E. S. Kempner, M. E. Bisher, and R. J. Podolsky, *Nature* **323** (6084), 160 (1986).
35. А. Кyparos, D. L. Feedback, Ch. S. Layne, et al., *J. Appl. Physiol.* **99** (2), 739 (2005).

Effect of Vibratory Stimulation of Foot Support Areas in Rats on the Functional State of Leg Muscles and the Content of N2A Titin Isoforms in Gravity Relief

T.V. Baltina, M.V. Kuznetsov, A.A. Yeremeev, and M.E. Baltin

Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 18, Kazan, 420008 Russia

In this work, we studied the effect of vibratory stimulation of the foot support zones on the functional state of the leg muscles and the content of N2A titin isoforms in rats under simulated microgravity (hanging model). The results of this study showed that vibratory support zones of the rat foot in a gravity discharge may reduce the incidence in amplitude of the leg muscle motor response and undesirable reduction of the titin content.

Key words: gravitational unloading, hanging model, vibratory stimulation, receptors of support zones, motor response, N2A titin isoforms