

## **ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ «СУХОЙ» ИММЕРСИИ НА СОДЕРЖАНИЕ В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА $\alpha$ -ГЛОБУЛИНОВЫХ БЕЛКОВ ОСТРОЙ ФАЗЫ**

ЛАРИНА О.Н., БЕККЕР А.М.

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

### **АННОТАЦИЯ**

В работе сообщаются результаты исследований позитивных и негативных белков острой фазы во время 7-суточной «сухой» иммерсии и в период последействия. Иммунотурбидиметрическим методом в сыворотке крови определены концентрации индивидуальных белков, относящихся к  $\alpha$ 1- и  $\alpha$ 2-глобулинам ( $\alpha$ 1-антитрипсин,  $\alpha$ 1-кислый гликопротеин, апо-липопротеин А, церулоплазмин,  $\alpha$ 2-макроглобулин, гаптоглобин). Результаты исследования согласуются с данными, полученными ранее с помощью электрофоретического анализа.

**Ключевые слова:** человек, сухая иммерсия, сыворотка крови, белки острой фазы.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Сбалансированность адаптационных процессов имеет большое значение для эффективной компенсации нарушений гомеостаза, обусловленных различными воздействиями, в том числе изменением среды обитания биологических объектов. Детализация картины метаболических и регуляторных сдвигов, возникающих в ходе адаптации, создает предпосылки для применения дополнительных параметров оценки состояния организма и разработки подходов к оптимизации системы адаптивных реакций. В результате обследований участников космических полетов и наземных исследований, имитирующих эффекты пребывания в условиях космического полета (антиорто статическая гипокинезия, «сухая» иммерсия, вестибулярные воздействия), были выявлены изменения процентного содержания фракций, получаемых при электрофорезе белков плазмы крови в ацетатцеллюлозе, причем обнаруженные изменения могут быть интерпретированы как проявление реакции острой фазы [1-3]. Реакция острой фазы хорошо изучена в клинической медицине как ранний неспецифический системный ответ организма на локальные или системные нарушения, вызванные инфекцией, повреждением тканей, неопластическим ростом и иммунологическими расстройствами [4-6]. Одним из признаков реакции острой фазы является изменение темпов продуцирования печенью ряда белков крови, получивших общее название «белки острой фазы». При электрофорезе в ацетатцеллюлозе большинство белков острой фазы мигрирует в составе фракций  $\alpha$ 1- и  $\alpha$ 2-глобулинов. Статистически значимые изменения уровня  $\alpha$ 1- и  $\alpha$ 2-глобулиновых фракций присутствовали во всех наших исследованиях белкового состава крови у космонавтов после космических полетов и испытуемых при моделировании факторов космического полета. Измерение концентраций отдельных белков острой фазы прямыми методами позволяет значительно более определенно судить о динамике их содержа-

ния в крови, а также дифференцировать поведение каждого белка, что невозможно при работе с белковой смесью, которой являются электрофоретические фракции  $\alpha$ 1- и  $\alpha$ 2-глобулинов. В настоящей работе представлены результаты исследования концентраций в крови белков острой фазы, относящихся к  $\alpha$ 1- и  $\alpha$ 2-глобулинам, во время пребывания испытуемых в «сухой» иммерсии и в период реадaptации к обычному образу жизни.

### **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В исследовании приняли участие 14 испытуемых добровольцев мужского пола. Возраст обследуемых составлял  $24,9 \pm 3,8$  лет, рост  $178,0 \pm 6,4$  м, вес  $73,7 \pm 9,8$  кг.

Условия «сухой» иммерсии [7] были следующие. Размеры водного бассейна, предназначенного для размещения одного испытуемого, составляли  $210 \times 99 \times 81$  см (длина  $\times$  ширина  $\times$  глубина). Температура воды поддерживалась в пределах  $32,5-34,5^\circ\text{C}$ , температура воздуха в помещении –  $23-25^\circ\text{C}$ . Поверхность воды была закрыта эквивалентной ей по удельному весу водонепроницаемой тканью, при этом площадь ткани значительно превышала площадь горизонтального сечения бассейна. Испытуемые погружались в водную среду до уровня шеи, при этом складки ткани вместе с заключенной в них жидкостью смыкались вдоль оси тела. Продолжительность пребывания в иммерсии составляла 7 суток. Комплексная программа проведения исследований включала выполнение нескольких исследовательских методов и санитарно-гигиенических процедур, требующих извлечения испытуемых из иммерсионной среды. При этом продолжительность нахождения испытуемого вне иммерсионного бассейна в среднем составляла 64 мин./сутки и не превышала 215 мин./сутки.

Для 6 испытуемых в течение первых 6 суток иммерсии ежедневно проводилось по 1 сеансу электромиостимуляции мышц нижних конечностей с помощью двух 6-канальных низкочастотных стимуляторов «Стимул НЧ-01» (Россия). Параметры генерируемых импульсов: двухполярные, симметричные прямоугольные, длительность 1мс, частота 25 Гц, амплитуда 0-45 В. Продолжительность каждого сеанса – 3 часа.

Для проведения исследований использовали сыворотку крови, полученную из локтевой вены в утренние часы натощак после 12-часового перерыва в приеме пищи. Взятие крови проводили 1-2 раза до иммерсии (фоновый период), 3 раза во время воздействия – через 2, 4 и 7 суток после начала иммерсии и 2 раза в период последействия (через 3 и 7 суток после выхода из иммерсии).

Измерение концентраций белков иммунотурбидиметрическим методом осуществляли на полуавтоматическом биохимическом анализаторе «Колиб-

ри» («Техномедика», Россия) с помощью наборов реактивов Sentinel (Италия) ( $\alpha$ 1-антитрипсин ( $\alpha$ 1-АТ),  $\alpha$ 1-кислый гликопротеин ( $\alpha$ 1-КГП), церулоплазмин (Цер),  $\alpha$ 2-макроглобулин ( $\alpha$ 2-М), гаптоглобин (Гп), а также Human (Германия) и BioSystems S.F. (аполипопротеин А (АпоА).

Для статистической обработки результатов использовали пакет STATISTICA версия 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные в работе экспериментальные данные представляют собой значения концентраций белков в крови испытуемых в различные сроки исследования. Преобразование результатов количественного определения в относительные единицы путем деления концентраций каждого исследуемого белка во время иммерсии и в период последствия на среднее значение концентрации в фоновом периоде позволяет нормировать изменения уровней белков в крови и исключить влияние на результаты статистического анализа межиндивидуальной варибельности базальных концентраций белков. Отсутствие существенных различий статистических параметров выборок, полученных для группы испытуемых, находившихся в условиях «чистой» иммерсии, и группы с применением электромиостимуляции, позволило для 5 белков рассматривать объединенные массивы данных, включающие результаты обследования 12-14 испытуемых. Измерения  $\alpha$ 2-макроглобулина проведены лишь у 7 испытуемых из группы «чистой» иммерсии.

Базальные концентрации 5 исследованных белков ( $\alpha$ 1-АТ,  $\alpha$ 1-КГП, Цер, Гп, АпоА) в основном находились в пределах референтных интервалов, указанных изготовителями наборов реактивов, исключение составили единичные случаи сниженных базальных концентраций церулоплазмينا и  $\alpha$ 1-антитрипсина (табл. 1). Низкие значения концентрации  $\alpha$ 2-М, отмеченные в фоновом периоде у 5 из 7 испытуемых, могут отражать особенности исследуемой популяции (табл. 1).

Таблица 1.

Базальные концентрации белков, мг/дл.

Белок	N	Фон. М $\pm$ $\sigma$	Референтный интервал
$\alpha$ 1-АТ	12	138,4 $\pm$ 30,1	90 – 200 (Sentinel)
$\alpha$ 1-КГП	14	78,7 $\pm$ 13,7	50 – 120 (Sentinel)
АпоА	5	167,2 $\pm$ 16,3	115 – 190 (Human)
	5	125,8 $\pm$ 15,0	94 – 178 (BioSystem)
Цер	14	22,0 $\pm$ 4,1	20 – 60 (Sentinel)
Гп	14	90,8 $\pm$ 28,5	30 – 200 (Sentinel)
$\alpha$ 2-М	7	154,1 $\pm$ 66,7	150 – 350 (Sentinel)

В табл. 2 приведены данные, позволяющие судить о динамике содержания белков в плазме крови испытуемых во время пребывания в иммерсии и после ее окончания.

Таблица 2.

Содержание белков (в % относительно фонового периода) во время иммерсии и в последствии.

Белок	ПЕРИОД ИССЛЕДОВАНИЯ					
	Фон	ИММЕРСИЯ			ПОСЛЕДСТВИЕ	
		2 сутки	4 сутки	7 сутки	+3 сутки	+7 сутки
$\alpha$ 1-АТ	100,0	111,1 $\pm$ 127,6	109,1 $\pm$ 26,5	104,8 $\pm$ 17,7	114,0 $\pm$ 7,6*	112,8 $\pm$ 14,9*
$\alpha$ 1-КГП	100,0	98,3 $\pm$ 11,8	97,1 $\pm$ 17,1	96,0 $\pm$ 16,3	112,4 $\pm$ 15,7*	115,2 $\pm$ 22,1*
АпоА	100,0	98,2 $\pm$ 6,5	90,5 $\pm$ 7,0*	88,1 $\pm$ 3,7*	89,4 $\pm$ 7,6*	94,4 $\pm$ 5,2*
Цер	100,0	106,5 $\pm$ 11,4*	104,0 $\pm$ 10,6	104,7 $\pm$ 13,6	108,1 $\pm$ 9,6*	103,7 $\pm$ 8,9
Гп	100,0	120,8 $\pm$ 22,5*	132,0 $\pm$ 36,6*	125,3 $\pm$ 27,9*	124,1 $\pm$ 22,9*	123,1 $\pm$ 27,2*
$\alpha$ 2-М	100,0	130,1 $\pm$ 18,6*	120,7 $\pm$ 22,5*	107,8 $\pm$ 20,6	97,2 $\pm$ 11,5	90,6 $\pm$ 18,0

\* достоверные отличия от фоновых значений ( $p < 0,05$ ).

Пребывание в иммерсии проявлялось в разнонаправленных сдвигах концентрации  $\alpha$ 1-антитрипсина: наряду с повышением и фазными изменениями, наблюдавшимися у большинства обследуемых, у двух испытуемых было отмечено устойчивое снижение уровня этого белка. Период последствия характеризовался возрастанием концентрации  $\alpha$ 1-антитрипсина, достигавшим уровня статистической значимости.

В динамике концентрации  $\alpha$ 1-кислого гликопротеина во время иммерсии общих тенденций также не было выявлено, а после ее окончания происходило значительное повышение значений показателя.

В течение всего периода иммерсии наблюдалось прогрессивное снижение концентрации аполипопротеина А. После прекращения воздействия изменения приобретали обратную направленность, и к +7 суткам концентрация аполипопротеина А приблизилась к исходному уровню.

Ко вторым суткам иммерсии происходило резкое увеличение концентрации гаптоглобина, повышенное содержание белка в крови сохранялось и в последующие сроки исследования.

Динамика концентрации церулоплазмينا характеризовалась двумя эпизодами повышения показателя в начальные сроки иммерсии и последствия.

У всех обследованных испытуемых на 2-4 сутки иммерсии происходило повышение концентрации  $\alpha$ 2-макроглобулина, сменившееся впоследствии снижением уровня белка.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Из полученных данных видно, что в период наблюдения, включающий стадии адаптации к иммерсии и реадaptации к обычному образу жизни, изменения содержания в крови были отмечены для всех исследованных белков. При этом профили изменений были различными. В динамике концентрации церулоплазмينا отчетливо проявилась активация синтеза как в период иммерсии, так и в последствии. Статистически достоверное повышение концентрации  $\alpha$ 1-антитрипсина было выявлено только после окончания иммерсии, хотя у части испытуемых также наблюдалось двухфазное повышение уровня белка в крови. Повышенная по сравнению с фоновым уровнем концентрация Гп сохранялась на протяжении иммерсии и в начальные сроки периода восстановления. Однократное повышение концентрации зарегистрировано для  $\alpha$ 2-макроглобулина и  $\alpha$ 1-кислого гликопротеина ( $\alpha$ 2-М – во время иммерсии,  $\alpha$ 1-КГП – в период восстановления). Также однофазной, но противоположно направленной была реакция аполипопротеина А (период иммерсии характеризовался снижением содержания белка).

Исследованные белки являются представителями белков острой фазы, причем  $\alpha$ 1-антитрипсин,  $\alpha$ 1-кислый гликопротеин и аполипопротеин А относятся к электрофоретической фракции  $\alpha$ 1-глобулинов, а гаптоглобин и  $\alpha$ 2-макроглобулин – фракции  $\alpha$ 2-глобулинов. Церулоплазмин по электрофоретической подвижности занимает промежуточное положение между двумя  $\alpha$ -глобулиновыми фракциями. Все белки, за исключением аполипопротеина А, являются позитивными белками острой фазы, то есть развитие острофазного ответа вызывает повышение их

синтеза, в то время как уровень АпоА, «негативного» белка острой фазы, снижается. Совокупность эффектов, выявленных во время иммерсии и после ее окончания, соответствует паттерну измененной уровней белков крови, присущему реакции острой фазы, и согласуется с результатами исследований электрофоретических фракций при космических полетах и наземном моделировании факторов космического полета [1-3].

Отсутствие признаков активизации синтеза  $\alpha$ 1-КГП в условиях иммерсии можно отнести к особенностям регуляции экспрессии белков острой фазы при моделировании воздействия сниженной гравитации и безопорности. В то же время наблюдавшееся в период иммерсии изменения уровня АпоА,  $\alpha$ 1-КГП и  $\alpha$ 1-АТ позволяют объяснить случаи снижения  $\alpha$ 1-глобулиновой фракции, зарегистрированные в ранние сроки после возвращения из космических полетов [1]. Снижение уровня в крови ингибиторов протеолиза, к которым относится  $\alpha$ 1-АТ, часто происходит на начальных этапах развертывания острофазного ответа, когда увеличение продукции данной группы белков оказывается недостаточным для компенсации возросшего поступления в кровотока протеолитических ферментов, сопровождающего развитие реакции острой фазы. Молекулы белкового ингибитора, образовавшие комплексы с протеазами, удаляются клетками ретикуло-эндотелиальной системы из сосудистого русла, и содержание свободных молекул  $\alpha$ 1-АТ в крови сокращается. Для выяснения факторов, участвующих в регуляции уровня  $\alpha$ 1-КГП, требуется проведение дополнительных экспериментов. Нельзя не обращать внимания на то обстоятельство, что исследованные белки синтезируются и секретируются в кровотоке клетками печени – перенхиматозного органа, которому присуще снижение показателей гемодинамики при гравитационных воздействиях [8,9]. В настоящее время роль гемодинамических изменений печени в регуляции синтеза секреторных белков остается неизученной.

В отличие от исследований, проводимых в клинике, лишь единичные публикации затрагивают вопросы изучения признаков реакции острой фазы у здоровых обследуемых, основная их часть посвящена эффектам интенсивных физических нагрузок во время спортивных состязаний [10,11]. В некоторых экспериментах признаки реакции острой фазы наблюдали у животных, подвергнутых воздействию сильных стрессорных факторов [12]. Возможность развития острофазного ответа в ходе адаптации к измененным условиям обитания предполагает необходимость изучения биологических последствий изменений уровня белков острой фазы, выполняющих функции переносчиков, ингибиторов протеолиза, участвующих в процессах гемостаза и фибринолиза, регуляции активности системы комплемента. Исследование механизмов реакции острой фазы в перспективе может найти применение в медицинском обеспечении лиц, подвергающихся воздействию неблагоприятных факторов среды как в процессе профессиональной деятельности, так и при занятиях экстремальными видами спорта.

Работа выполнена при поддержке Российской академии наук (регистрационный номер тематики 01.2.007.08353).

Авторы выражают благодарность И.Б. Козловской, Е.С. Томиловской, Д.С. Сахарову за организацию и сотрудникам ГНЦ РФ – Института медико-биологических проблем РАН за обеспечение исследований с участием испытателей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ларина О.Н. Белковый состав плазмы крови человека и животных при космических полетах и моделировании воздействия невесомости: Автореф. дисс. на соискание уч. степени к.б.н. – М., 1992. – 28 с.
2. Ларина О.Н. //Авиакосмическая и экологическая медицина. – 1994. – Т. 28, № 2. – С. 42-47.
3. Ларина О.Н. //Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2006. – Т. 40, № 6. – С. 16-19.
4. Gruys E., Toussaint M.J., Niewold T.A., Koopmans S.J. //J. Zhejiang Univ. Sci.B. – 2005. – Vol. 6, № 11. – P.25-28.
5. Koj A. Metabolic studies of acute phase proteins// In: Pathophysiology of plasma protein metabolism-New York, London: Plenum, 1984. – P. 221-248.
6. Kushner J. The acute phase response: an overview//In:Methods in enzymology -San Diego: Academic Press, 1988. – Vol. 163. – P. 373-383.
7. Шульженко Е.Б., Виль-Вильямс И.Ф. //Космическая биология и медицина. –1976. – Т.10, № 2. – С. 82-84.
8. Arbeille P.P., Besnard S.S., Kerbeci P.P., Mohty D.M. //J. Appl. Physiol. – 2005. – Vol.99, № 5. – P. 1853-1857.
9. Атьков О.Ю., Бедненко В.С. Гипокинезия и невесомость. Клинические и физиологические аспекты. – М.:Наука.–1989. – 304 С.
10. Margeli A, Skenderi K, Tsironi M, et al. //J. Clin. Endocrinol. Metab. – 2005. – Vol. 90, № 7. – P. 3914-3918.
11. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. //Physiol. Rev. – 2000. – Vol. 80, № 3. – P. 1055-1081.
12. Deak T., Meriwether J.L., Fleschner M., Spencer R.L., et al. //Am. J. Physiol. – 1997. – Vol. 273, № 6, Pt 2. – P. R1998-R2004.

## РЕЗЮМЕ

Исследования состава белков плазмы крови у космонавтов после полетов различной продолжительности и испытателей, принявших участие в наземных модельных исследованиях, показали изменения процентного содержания электрофоретических фракций  $\alpha$ 1- и  $\alpha$ 2-глобулинов, соответствующие реакции острой фазы. Для получения прямых данных о количественных изменениях индивидуальных белков крови, синтез которых увеличивается или снижается во время реакции острой фазы (позитивные и негативные белки острой фазы), в исследовании с 7-суточной «сухой» иммерсией проведено иммунотурбидиметрическое определение концентраций индивидуальных белков, относящихся к  $\alpha$ 1- и  $\alpha$ 2-глобулинам. Отмечены достоверное повышение  $\alpha$ 2-макроглобулина во время воздействия,  $\alpha$ 1-антитрипсина и  $\alpha$ 1-кислого гликопротеина после окончания иммерсии и двухфазное повышение уровня церулоплазмينا (во время иммерсии и в периоде восстановления). Снижение аполипопротеина А в период иммерсии сменялось тенденцией к восстановлению доэкспериментальных уровней после прекращения воздействия. Высокие значения концентрации гаптоглобина, установившиеся в первые сутки пребывания в иммерсии, сохранялись на протяжении всего периода наблюдения. Полученные данные подтверждают результаты предыдущих исследований фракционного состава белков крови.

## ABSTRACT

The studies of protein composition of human plasma performed after space flights of various duration and at ground-based simulation studies, revealed changes in the percentage of  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-globulin electrophoretic fractions which can be the indicative of acute phase reaction. In order to obtain direct data on quantitative alterations of individual blood proteins which respond by decreased or accelerated synthesis during the acute phase reaction (positive and negative acute phase proteins correspondingly), the immunoturbidimetric measurements of several representatives of  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2- globulin fractions during the 7-day "dry" immersion and recovery period were performed. The increase in  $\alpha$ 2-macroglobulin concentration occurred during the immersion, and  $\alpha$ 1-antitrypsin and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein concentrations – in the post-immersion period, the profile of ceruloplasmin concentration showed two distinct peaks at both immersion and recovery stages. Apolipoprotein A values decreased throughout the immersion and the tendency to the restoration of pre-experimental levels appeared after the end of the immersion. Haptoglobin content increased drastically at the first immersion days, the elevated concentrations were registered till the end of the experiment. The results conform to the data from previous studies of fractional composition of plasma proteins.