



# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ

## ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ ФРАКЦИИ БЕЛКОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В ИССЛЕДОВАНИИ С 7-СУТОЧНОЙ СУХОЙ ИММЕРСИЕЙ

УДК 612.062

Ларина О.Н., Беккер А.М.

Учреждение Российской академии наук Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН (ГНЦ РФ – ИМБП РАН)

**АННОТАЦИЯ.** В статье приведены результаты исследования фракционного состава белков крови человека, выполненного в экспериментах с сухой иммерсией при помощи метода электрофореза в ацетатцеллюлозе. Показано, что пребывание в условиях иммерсии приводит к изменениям процентного содержания фракций, характерным для реакции острой фазы – раннего неспецифического ответа организма на неблагоприятные воздействия. Реакция острой фазы является одним из составляющих системы врожденного (неспецифического) иммунитета, и в целом развертывание острофазного ответа способствует восстановлению состояния гомеостаза. Наряду с позитивными эффектами, некоторые звенья острофазной реакции могут нести и негативный потенциал, в частности, связанный с активацией иммунокомпетентных клеток. Исследование особенностей реализации механизмов реакции острой фазы при адаптации к средовым воздействиям предполагает возможность расширения методических возможностей мониторинга и коррекции состояния организма в данных условиях.

**ВВЕДЕНИЕ.** Метод иммерсии (погружение организма в жидкость, равную по плотности удельному весу тела) применяется для наземного моделирования физиологических эффектов невесомости. Аналогично условиям микрогравитации, пребывание в иммерсии вызывает перераспределение крови в краниальном направлении, снятие весовой нагрузки и, благодаря равномерному распределению реакции опоры по поверхности тела, обеспечивает субъективное восприятие окружающей среды как безопорной. Вместе с тем модель иммерсии не позволяет устранить градиент гидростатического давления в малом круге кровообращения и обусловленного гравитацией давления отолитов на рецепторы вестибулярного аппарата [1].

В исследованиях с участием человека применяются два варианта метода сухой водной иммерсии: «пленочный» [2] и «костюмный» [3]. В первом случае поверхность тела отделена от водной среды свободно плавающей, извешенной ей водонепроницаемой пленкой, вторая модификация заключается в использовании гидрокостюма, обеспечивающего свободу перемещения обследуемого.

Электрофоретическое разделение белков плазмы крови, проведенное в эксперименте с 7-суточной пленочной иммерсией, позволило обнаружить изменения белковых фракций, сходные с наблюдаемыми после космических полетов [4]. Подтверждение выявленных эффектов требовало проведения дополнительных серий исследования, и с этой целью изменения тех же показателей были изучены

на большей выборке обследуемых, упрощающей статистический анализ получаемых данных. Экспериментальные результаты обоих экспериментов (соответственно, Иммерсии-I и Иммерсии-II) были обработаны единообразно с использованием современных версий статистических программ.

**МЕТОДИКА.** Экспериментальные исследования с сухой иммерсией выполнялись на стендовой базе ГНЦ РФ – ИМБП РАН в соответствии с программами Института. Размеры иммерсионной ванны – 2.0 м (ширина) x 3.5 м (длина) x 2.0 м (глубина) позволяли одновременно осуществлять исследование с 2 индивидуумами. Свободно плавающая водонепроницаемая ткань отделяла испытуемого от поверхности воды, температура которой поддерживалась в диапазоне температурного комфорта (33 – 34°C). Испытуемые пребывали в условиях иммерсии в течение 7 суток за исключением времени, необходимого для санитарно-гигиенических процедур и плановых обследований, проводимых вне ванны, причем при выполнении основной части таких обследований испытуемые находились в положении лежа.

В первом эксперименте (Иммерсия-I) приняло участие 4 индивидуума в возрасте от 30 до 42 лет, во втором (Иммерсия-II) – 9 индивидуумов в возрасте от 22 до 30 лет. Предварительно все испытуемые прошли медицинские обследования и получили допуск врачебно-экспертной комиссии. Обследуемые были информированы о характере экспериментальных воздействий и возможных неблагоприятных последствиях и дали письменное согласие на участие в исследовании.

Электрофоретическому анализу в ацетатцеллюлозе подвергали сыворотку венозной крови, взятой в утреннее время после 12-часового интервала в приеме пищи. В исследовании Иммерсия-1 кровь получали в фоновом периоде, на 1, 2, 4 и 7-е сутки иммерсии, 1, 3, 6 и 7-е сутки последействия. В исследовании Иммерсия-2 взятие крови производилось в фоновом периоде, на 1, 3, 16-е сутки иммерсии и 1-е сутки последействия. Ацетатцеллюлозный электрофорез и денситометрирование окрашенных белковых зон проводили на оборудовании компании Gelmap по стандартным протоколам [5]. Используемый денситометр обеспечивает автоматическое интегрирование оптической плотности каждой белковой фракции и вывод результатов в виде процентного содержания, то есть отношения количества белка, содержащегося во фракции, к общему содержанию белка в образце.

При обработке результатов использовали статистический пакет STATISTICA 7.0, тестирование различий между

выборками экспериментальных данных осуществляли с помощью параметрического *t*-критерия для зависимых переменных.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Воздействие условий иммерсии изменяло картину электрофоретического разделения белков крови испытуемых, что, в частности, отражалось на уровне альбумина. Динамика этого показателя обнаруживала отчетливую двухфазность: снижение, продолжавшееся в течение первых 2–3 суток иммерсии, в более поздние сроки сменялось сдвигами противоположной направленности. Колебания уровня альбумина у различных индивидуумов составили 1,4–6,8% от общего количества белка в разделяемой смеси.

Здесь необходимо остановиться на особенностях интерпретации экспериментальных данных, представленных в относительных единицах (в нашем случае – в виде отношения количества белка в одной из фракций к общему содержанию белка в разделяемом образце): значительное количественное превалирование альбумина над остальными фракциями даже при небольшом увеличении или снижении его уровня может приводить к кажущимся изменениям содержания глобулиновых фракций. В связи с указанным обстоятельством для анализа динамик глобулиновых фракций использовали не зависящие от изменений альбумина данные, которые были вычислены как доля белка, содержащегося в каждой из четырех глобулиновых фракций, в общем количестве глобулинов, принятом за 100%.

Реакции  $\alpha$ 1-глобулинов на первые сутки пребывания в иммерсии не были одинаковы в двух сериях исследования: в Иммерсии-I наблюдалось достоверное повышение содержания фракции, но в Иммерсии-II в этот же период преобладала тенденция к снижению. В дальнейшем в обеих сериях эксперимента наблюдались последовательно фазы снижения и роста уровня  $\alpha$ 1-глобулинов. Следует обратить внимание, что первые сутки Иммерсии-I, наряду с уже упомянутым повышением  $\alpha$ 1-глобулинов, характеризовались также скачкообразным снижением  $\beta$ -глобулинов и повышением  $\gamma$ -глобулинов (соответственно у трех и четырех индивидуумов из 4 испытуемых, принявших участие в исследовании), что могло быть следствием одновременных количественных изменений нескольких белков, принадлежащих различным электрофоретическим фракциям.

Процентное содержание  $\alpha$ 2-глобулинов в обеих сериях эксперимента с иммерсией демонстрировало отчетливое, статистически достоверное повышение, за которым следовало столь же выраженное уменьшение содержания фракции и приближение к доэкспериментальному уровню, при этом Иммерсия-II отличалась более ранним переходом от первой фазы изменений ко второй. Совмещение электрофореграмм белков крови, полученных в 1-е и 3-е сутки иммерсии, наглядно демонстрирует степень изменений фракции  $\alpha$ 2-глобулинов в условиях иммерсии.

$\beta$ -глобулины были единственной фракцией, не проявившей существенных изменений ни во время, ни после иммерсии.

Уровень фракции  $\gamma$ -глобулинов снижался, но лишь в Иммерсии-I была показана статистическая достоверность этих изменений.

Как уже отмечалось выше, данные о количестве белка, сконцентрированного в каждой из пяти электрофоретических фракций, представляют собой относительные величины. Поэтому наблюдаемые в эксперименте изменения не всегда могут служить прямым свидетельством концентрационных изменений фракций, а в большей степени отражают «перераспределение» количества белка между фракциями. В ряде случаев может формироваться характерный «рисунок» (паттерн) изменений профиля электрофоретических фракций, который может быть ассоциирован с определенным состоянием организма [6]. Совокупность

изменений, выявленных в исследованиях с иммерсией – снижение альбумина, повышение  $\alpha$ 1- и  $\alpha$ 2-глобулинов [7, 8], а также снижение  $\gamma$ -глобулинов [9, 10], весьма близко к феноменологии изменений фракционного состава белков крови при реакции острой фазы.

Реакция острой фазы – ранний неспецифический, направленный на восстановление состояния гомеостаза ответ организма на локальные или системные нарушения, в наиболее типичной форме проявляющийся при инфекциях, повреждении тканей, неопластическом росте, иммунологических расстройствах [7, 8]. Индукция реакции острой фазы предшествует по времени другим защитным механизмам, в частности, развитию ответных реакций со стороны специфического иммунитета. Сдвиги в содержании электрофоретических фракций при острофазной реакции обусловлены повышением или снижением синтеза ряда белков плазмы крови, получивших название белков острой фазы (БОФ), которые, соответственно, являются позитивными и негативными БОФ. Альбумин относится к негативным БОФ, а во фракциях  $\alpha$ 1- и  $\alpha$ 2-глобулинов количественно преобладают позитивные белки острой фазы.

Процентное содержание электрофоретической фракции альбумина – гомогенной по своему составу, содержащей единственный белок альбумин, который является негативным белком острой фазы, во время обоих исследований с иммерсией снижалось. Однако в возникновении данного эффекта возможно участие и других механизмов помимо острофазной реакции, в частности, связанных с ролью, выполняемой альбумином в регуляции коллоидно-осмотического давления крови. Так, в аналогичных исследованиях с иммерсией было продемонстрировано сокращение плазматического пула альбумина. Причиной обнаруженного явления может быть активный перенос этого белка из плазмы крови во внесосудистое пространство. Снизившееся в результате этого процесса коллоидно-осмотическое давление плазмы крови способствует выходу жидкости из кровеносных сосудов в интерстициальное пространство и, соответственно, сокращению объема внутрисосудистой жидкости, которое имеет важное значение для адаптации к иммерсии [11]. При реадaptации к нормальным условиям существования после окончания иммерсии происходит восстановление объема внутрисосудистой жидкости, которое также может осуществляться при участии механизмов активного переноса альбумина. Следует также заметить, что в условиях значительных колебаний объема внутрисосудистой жидкости использование показателей относительного (процентного) содержания белковых фракций, а не их концентраций, помогает в некоторых случаях устранять обусловленные эффектами гемоконцентрирования и гемодилюции искажения реально существующего баланса между поступлением белков в кровеносную систему и их выведением из кровотока.

Выявленная в экспериментах Иммерсия-I и -II динамика  $\alpha$ 1-глобулинов отличалась от классического острофазного ответа отсроченным началом этапа роста этого показателя. Причина такого поведения фракции может быть выяснена при прямом определении концентраций составляющих ее белков. Измерение основных позитивных ( $\alpha$ 1-антитрипсина,  $\alpha$ 1-кислого гликопротеина) и негативного (аполипопротеин А) БОФ этой фракции в исследовании с 7-суточной иммерсией (выполнялось позже экспериментов Иммерсия-I и -II) показало разнонаправленные изменения  $\alpha$ 1-антитрипсина и снижение  $\alpha$ 1-кислого гликопротеина и аполипопротеина А. После окончания иммерсии происходило устойчивое повышение всех трех белков, однако если максимальные концентрации  $\alpha$ 1-антитрипсина и  $\alpha$ 1-кислого гликопротеина значительно превысили базальные величины, то содержание аполипопротеина А в течение первых 7 дней реадaptации так и не достигло доэкспериментального уровня [12]. Отмеченные эффекты в целом являются характерными для начальных стадий развития

острофазного ответа [13], при этом наличие лаг-периода, предшествовавшего росту уровня  $\alpha$ 1-кислого гликопротеина, требует выяснения роли этого белка при адаптации к условиям моделируемой микрогравитации.

Совокупность наблюдаемых в иммерсии сдвигов фракционного состава белков крови (снижение процентного содержания альбумина, разнонаправленные изменения  $\alpha$ 1-глобулинов, повышение  $\alpha$ 2-глобулинов и снижение  $\gamma$ -глобулинов) совпадает с изменениями электрофоретических фракций, наблюдавшихся после кратковременных космических полетов [4]. Обнаруженная аналогия служит

дополнительным подтверждением наших предположений о том, что начальные этапы адаптации к условиям космического полета (а возможно, и послеполетной реадaptации) активируют механизмы реакции острой фазы.

**ВЫВОДЫ.** Результаты количественного электрофоретического анализа белковых фракций крови, выполненного в двух сериях эксперимента с иммерсией, показали хорошую воспроизводимость эффектов иммерсионного воздействия. Картина обусловленных иммерсией сдвигов была аналогична паттерну изменений фракционного состава белков крови, присущему реакции острой фазы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Генин А.М., Пестов И.Д. Микрогравитация: механизмы и модели / В кн.: Человек в космическом полете. – М.: Наука, 1997. (Космическая биология и медицина; Т. III, кн. 1) – С. 460–480.
2. Шульженко Е.Б., Виль-Вильямс И.Ф. Возможность проведения длительной водной иммерсии методом «сухого» погружения // Космическая биология и авиакосмич. медицина. – 1976. – Т. 10, № 2. – С. 82–84.
3. Генин А.М., Лакота Р.Г., Чиков Л.И., Шашков В.С. Новый вариант моделирования действия невесомости на человека // Космическая биология и авиакосмич. медицина. – 1988. – Т. 22, № 5. – С. 80–85.
4. 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.
5. Ларина О.Н., Беккер А.М., Умарходжаев Р.М. Исследование показателей воспроизводимости метода количественного электрофореза белков сыворотки крови в ацетатцеллюлозе // Технологии живых систем. – 2006. – № 5–6. – С. 20–23.
6. Putnam E.W. The plasma proteins. V. 1. – New York: Academic Press, 1960. – 420 P.
7. Sandor G. Serum proteins in health and disease. Chapman and Hall, London, 1966. – 768 P.
8. Koj A. Metabolic studies of acute-phase proteins. – In: Pathophysiology of plasma protein metabolism. Springer Hardcover, N.Y., London, 1984, P. 221–248.
9. Janet M. Fuller M.J., Keyser J. W. Serum immunoglobulins after surgical operation // Clin. Chem., 1975. - V. 21, N 6. - P. 667 – 671.
10. Seelldrayers P.A., Hoyle N. R., Thomas D. G. T. Pre- and post-operative changes in serum immunoglobulin level in neurosurgical patients // Acta Neurochirurgica, 1984. – V. 70, P. 269 – 274.
11. Гоголев К.И., Александрова Е.А., Шульженко Е.Б. Сравнительная оценка изменений в организме человека при антиорто-статической гипокинезии и иммерсии // Физиология человека. – 1980. – Т. 6, № 6. – С. 978 – 982.
12. Ларина О.Н., Беккер А.М. Влияние условий «сухой» иммерсии на содержание в крови человека  $\alpha$ -глобулиновых белков острой фазы // Вестник восстановительной медицины. – 2008. – Т. 29, № 6. – С. 29–31.
13. Kushner J. An acute phase response: an overview. In: Methods in Enzymology, V. 163, San Diego: Academic Press, 1988. – P. 373 – 383.

**Резюме.** В двух сериях эксперимента с 7-суточной сухой иммерсией, в которых приняли участие 4 испытуемых (серия I) и 9 испытуемых (серия II), проведено электрофоретическое разделение белков крови в ацетатцеллюлозе. Выполненные экспериментальные серии обнаружили сходные эффекты, производимые иммерсионным воздействием на фракционный состав белков крови: воздействие иммерсии приводило к снижению процентного содержания альбумина, разнонаправленным изменениям  $\alpha$ 1-глобулинов, повышению уровня  $\alpha$ 2-глобулинов, снижению  $\gamma$ -глобулинов. Наблюдаемая комбинация сдвигов в составе электрофоретических фракций совпала с паттерном изменений фракционного состава белков крови, характерным для реакции острой фазы. Ранее такие же эффекты были обнаружены у космонавтов после возвращения из кратковременных космических полетов. Изменения содержания электрофоретических фракций при реакции острой фазы определяются повышением или снижением синтеза ряда белков крови, входящих в группу белков острой фазы. При этом, однако, наблюдавшееся снижение уровня альбумина, известного как «негативный» белок острой фазы, могло отражать также его выход из внутрисосудистого пространства, обусловленный участием данного белка в регуляции коллоидно-осмотического давления плазмы крови.

**Ключевые слова:** человек, сухая иммерсия, электрофорез белков крови, реакция острой фазы.

**Abstract.** In two experiments with 7-day dry immersion cellulose acetate electrophoresis of blood proteins from tests subjects was carried out. 4 individuals participated in the first experimental series, and 9 - in the second. The above immersion studies produced similar effects, namely, the decrease of the percentage of albumin fraction, individual shifts in  $\alpha$ 1-globulin, elevation of  $\alpha$ 2-globulin, and the decline of  $\gamma$ -globulin. These alterations in sum correspond to the pattern intrinsic for an acute phase reaction. Earlier the same changes in electrophoretic profile were detected in the blood of cosmonauts after short-term space flights. The changes in the content of electrophoretic fractions at the acute phase response are backgrounded by the acceleration or depression of the synthesis of several protein known as an acute phase proteins (positive and negative acute phase proteins correspondingly). Albumin is a negative acute phase protein, i.e. its production at an acute phase response decreases. Nevertheless, the attenuation in its content observed in our immersion studies can be also produced by its migration from the blood to extravascular space because of its possible role in plasma volume regulation.

**Key words:** human, dry immersion, blood protein electrophoresis, acute phase reaction.

## КОНТАКТЫ

**Ларина Ольга Николаевна**, в.н.с., к.б.н. Учреждение Российской академии наук ГНЦ РФ-Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское ш., 76 а. Тел. (499) 1951573, Факс: (499) 1952253. Эл. почта post@imbp.ru.

**Беккер Анна Марковна**, лаборант-исследователь, к.б.н. Учреждение Российской академии наук ГНЦ РФ-Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Хорошевское ш., 76 а. Тел. (499) 1951573, Факс: (499) 1952253. Эл. почта post@imbp.ru.