

M Guerrero¹, M Guiu-Comadevall¹, J A Cadefau¹, J Parra¹, R Balius², A Estruch², G Rodas³, J L Bedini⁴, R Cussó¹ Fast and slow myosins as markers of muscle injury // *British Journal of Sports Medicine*.– 2008 July, 42.– V.7.- P.581-584

БЫСТРЫЙ И МЕДЛЕННЫЙ МИОЗИНЫ КАК МАРКЕРЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ МЫШЦ

ABSTRACT

Цель: диагноз мышечных повреждений, перенесенных атлетами обычно делается в соответствии с клиническими критериями, объединенными с отображением повреждения (УЗИ (ультразвук) и/или МРТ), а также на основе анализов крови с целью обнаружить присутствие неспецифических маркеров повреждения мышцы. Это исследование было предпринято, чтобы оценить повреждение быстрых и медленных мышечных волокон, используя специфические маркеры повреждения этих волокон.

Методы: Образцы крови были получены от мужчин (n=51) не занимающихся спортом и 38 спортсменов с повреждением скелетных мышц. Исследование крови (Western blood analysis) было выполнено, с целью определить быстрый и медленный миозины и уровень креатинкиназы. Скелетное повреждение мышцы было диагностировано физической экспертизой, УЗИ и МРТ, а также посредством биохимических маркеров.

Результаты: оптические тесты превосходны для того, чтобы обнаружить и подтвердить повреждение II и III степени. Однако, повреждения I степени этими методами не подтверждаются. Повреждения I степени характеризуются наличием в крови высокого уровнем быстрого миозина, немного меньшим медленного миозина и очень небольшим увеличением уровня креатинкиназы. Повреждения II и III степени характеризуются высоким уровнем как быстрого, так и медленного миозинов.

Заключение: оценка уровня быстрого и медленного миозинов в крови через 48 часов после повреждения позволяет обнаружить повреждения I степени, так как быстрый миозин – исключительный маркер скелетной мышцы. Правильный диагноз повреждения I степени может предотвратить прогрессию повреждений у атлетов, подвергающихся непрерывным тренировочным нагрузкам и соревнованиям, таким образом помогая спортивным врачам в принятии решения.

ВВЕДЕНИЕ

Мышца чувствительна к тренировочным протоколам, так как ее структура рассчитана на то, чтобы соответствовать им и адаптироваться к новым силовым нагрузкам. Однако, если целостность мышцы нарушена перегрузкой в большей или меньшей степени, происходит повреждение мышцы. Эти повреждения могут привести к неспособности к продолжению развития силы.

Использование непривычных упражнений и развитие высокого уровня силы при эксцентрических упражнениях приводит к повреждению мышцы с изменениями в ее структуре и функции. Это вызывает повреждение мембран мышечного волокна,^{1,2} разрушение миофибрилл³ и саркоплазматического ретикулула⁴. Такое вызванное упражнением повреждение мышцы активизирует каскад реакций, которые приводят к активизированному скелетному метаболизму белка мышцы. Немедленно после упражнения активизируется протеаза калпаин. Калпаин начинает метаболический оборот миофибриллярных белков, освобождая их из структуры миофиламентов⁵. Хотя калпаин не производит деградации актина и миозина, она вносит свой вклад в их выход в кровь⁶. Это позволяет обнаружить эти белки в периферийной крови после расщепления, используя оценку специфических индикаторов типа тропонина I (TnI) и тяжелых цепочек миозина (MHC).^{7,8} Sorichter et al⁹ описали особенности идеального маркера повреждения мышечного волокна. Во-первых, этот маркер должен быть специфически мышечным маркером, позволяющим диагностировать повреждение мышечных волокон. Ни один из маркеров, проанализированных этими авторами, не является специфическим для мышцы.

Обычно используемые маркеры включают: креатинкиназу, сердечно-жирную кислоту связывающую белок, миоглобин, TnI (Тропонин I) и α -актин¹⁰. Однако, в дополнение к тому, чтобы они не являются полностью специфичными для скелетной мышцы, эти маркеры достигают максимального уровня менее чем за 10 часов после повреждения и существенно уменьшаются в течение 24 часов. Большинство повреждений происходит в течение выходных дней, и проходит более 10-12 критических часов, прежде чем пациент исследован. Новые повреждения часто не сопровождаются болью, но день спустя маркеры с низкой молекулярной массой деградируют не оставляя следа в сыворотке крови. Тропонины – белки, которые являются очень специфическими маркерами повреждения мышечных волокон; они имеют низкую молекулярную массу, но восприимчивы к протеолизу, что объясняет их очень короткое время полураспада в крови¹¹.

Скелетная мышца – гетерогенная ткань, составленная из волокон I и II типов, соотношение которых зависит от типа мышцы и даже от области мышцы, в которой определялось это соотношение¹². Некоторые из сократительных белков имеют различные изоформы в зависимости от типа волокна. Один из них – миозин, который имеет тяжелую и легкую изоформы, в зависимости от того, быстрый ли тип волокна или медленный¹³.

Миозин представляет собой идеальный маркер степени повреждения, из-за его высокой молекулярной массы. Его присутствие в крови можно объяснить только повреждением мышечного волокна. Быстрый миозин характерен только для быстрых скелетных мышц, в то время как медленный миозин характеризует как скелетную, так и сердечную мышцу. Уровень медленного миозина в крови был измерен Schiaffino и Reggiani¹⁴ и достигает максимальных значений через

48 и 72 часа после повреждения.

Цель этого исследования состоит в том, чтобы оценить повреждение мышцы, используя в качестве маркеров быстрый и медленный миозины в сыворотке крови атлетов через 48 часов после повреждения. Сравнить эффективность этих маркеров по обнаружению повреждения с УЗИ и МРТ, а также биохимическими методами.

МЕТОДЫ

Материалы. Материалы, используемые в исследовании были: моноклональный антимиозин (быстрый, скелетный) клон My-32 (Sigma, Мадрид, Испания), моноклональный антимиозин (медленный, скелетный) клон NOQ7.5.4D (Sigma), агароза (Sigma), белок А (Sigma) и loading buffer Nupage LDS типовой буфер (Novex, Калифорния, США).

Исследуемые. Были изучены тридцать шесть спортсменов в возрасте 18-25 лет (атлеты, жокеи, теннисисты, футболисты, баскетболисты и спортсмены, занимающиеся пятиборьем), которые испытывали боли в мышцах и/или их повреждение. Группа контроля включала 51 мужчину не занимающихся спортом в возрасте 18-55 лет.

Повреждения мышцы были классифицированы по трем категориям согласно клиническим полученным данным: повреждения I степени (DOMS, растяжение, небольшой разрыв мышцы); повреждение II степени (повреждение мышечных волокон, средний разрыв мышцы); повреждение III степени (разрушение мышечного волокна, видимый разрыв мышцы). Два мл крови были получены от 51 исследуемого контрольной группы и от атлетов через 48 часов после того, как они почувствовали проблемы с мышцами. Сыворотка крови использовалась для измерения уровней миозина.

Обработка образца. Образцы крови были получены в трубе Vacutainer и центрифугировались в 2000g в 4°C около 10 мин. Сыворотка сохранялась при температуре -80°C без потери миозина в течение 15 дней. Белок сыворотки крови определялся Брэдфордским методом¹⁵. Миозин присутствует как маркер в крови при очень низкой концентрации по сравнению с другими белками сыворотки.

Измерение ферментативных действий

Уровень креатинкиназы оценивался посредством Technicon DAX System автоанализатора согласно методу Szasz *et al*¹⁷.

Отображение повреждения. Эхография (УЗИ) выполнялась в Центре d'Estudis d'Alt Rendiment Esportiu (CEARE) и в ультразвуковом отделе Клиники FIATC. Использовалось оборудование Toshiba Medical System Системы с многочастотным исследованием (Just-Vision в CEARE, PowerVision в FIATC). МРТ исследования были проведены в отделе МРТ Клиники Corachan, используя устройство Siemens SYMPHONY (1.5 TESS).

Оба типа сканирования дали результаты, которые увеличились в прямой

пропорции со степенью повреждения. При повреждениях I степени УЗИ обычно показывает повреждение (гемоокрашивание и дефект некоторых волокон) спустя 2-3 дня после несчастного случая, в то время как МРТ показывает мышечный отек со времени повреждения. При повреждениях II степени и УЗИ и МРТ показывают отек и повреждение волокон. При повреждениях III степени виден большой отек и дефект, связанный с гематомой мышцы. И УЗИ и МРТ показывают развитие повреждения, наблюдая, как исчезает отек и осуществляется ремонт мышечных волокон.

Статистический анализ. Сравнивались уровни каждого маркера в контрольной группе и среди спортсменов с различным уровнем повреждения посредством дисперсионного анализа (ANOVA); оценки уровня значимости $p < 0,05$ считались существенными.

РЕЗУЛЬТАТЫ

МРТ

Рис.1 показывает МРТ-изображения трех различных видов повреждения мышцы.

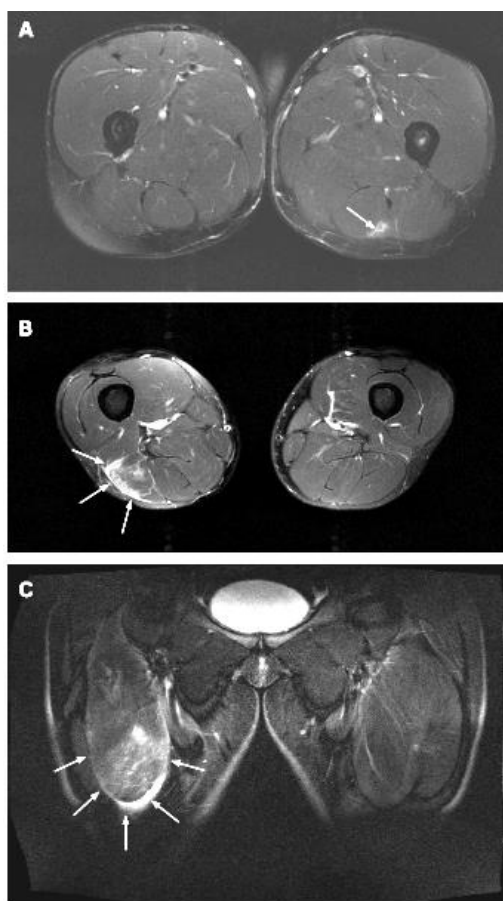


Рис.1. МРТ изображение различных степеней повреждения мышцы (А) – I степени, (В) – II степени, (С) – III степени.

Рис.1А – осевое представление повреждения I степени в верхней части правого бедра, показывая зону отека мышцы (сигнал увеличен), который вызван недавним надрывом двуглавой мышцы бедра (стрелки). Рис.1В осевое представление повреждений II степени в медиально-дистальной части левого бедра показывая область отека (увеличение сигнала) и дефект мышечных волокон, вызванный недавним повреждением в длинной голове двуглавой мышцы бедра (стрелки). В корональном представлении повреждения III степени дистальной части бедра, показанного на рис. 1С, большая область отека (увеличение сигнала) и обширный дефект мышечных волокон прямой мышцы бедра могут быть замечены в отдаленной от центра части (стрелки).

Ультразвуковые изображения

Рис. 2 показывает ультразвуковое изображение повреждений, изображенных на рис.1. Рис. 2А – продольный разрез области повреждения I степени, показывая, что область дефектов мышечных волокон находится между двуглавой мышцей бедра и полусухожильной мышцей. Продольный разрез области повреждений II степени, показанных на рис 2В указывает на самую обширную область дефектов мышечных волокон и гемоокрашивание в

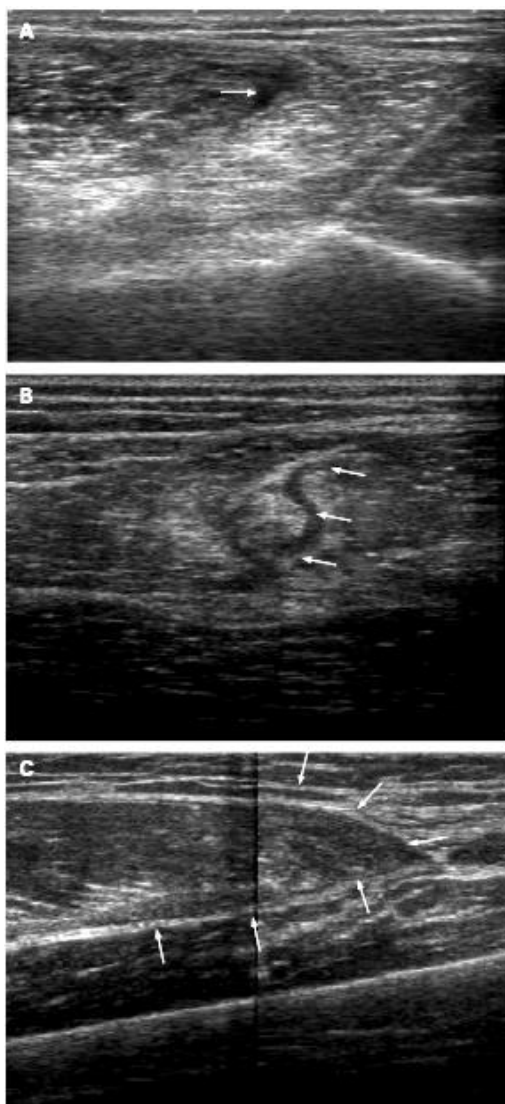


Рис. 2. Ультразвуковое изображение различных степеней повреждения мышцы (А) – I степени, (В) – II степени, (С) – III степени.

длинной головке двуглавой мышцы бедра. Ультразвуковое появление повреждений III степени, рис. 2С показывает полный дефект прямой мышцы бедра (стрелки).

Клинический диагноз, маркерные ферменты и миозин в нормальных и травмированных мышцах

Таблица 1 показывает нормальный уровень сыворотки крови у группы контроля и у атлетов с различной степенью повреждений мышцы.

Наши результаты указывают, что, в нормальном состоянии, концентрация быстрого и медленного миозинов в крови не превышала 1000 мг/мл – быстрого миозина и 2000 мг/мл – медленного миозина, показывая отношение быстрого миозина к медленному как 0,3. У пациентов с диагнозом повреждений I степени, которые не отображались на МРТ и УЗИ изображениях были отмечены высокие уровни быстрого миозина (больше чем медленного миозина), показывая отношение быстрого миозина к медленному > 2 . Уровень креатинкиназы (КК) был почти нормальным. При повреждениях II и III степени, которые были диагностированы посредством УЗИ и МРТ уровень и быстрого и медленного миозинов возрос, так что отношение концентрации быстрого миозина к медленному было близко к 1,0. Концентрация медленного миозина по сравнению с быстрым миозином увеличилась в прямой пропорции к степени повреждения. Уровень КК также увеличился в том же самом направлении

с возрастанием серьезности повреждений, что говорит о том, что он – очень хороший маркер для оценки повреждений II и III степени. Таблица 1

Диагноз	N	ультразвук (УЗИ)	МРТ	Креатинкиназа, у/л	Быстрый миозин, мг/л	Медленный миозин, мг/л	Отношение быстрого миозина к медленному
норма	51	–	–	102(8)	625(62)	1535(166)	0,3

повреждение I степени	12	(-)0(-)	–	202(22)	2880(159)	1281(197)	2,2
повреждение II степени	16	++	++	482(47)	3432(402)	3722(700)	0,9
повреждение III степени	10	+++	+++	739(245)	8055(220 0)	6518(124)	1,2

Примечание: представлены средние значения (ошибка среднего), Дисперсионный анализ свидетельствует о достоверных различиях между всеми параметрами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Человеческие мышцы представляют собой смесь медленных и быстрых волокон приблизительно с 50 % каждого типа. Этим они отличаются от животных, некоторые мышцы которых содержат 90 % быстрых волокон и приблизительно до 90 % медленных волокон. Широкая латеральная мышца молодых Кавказских атлетов в возрасте 15-18 лет имеет 36,5 % волокон медленного типа и 63,5 % волокон быстрого типа, из них 52,3 % - тип Па, 8,1 % – тип Пб и 3,1 % – тип Пс¹⁸. Существование смешанных мышц у людей означает, что при их повреждениях в кровь поступают быстрый и медленный миозины. Однако, вследствие того, что сопротивление к повреждениям и утомлению этих двух типов волокон неодинаково, уровень медленного или быстрого миозина в крови зависит от типа поврежденного волокна. Вообще, быстрые волокна более легко повреждаются и более чувствительны к повреждению. Мы можем, поэтому ожидать, что быстрые волокна теряют свои быстрые МНС раньше, чем медленные волокна при менее интенсивном упражнении. Медленные МНС выходят в кровь при более утомительных упражнениях, и их присутствие в крови, вероятно указывает на более существенное повреждение.

С другой стороны, присутствие быстрых МНС в крови свидетельствует о том, что повреждена только скелетная мышца и таким образом представляет абсолютно специфический маркер. Присутствие медленных МНС может указывать на повреждения скелетной и/или сердечной мышцы. Однако, учитывая тот факт, что исследуемые были атлетами, у которых исключено сердечное повреждение, обнаружение медленных МНС в крови являлось бы маркером повреждения медленных волокон.

Мы развили метод, для обнаружения в крови миозинов, основанного на определении быстрых и медленных антител миозина. Мы изучили группу атлетов, участвующих в различных спортивных соревнованиях, которые ощущали боль в мышцах. Пациенты подверглись медицинской экспертизе, УЗИ и МРТ. У них брались анализы крови, которые включали измерение уровня креатинкиназы (используемый как обычный маркер повреждения мышцы), а также уровней быстрого и медленного миозина. Мы также изучили 51 человека, которые не занимались спортом, составивших контрольную группу. Наши результаты указы-

вают, что, через 48 часов после возникновения проблем в мышце, уровень креатинкиназы незначительно возрастает при повреждениях I степени. Только быстрый миозин достигает высокого уровня, что позволяет предположить, что повреждения I степени происходят в волокнах II типа. Результаты УЗИ и МРТ при повреждениях I степени в некоторых случаях являются неявными, с отрицательными или положительными результатами, которые не в состоянии удостоверить полное признание повреждения. УЗИ и МРТ при повреждениях II и III степени были очень эффективны в обнаружении повреждений.

При повреждениях II степени измерение маркеров сыворотки крови показало увеличение уровня креатинкиназы а также увеличение уровней обоих типов миозина, достигая в некоторых случаях десятикратного увеличения по сравнению с нормой. Повреждения III степени хорошо детектируются креатинкиназой и обоими типами миозина.

Мы заключаем, что быстрый миозин является очень чувствительным маркером повреждений I степени. Степень диагностирования посредством быстрого миозина находится на уровне МРТ и превосходит УЗИ и клинический диагноз. Быстрый миозин – специфичный маркер повреждения скелетной мышцы, уровень которого не могут достичь маркеры, используемые в настоящее время, типа креатинкиназы и миоглобина. Миозин также имеет преимущество из того, что он более чувствительный и более устойчивый в крови. Так как его максимальный уровень достигается чрез 48 часов после повреждения, и он дольше остается в крови, поэтому может легче применяться при запаздывающем диагностировании, а также может использоваться, чтобы следить за развитием повреждения мышцы. Мы поэтому заключаем, что определение быстрых и медленных миозинов - полезная помощь в диагнозе повреждений мышцы, особенно в тех случаях, которые трудно обнаружить другими методами.

Одобрение этики: Это исследование было одобрено комитетом этики Университета Барселоны и комитета этики Клиники Больницы Провинции Барселоны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Armstrong RB, Ogilvi RW, Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1983; **436**: 735–41.
2. Newman DJ, Jones DA, Ghosh G, et al. Muscle fatigue and pain after eccentric contractions at long and short length. *Clin Sci* 1988; 74: 553–7.[Medline]
3. Friden J, Lieber RL. Structural and mechanical bases of exercise-induced muscle injury. *Med Sci Sports Exerc* 1992; 24: 521–30.[Medline]
4. Frias JA, Cadefau JA, Prats C, et al. Disturbances of the sarcoplasmic reticulum and transverse tubular system in 24-h electrostimulated skeletal muscle. *Biochem Biophys Acta* 2005; 1668: 64–74.[Medline]

5. Belcastro AN, Gilchrist JS, Scrubb JA, et al. Calcium-supported calpain degradation rates for cardiac myofibrils in diabetes. Sulfhydryl and hydrophobic interactions. *Mol Cell Biochem* 1994; 15: 51–60.
6. Goll DE, Thompson VH, Taylor RG, et al. Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *BioEssays* 1992; 14: 549–56.[CrossRef][Medline]
7. Sorichter S, Mair J, Koller A, et al. Skeletal troponin I as a marker of exercise-induced muscle damage. *J Appl Physiol* 1997; 83: 1076–82.[Abstract/Free Full Text]
8. Sorichter S, Mair J, Koller A, et al. Skeletal muscle troponin I release and magnetic resonance imaging signal intensity changes after eccentric exercise-induced skeletal muscle injury. *Clin Chim Acta* 1997; 262: 139–46.[CrossRef][Medline]
9. Sorichter S, Puschendorf B, Mair J. Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury. *Exerc Immunol Rev* 1999; 5: 5–21.[Medline]
10. Martinez A, Marchal JA, Rodriguez F, et al. Role of α -actin in muscle damage of injured athletes in comparison with traditional markers. *Br J Sports Med* 2007; 41: 442–6.[Abstract/Free Full Text]
11. Ebbeling CB, Clarkson PM. Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Med* 1989; 7: 207–34.[Medline]
12. Lexell J, Henrikson-Larsen K, Sjoström M. Distribution of different fibre types in human skeletal muscles. 2. A study of cross-sections of whole m. vastus lateralis. *Acta Physiol Scand* 1983; 117: 115–22.[Medline]
13. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 500–9.[CrossRef][Medline]
14. Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev* 1996; 76: 371–423.[Abstract/Free Full Text]
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–54.[CrossRef][Medline]
16. Hasten DL, Morris GS, Ramanadham S, et al. Isolation of human skeletal muscle myosin heavy chain and actin for measurement of fractional synthesis rates. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1998; 275: E1092–9.[Abstract/Free Full Text]
17. Szasz G, Gruber W, Bernt E. Creatine kinase in serum. Determination of optimum reaction conditions. *Clin Chem* 1976; 22: 650–6.[Abstract/Free Full Text]
18. Cadefau JA, Casademont J, Grau JM, et al. Biochemical and histochemical adaptation to sprint training in young athletes. *Acta Physiol Scand* 1990; 140: 341–51.[Medline]