

Зиновьева О.Е.¹, Самхаева Н.Д.², Вихлянцев И.М.^{3,4}, Уланова А.Д.^{3,4}, Михайлова Г.З.^{3,4}, Щеглова Н.С.², Казаков Д.О.⁵, Емельянова А.Ю.², Носовский А.М.⁶

¹Кафедра нервных болезней и нейрохирургии лечебного факультета и ²Клиника нервных болезней ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет)» Минздрава России, Москва, Россия; ³ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», Пушино, Россия; ⁴ФГБОУ ВО «Пушчинский государственный естественно-научный институт», Минобрнауки России, Пушино, Россия; ⁵Обособленное структурное подразделение «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии им. акад. Ю.Е. Вельтищева» ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия; ⁶ФГБУН «Государственный научный центр Российской Федерации Институт медико-биологических проблем РАН», Москва, Россия

^{1,2}119021, Москва, ул. Россолимо, 11, стр. 1; ³142290, Московская область, Пушино, ул. Институтская, 3;

⁴142290, Московская область, Пушино, проспект Науки, 3; ⁵117997, Москва, ул. Островитянова, 1;

⁶123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76А

Изменение содержания и уровня фосфорилирования титина и небулина в четырехглавой мышце бедра при хронической алкогольной миопатии

Цель исследования — оценка структурно-функционального состояния скелетных мышц бедра, а также изменений в содержании и уровне фосфорилирования белков саркомерного цитоскелета титина и небулина у пациентов с хронической алкогольной интоксикацией.

Пациенты и методы. Обследовано 13 пациентов с хронической алкогольной интоксикацией (4 мужчины и 9 женщин, средний возраст $38,9 \pm 9,9$ года). Средняя длительность регулярного употребления спиртных напитков — $7,6 \pm 3,7$ года. Среднее количество алкоголя, употребляемого в неделю, — $48,2 \pm 13,1$ ед. В контрольную группу вошли 10 здоровых добровольцев, сопоставимых по возрасту и полу. Неврологическое обследование проводилось по общепринятой схеме. Лабораторные исследования включали: биохимический анализ крови с исследованием уровня печеночных ферментов, креатинфосфокиназы (КФК), инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1). Всем пациентам проведена магнитно-резонансная томография (МРТ) мышц бедра с последующей оценкой степени поражения мышечной ткани и определением объема передней и задней групп мышц бедра. В образцах мышечной ткани, полученных путем открытой биопсии из латеральной головки четырехглавой мышцы бедра, определяли содержание и уровень фосфорилирования титина и небулина.

Результаты и обсуждение. У 4 (30,8%) пациентов выявлена мышечная слабость в проксимальных отделах ног, степень пареза была одинаковой в передней и задней группах мышц бедра. Определялось достоверное повышение уровня печеночных ферментов в плазме крови, уровень КФК оставался в пределах референсных значений, отмечалась тенденция к снижению содержания IGF-1. Анализ данных МРТ показал наличие жировой дегенерации мышц бедра у 7 (53,8%) пациентов. При количественной оценке установлены достоверное симметричное уменьшение объема мышц бедра передней группы и тенденция к симметричному уменьшению объема мышц бедра задней группы по сравнению с контролем. Анализ содержания титина и небулина в латеральной головке четырехглавой мышцы бедра выявил достоверное уменьшение процентного содержания небулина ($81,1\%$; $p < 0,01$) и изоформ интактного титина Т1 ($83,6\%$; $p < 0,01$). Процентное содержание протеолитических Т2-фрагментов титина в мышце пациентов достоверно не отличалось от такового в группе контроля. При оценке уровня фосфорилирования структурных мышечных белков не отмечено достоверных различий с контролем.

Заключение. Слабость передней и задней групп мышц бедра следует рассматривать в качестве основного клинического проявления хронической алкогольной миопатии (ХрАМ) при отсутствии биохимических и нейрофизиологических маркеров заболевания. МРТ мышц нижних конечностей, позволяющая выявить уменьшение объема мышц в сочетании с жировой дегенерацией, относится к информативным неинвазивным методам диагностики ХрАМ. В патогенезе атрофического процесса скелетных мышц при хронической алкогольной интоксикации задействованы структурные белки саркомера — титин и небулин, регулирующие взаимодействие основных сократительных белков — актина и миозина — и мышечное сокращение в целом.

Ключевые слова: хроническая алкогольная миопатия; инсулиноподобный фактор роста-1; магнитно-резонансная томография скелетных мышц бедра; изоформы титина; небулин.

Контакты: Нюдя Дорджиевна Самхаева; samkhaeva@mail.ru

Для ссылки: Зиновьева ОЕ, Самхаева НД, Вихлянцев ИМ и др. Изменение содержания и уровня фосфорилирования титина и небулина в четырехглавой мышце бедра при хронической алкогольной миопатии. 2019;11(1):21–27.

Change in the content of titin and nebulin and their phosphorylation level in the quadriceps femoris muscle in chronic alcoholic myopathy

Zinovyeva O.E.¹, Samkhaeva N.D.², Vikhlyantsev I.M.^{3,4}, Ulanova A.D.^{3,4}, Mikhailova G.Z.^{3,4}, Shcheglova N.S.², Kazakov D.O.⁵, Emelyanova A.Yu.², Nosovsky A.M.⁶

¹Department of Nervous System Diseases and Neurosurgery, Faculty of General Medicine and ²Clinic of Nervous System Diseases, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia; ³Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia; ⁴Pushchino State Institute of Natural Sciences,

Ministry of Education and Science of Russia, Pushchino, Russia; ⁵Separate Structural Unit «Acad. Yu.E. Veltishchev Research Clinical Institute of Pediatrics», N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia; ⁶State Research Center of the Russian Federation, Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
^{1,2}11, Rossolimo St., Build. 1, Moscow 119021; ³3, Institutskaya St., Pushchino, Moscow Region 142290; ⁴3, Prospect Nauki, Pushchino, Moscow Region 142290; ⁵1, Ostrovityanov St., Moscow 117997; ⁶76A, Khoroshevskoe Shosse, Moscow 123007

Objective: to assess the structural and functional state of skeletal muscles in the hip, as well as changes in the content of the sarcomere cytoskeleton proteins titin and nebulin and their phosphorylation level in patients with chronic alcohol intoxication.

Patients and methods. Thirteen patients (4 men and 9 women; mean age, 38.9 ± 9.9 years) with chronic alcohol intoxication were examined. The average duration of regular consumption of alcoholic beverages was 7.6 ± 3.7 years. The mean amount of alcohol consumed per week was 48.2 ± 13.1 units. A control group included 10 healthy volunteers matched for age and sex. A neurological examination was performed according to the generally accepted scheme. Laboratory tests involved blood biochemical analysis estimating the levels of liver enzymes, creatine phosphokinase (CPK), and insulin-like growth factor-1 (IGF-1). All the patients underwent hip magnetic resonance imaging (MRI), followed by assessment of the degree of muscle tissue damage and by determination of the volume of anterior and posterior thigh muscles. The content of titin and nebulin and their phosphorylation level were determined in the muscle tissue samples obtained by an open biopsy from the lateral head of the quadriceps femoris muscle.

Results and discussion. Four (30.8%) patients were found to have proximal leg muscle weakness; the degree of paresis was the same in the anterior and posterior thigh muscles. There was a significant increase in the plasma level of liver enzymes; the CPK level remained within the reference values; there was a tendency towards lower IGF-1 levels. Analysis of MRI data showed that 7 (53.8%) patients had fatty degeneration in the thigh muscles. Quantitative evaluation ascertained a significant symmetrical decrease in the volume of anterior thigh muscles and a tendency towards a symmetrical reduction in that in the posterior thigh muscle compared to the control. Analysis of the content of titin and nebulin in the lateral head of the quadriceps femoris muscle revealed a significant decrease in the percentage of nebulin (81.1%; $p < 0.01$) and intact titin-1 (T1) isoforms (83.6%; $p < 0.01$). The percentage of proteolytic titin-2 (T2) fragments in the muscle of patients did not differ significantly from that in the control group. Estimating the phosphorylation level of the structural muscle proteins showed no significant differences when compared to the control.

Conclusion. Anterior and posterior thigh muscle weakness should be considered as the main clinical manifestation of chronic alcoholic myopathy (CAM) in the absence of biochemical and neurophysiological markers of the disease. Lower extremity muscle MRI that can reveal a lower muscle volume concurrent with fatty degeneration is a non-invasive informative diagnostic technique for CAM. The pathogenesis of skeletal muscle atrophy in chronic alcohol intoxication involves the sarcomere structural proteins titin and nebulin, which regulate the interaction of the major contractile proteins actin and myosin, and whole muscle contraction.

Keywords: chronic alcoholic myopathy; insulin-like growth factor-1; magnetic resonance imaging of hip skeletal muscles; titin isoforms; nebulin.

Contact: Nyudlya Dordzhiyeva Samkhaeva; samkhaeva@mail.ru

For reference: Zinovyeva OE, Samkhaeva ND, Vikhlyantsev IM, et al. Change in the content of titin and nebulin and their phosphorylation level in the quadriceps femoris muscle in chronic alcoholic myopathy. *Nevrologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika = Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics.* 2019;11(1):21–27.

DOI: 10.14412/2074-2711-2019-1-21-27

Нервно-мышечные нарушения, к которым относятся миопатия и полиневропатия, — наиболее частые проявления алкогольной болезни, которые встречаются у 50–70% пациентов с хронической алкогольной интоксикацией. Хроническая алкогольная миопатия (ХрАМ), морфологическую основу которой составляет атрофия мышечных волокон, может наряду с алкогольной невропатией стать причиной инвалидизации. Патогенез ХрАМ до конца не изучен. Проведенные ранее исследования показали нарушения системных механизмов регуляции белкового синтеза, приводящие к атрофическому процессу в мышцах и развитию клинических проявлений миопатического синдрома в виде слабости проксимальных групп мышц конечностей [1, 2]. В литературе встречаются единичные экспериментальные исследования, посвященные изменениям основных сократительных белков скелетной мышцы на фоне хронической алкогольной интоксикации. В частности, получены данные о снижении содержания гигантских саркомерных белков титина и небулина относительно содержания тяжелых цепей миозина в мышцах задних конечностей хронически алкоголизированных крыс [3, 4]. Обсуждается участие титина и небулина в регуляции взаимодействия основных сократительных белков скелетной мышцы — актина и миозина — и мышечного сокращения в целом.

Цель исследования — оценка структурно-функционального состояния скелетных мышц бедра, а также изменений содержания и уровня фосфорилирования белков саркомерного цитоскелета титина и небулина у пациентов с хронической алкогольной интоксикацией.

Пациенты и методы. Проведено комплексное клиническое и лабораторное обследование, магнитно-резонансная томография (МРТ) скелетных мышц бедра у пациентов с хронической алкогольной интоксикацией, а также электрофоретическое исследование изменений изоформного состава и уровня фосфорилирования белков саркомерного цитоскелета титина и небулина в четырехглавой мышце бедра.

В исследовании участвовали 13 пациентов с хронической алкогольной интоксикацией (4 мужчины и 9 женщин, средний возраст $38,9 \pm 9,9$ года). Средняя длительность регулярного употребления спиртных напитков у пациентов составила $7,6 \pm 3,7$ года, среднее количество алкоголя, употребляемого в неделю, — $48,2 \pm 13,1$ ед., что, согласно критериям ВОЗ, соответствует высокому риску развития различных проявлений алкогольной болезни. В контрольную группу вошли 10 здоровых добровольцев (4 мужчины и 6 женщин), сопоставимого возраста (средний возраст $34,4 \pm 9,3$ года). Все испытуемые контрольной группы отри-

цали факт злоупотребления спиртными напитками, не имели на момент обследования острых и/или хронических заболеваний, клинических признаков поражения периферических нервов и скелетных мышц.

Неврологическое обследование проводилось по общепринятой схеме. При исследовании двигательной функции оценивали мышечный тонус, силу проксимальных и дистальных групп мышц конечностей по 6-бальной шкале. Для выявления субклинического снижения мышечной силы в ногах проводили функциональные пробы: ходьба на носках и пятках, приседания.

Лабораторные исследования включали: общий клинический анализ крови, биохимический анализ крови с исследованием уровня печеночных ферментов аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ), креатинфосфокиназы (КФК), а также оценку уровня IGF-I (соматомедин С).

Всем пациентам проведено МРТ мышц бедра. Полученные данные сравнивали с таковыми в контрольной группе (рис. 1). МРТ скелетных мышц выполняли на МР-томографе (Toshiba excelart vantagec) с напряженностью магнитного поля 1,5 Т. Протокол исследования включал сканирование в режимах обычного T1SE, время релаксации (TR) – 500 мс и в вариации режима T2 с подавлением жировой ткани – STIR (инверсия-восстановление короткими тау-волнами), время релаксации – 4000 мс в аксиальной ориентации срезов через обе конечности, толщина среза – 14 мм для мышц бедра, расстояние между срезами – 1 мм. Для интерпретации полученных данных и степени поражения мышечной ткани использовали шкалу E. Mercuri и соавт. [5], которая позволяет провести качественную оценку степени жирового замещения в каждой мышце исследуемой области (табл. 1). Выявленные дегенеративные изменения оценивали с учетом нормальной возрастной жировой дегенерации мышц [6].

Проводилась количественная оценка объема передней и задней групп мышц бедра у пациентов с ХРАМ и в группе контроля. Для измерения объема скелетной мышцы передней группы мышц бедра была выбрана латеральная головка четырехглавой мышцы, задней группы – двуглавая мышца бедра.

Объем скелетной мышцы рассчитывали по формуле Симпсона (стереометрическая формула срединного сечения) [7]:

$$V=(d/3) \times [(A_1+A_7) +4(A_2+A_4+ A_6)+2(A_3+A_5)],$$

где V – объем исследуемой мышцы; A_n – площадь поперечного сечения среза мышцы; d – ширина интервала для неправильного тела, ограниченного двумя параллельными плоскостями (рис. 2).

Площадь мышц устанавливали с помощью метода сегментирования каждой мышцы на каждом МР-срезе в программе Onis Free Edition версии 2,5.

Определение содержания титина и небулина. Образцы мышечной ткани были получены путем открытой биопсии из латеральной головки четырехглавой мышцы бедра под местной анестезией 1% раствором новокаина. Пробы хранились при температуре минус 75 °С. Для электрофоретического разделения небулина (молекулярная масса – м.м. 890 кДа), высокомолекулярных изоформ интактного титина I (T1, м.м. 3500–3700 кДа) и протеолитических фрагментов титина (T2-фрагменты, м.м. 2000–2200 кДа) в присутствии

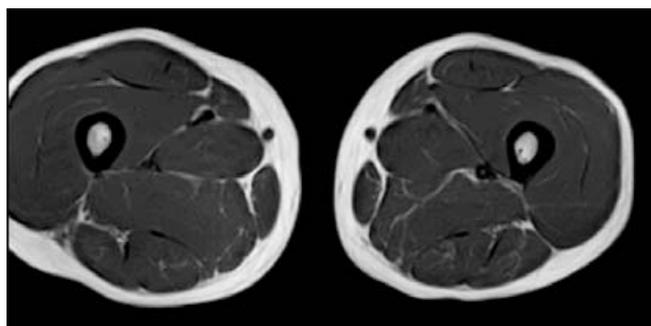


Рис. 1. МРТ мышц средней трети бедра у испытуемого контрольной группы. T1-взвешенное изображение, аксиальный срез

Таблица 1. Шкала степени дегенерации мышечной ткани, выявляемой при оценке МРТ мышц в T1-взвешенных изображениях (модификация по [5])

Балл	Степень дегенерации мышечной ткани
0	Нормальная мышечная ткань
1	Начальные проявления феномена «изъеденных молью» мышечных волокон с небольшими участками повышения МР-сигнала
2a	Поздние проявления феномена «изъеденных молью» мышечных волокон с многочисленными отдельными участками повышения МР-сигнала, начинающими сливаться, с вовлечением до 30% объема конкретной мышцы
2b	Поздние проявления феномена «изъеденных молью» мышечных волокон с многочисленными отдельными участками повышения МР-сигнала, начинающими сливаться, с вовлечением от 30 до 60% объема конкретной мышцы
3	Появления размытости и нечеткости из-за слияния не менее трех областей в одной мышце с повышением МР-сигнала
4	Последняя стадия деградации мышечной ткани; замещение ее соединительной и жировой тканью с повышенным МР-сигналом, при этом различимы кольца фасций и нервно-сосудистые пучки

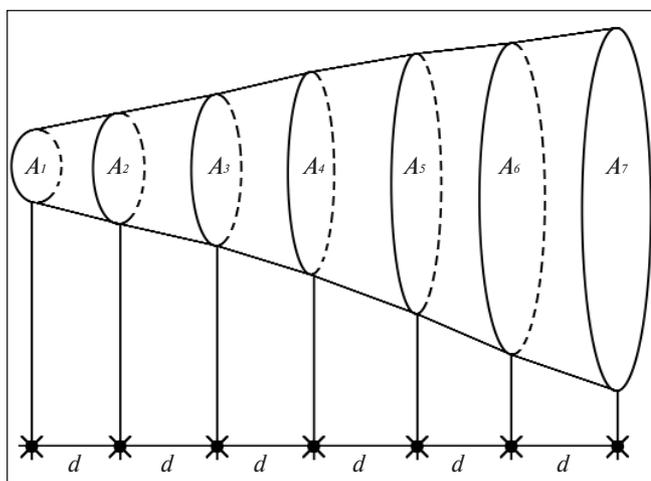


Рис. 2. Расчет объема скелетной мышцы с помощью формулы Симпсона

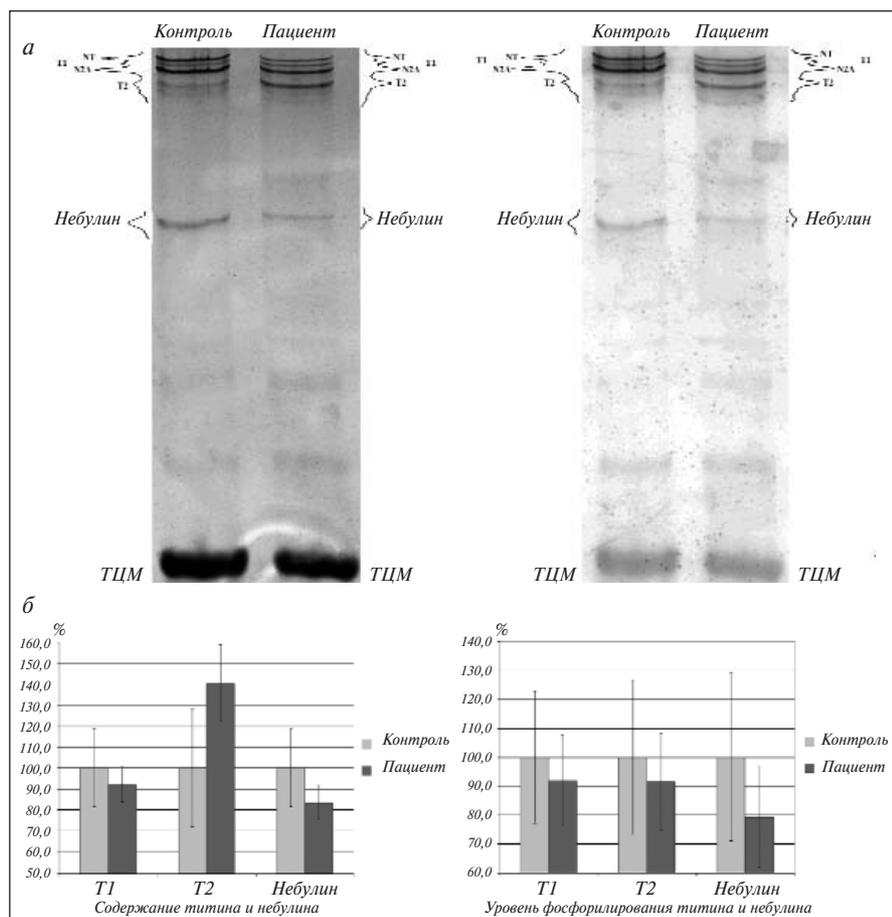


Рис. 3. Изменение содержания и фосфорилирования титина и небулина в четырехглавой мышце бедра (контроль — алкоголь). Электрофореграмма и фосфофореграмма белков (а) и диаграммы, показывающие изменения содержания и уровня фосфорилирования титина и небулина у пациента в сравнении с контролем (б).

T1 — титин 1 (NT, N2A), T2 — протеолитические фрагменты титина

додецилсульфата натрия использовали крупнопористый 2,2% полиакриламидный гель с содержанием агарозы 0,5–0,6% [8]. Гели, окрашенные Coomassie Brilliant Blue (G-250 и R-250, смешанные в соотношении 1:1), оцифровывали, а затем проводили денситометрическую обработку с помощью компьютерной программы Total Lab v1.11. Содержание титина и небулина оценивали по отношению к содержанию тяжелых цепей миозина (ТЦМ; рис. 3).

Определение уровня фосфорилирования титина и небулина. Этот анализ проводили для выявления возможного влияния данной посттрансляционной модификации на изменение чувствительности указанных белков к протеолизу. Нативный уровень фосфорилирования белков в геле оценивали с помощью флуоресцентного красителя Pro-Q Diamond (Invitrogen) для фосфопротеинов. Гели окрашивали в течение 1,5 ч флуоресцентным красителем Pro-Q Diamond (Invitrogen) и отмывали в Pro-Q Diamond destain solution. Белковые полосы, содержащие фосфат, были визуализированы с использованием системы Bio-Rad Chemi Doc Touch Imaging System. Затем гели окрашивали Coomassie Brilliant Blue G-250 и R-250, смешанными в соотношении 1:1, для контрольной оценки содержания белка (см. рис. 3).

Статистическая обработка результатов. Для анализа лабораторных и МРТ-данных использовали однофактор-

ный дисперсионный анализ, основная идея которого состоит в применении критерия Фишера для оценки различия средней межгрупповой и средней внутригрупповой дисперсий. Статистическая обработка электрофоретических данных проводилась с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. В таблицах, отражающих изменение содержания белков и уровня фосфорилирования T1 и T2, контрольные значения принимали за 100% [9].

Для получения данных описательной статистики использовали профессиональный статистический пакет Statistica 10.0 фирмы StatSoft.

Результаты. Жалобы на слабость в ногах и связанные с ней затруднения при ходьбе предъявляли 5 (38,5%) пациентов. Двое из них (15,4%) испытывали трудности при подъеме из положения сидя на корточках. 12 (92,3%) пациентов отмечали нарушения чувствительности в ногах — от легкого онемения или покалывания до интенсивной простреливающей боли. Жалобы на чувство жжения в стопах предъявляли 4 (30,8%) пациента, на пошатывание при ходьбе и нарушенное ощущение пола под ногами — 6 (46,2%).

Клиническое неврологическое обследование выявило наличие мышечной слабости в проксимальных отделах ног у 4 (30,8%) пациентов. У 3 из них слабость была оценена в 4 балла и проявлялась в затруднении при подъеме по лестнице и невозможности вставания из положения глубокого приседания, а у 1 — в 3 балла, что осложняло самостоятельное передвижение и требовало использования дополнительных средств опоры. У 3 (23,1%) пациентов при осмотре выявлялся нижний вялый дистальный паразез, степень которого оценивалась в 3 балла. Во всех случаях степень пареза была одинаково выражена в передней и задней группах мышц бедра и голени.

При исследовании сухожильных рефлексов у 7 (53,8%) пациентов отмечалось симметричное снижение или выпадение ахилловых рефлексов. Коленные рефлексы отсутствовали у 3 (23,1%) больных, еще у 3 (23,1%) они были симметрично снижены.

Чувствительные нарушения в нижних конечностях выявлены у 11 (84,6%) пациентов и проявлялись снижением болевой и температурной чувствительности, гипералгезией с элементами гиперпатии и тактильной аллодинии, снижением мышечно-суставной и вибрационной чувствительности по полиневропатическому типу. В 9 (69,2%) случаях наблюдался атактический синдром: сенситивная атаксия — у 2 (15,4%) пациентов, мозжечковая — у 5 (38,5%), атаксия смешанного характера в виде сочетания мозжечковой и сенситивной атаксии — у 2 (15,4%).

При лабораторном обследовании выявлено достоверное повышение уровня печеночных ферментов (АСТ, АЛТ и ГГТ) у пациентов с ХрАМ по сравнению с группой контроля, что может свидетельствовать о длительном токсическом воздействии этанола и продуктов его метаболизма на функцию печени (табл. 2).

Уровень КФК в плазме крови у всех пациентов оставался в пределах референсных значений, составляя в среднем $67,6 \pm 10,6$ ед/л, что достоверно не отличалось от данного показателя в группе контроля ($62,2 \pm 3,28$ ед/л). Исследование содержания инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1, или соматомедин С) выявило тенденцию к его снижению у пациентов с ХрАМ, что может свидетельствовать о нарушении белково-синтетической функции печени. Средний показатель IGF-1 у пациентов составил $169,2 \pm 26,3$ нг/мл, в группе контроля – $218,3 \pm 15,3$ нг/мл.

При МРТ мышц бедра у больных не выявлено признаков отека мышечной ткани, что позволило исключить воспалительный характер миопатии. Анализ данных МРТ показал наличие жировой дегенерации в мышцах бедра у 7 (53,8%) пациентов: в 1 случае изменения отмечались только в передней группе мышц, в 3 – только в задней группе, еще у 3 пациентов – и в передней, и в задней группах мышц (рис. 4). Степень дегенерации по шкале E. Mercuri и соавт. [5] варьировала от 1 до 2 баллов (см. табл. 1).

Количественная оценка выявила достоверное симметричное уменьшение объема мышц передней группы (латеральная головка четырехглавой мышцы бедра) у пациентов с ХрАМ по сравнению с группой контроля и тенденцию к симметричному уменьшению объема мышц задней группы (двуглавая мышца бедра; табл. 3).

Анализ содержания титина и небулина в латеральной головке четырехглавой мышцы бедра. Выявлено достоверное уменьшение процентного содержания небулина (81,1%; $p < 0,01$) и изоформ интактного Т1 (83,6%; $p < 0,01$). При этом процентное содержание протеолитических Т2-фрагментов (продуктов деградации) титина (100,3%; $p > 0,05$) в мышце пациентов достоверно не отличалось от такового в группе контроля.

При оценке уровня фосфорилирования структурных мышечных белков не отмечено достоверных различий с контролем: уровень фосфорилирования изоформ интактного Т1 составил 97,1%, продуктов деградации Т2 – 115,3%, небулина – 97,8%.

Обсуждение. При неврологическом обследовании пациентов с хронической алкогольной интоксикацией выявлены нервно-мышечные проявления алкогольной болезни. Наиболее частым осложнением была алкогольная полиневропатия (АПН), которая отмечалась у 11 (84,6%) пациентов, что несколько превышает частоту АПН, представленную в литературе, и может быть обусловлено более тяжелым стационарным контингентом больных [10]. Чувствительные

Таблица 2. Данные исследования печеночных ферментов

Фермент	Пациенты с ХрАМ (n=13)	Контрольная группа (n=10)
АСТ	$60,2 \pm 19,7^*$	$18,5 \pm 1,2$
АЛТ	$37,4 \pm 7,1^*$	$19,8 \pm 2,8$
ГГТ	$248,1 \pm 116,1^*$	$18,8 \pm 1,6$

* $p < 0,05$.

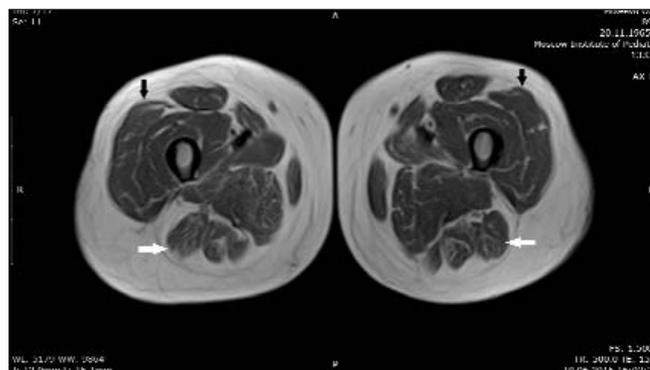


Рис. 4. МРТ мышц средней трети бедра у пациента с признаками жировой дегенерации. T1-взвешенное изображение, аксиальный срез. Черными стрелками указаны изменения в передней группе мышц (латеральная головка четырехглавой мышцы бедра – 1 балл по E. Mercuri), белыми стрелками – изменения в задней группе мышц бедра (двуглавая мышца бедра – 2 балла по E. Mercuri)

Таблица 3. Результаты оценки объема скелетных мышц бедра

Мышца	Пациенты с ХрАМ (n=13)	Контрольная группа (n=10)
Латеральная головка четырехглавой мышцы бедра, см ³ :		
справа	$336,3 \pm 54,6^*$	$491,8 \pm 107,8$
слева	$325,5 \pm 63,5^*$	$485,1 \pm 104,7$
Двуглавая мышца бедра, см ³ :		
справа	$180,3 \pm 96,1$	$261,1 \pm 103,1$
слева	$171,4 \pm 97,8$	$255,4 \pm 101,8$

* $p < 0,01$.

нарушения по полиневропатическому типу варьировали от легкого расстройства поверхностной чувствительности и парестезий до грубого снижения поверхностной и глубокой чувствительности в стопах. У 3 (23,1%) пациентов также выявлялись двигательные нарушения, характерные для дистальной симметричной полиневропатии, в виде слабости в стопах, преимущественно в разгибательной группе мышц. В 7 (53,8%) случаях отмечалось снижение или выпадение ахилловых рефлексов.

Клинические проявления миопатического синдрома в виде медленно прогрессирующей мышечной слабости в проксимальных отделах ног имелись у 4 (30,8%) пациентов. По данным литературы, ХрАМ встречается в 40–60% случаев хронической алкогольной интоксикации и характеризуется отсутствием типичного миопатического паттерна по данным игольчатой электромиографии и нормальным

уровнем КФК [11–13]. В настоящем исследовании уровень КФК не превышал референсных значений, что свидетельствует об отсутствии некроза мышечной ткани. Отмечена тенденция к снижению содержания IGF-1 в сыворотке крови, что может свидетельствовать о нарушении системных механизмов белкового синтеза у пациентов на фоне хронической алкогольной интоксикации [14].

«Золотым стандартом» диагностики ХрАМ признана биопсия мышцы бедра с последующим морфометрическим и иммуногистохимическим исследованием, позволяющим выявить признаки атрофии мышечных волокон преимущественно 2-го типа (быстрые волокна) [11, 12, 15]. Однако инвазивность морфологического метода и трудоемкость последующих исследований мышечных биоптатов ограничивают их широкое применение в клинической практике. Для диагностики ХрАМ у пациентов, злоупотребляющих алкоголем, использован информативный и неинвазивный метод МРТ: исследование выявило наличие жировой дегенерации в мышцах бедра у 7 (53,8%) пациентов. При этом изменения чаще затрагивали заднюю группу мышц, испытывающую максимальную нагрузку в вертикальном положении. В большинстве случаев степень жировой дегенерации была умеренной (1–2а стадия по шкале E. Mergu и соавт.) и лишь 1 случае достигала 2b стадии, т. е. затрагивала от 30 до 60% исследованной мышцы. Атрофические изменения были распределены симметрично и преобладали в передней группе мышц бедра. Дегенеративные изменения, а также атрофия мышц чаще выявлялись при МРТ, чем при клиническом неврологическом обследовании. Следовательно, МРТ мышц бедра позволяет выявлять раннюю доклиническую стадию ХрАМ.

Получены экспериментальные данные, свидетельствующие об изменении содержания и фосфорилирования таких структурных мышечных белков, как титин и небулин, на фоне хронической алкоголизации. Титин и небулин – гигантские белки саркомерного цитоскелета поперечно-полосатых мышц позвоночных [16]. Титин был открыт методом электрофореза двумя независимыми группами исследователей, которые обнаружили на электрофореграммах скелетных мышц кролика и цыпленка две неизвестные белковые полосы с молекулярной массой более 1000кДа. Белки оказались иммунологически идентичными и получили название титин 1 (Т1) и титин 2 (Т2), последний является протеолитическим фрагментом титина 1 [17]. В саркомерах сердечной и скелетных мышц титин – третий по количеству (после актина и миозина) белок. Показано, что титин представляет собой каркас для сборки толстых миозиновых нитей саркомера [18], участвует в поддержании сократительной функции мышцы [19], а также в регуляции актин-миозинового взаимодействия. Эластичный белок титин играет важную роль в регуляции белкового обмена в саркомере [20]. Небулин – гигантский белок, стабилизирующий актиновые нити и участвующий в регуляции актин-миозинового взаимодействия [16, 21]. Результаты экспериментальных исследований позволяют предположить, что белковый обмен в мышечных клетках инициируется протеолизом титина, небулина и других саркомерных белков с последующей деградацией их фрагментов до аминокислотных остатков [22]. Снижение содержания титина и небулина вследствие их повышенного протеолиза, наблюдаемое при развитии мышечной атрофии [17], приводит к нарушению высоко-

упорядоченной саркомерной структуры, ухудшению эластических свойств и сократительной способности мышц.

Обнаруженное нами снижение содержания титина (Т1) и небулина в четырехглавой мышце бедра у пациентов с хронической алкогольной интоксикацией, вероятно, обусловлено активизацией процессов протеолиза. Повышенная протеолитическая деградация титина и небулина может быть следствием изменения уровня фосфорилирования этих белков и увеличения их чувствительности к протеолизу. Данное предположение не лишено оснований. Прямых экспериментальных подтверждений, свидетельствующих об увеличении чувствительности титина или небулина к протеолизу вследствие изменения уровня его фосфорилирования, в литературе мы не обнаружили. Однако имеются косвенные указания на то, что увеличение степени фосфорилирования титина сопровождается повышенной протеолитической деградацией этого белка. Аналогичные изменения уровня фосфорилирования Т1 и Т2, сопровождающиеся повышенным протеолизом интактного титина, были обнаружены при развитии алкоголь-индуцированной атрофии в икроножной и камбаловидной мышцах крыс [3]. Имеются также данные, что увеличение степени фосфорилирования титина в четырехглавой мышце бедра пациентов с синдромом Элерса–Данло сопровождалось снижением содержания этого белка [23]. Высказано предположение, что гиперфосфорилирование титина, в основном Т2-части его молекулы, способствует увеличению чувствительности этого белка к протеолизу [3].

Принимая во внимание это предположение, а также результаты, свидетельствующие о снижении содержания титина и небулина в четырехглавой мышце бедра у пациентов с ХрАМ, предполагалось обнаружить гиперфосфорилирование титина и небулина. Полученные результаты не подтвердили этого предположения. При наличии тенденции к уменьшению уровня фосфорилирования Т1 и небулина достоверно значимых различий этого показателя в мышце пациентов не зарегистрировано.

Попробуем объяснить данный феномен. Известно, что в основе развития ХрАМ лежит дисбаланс между синтезом и распадом белков, вызванный хронической алкогольной интоксикацией [24, 25]. В проведенных недавно исследованиях показано, что на ранних стадиях злоупотребления алкоголем у пациентов наблюдаются изменения в регуляции анаболических и катаболических сигнальных путей, которые предшествуют развитию атрофии скелетных мышц и появлению клинических симптомов алкогольной миопатии [25]. Вполне вероятно, что при этом могло происходить гиперфосфорилирование титина (возможно, и небулина), приводящее к увеличению протеолиза и снижению содержания этого белка, что, в свою очередь, способствовало развитию атрофических изменений в мышце. На более поздних стадиях злоупотребления алкоголем направленность молекулярных процессов, влияющих на изменение уровня фосфорилирования титина и небулина, по-видимому, меняется, следствием чего является гипофосфорилирование этих белков. Снижение фосфорилирования могло привести к увеличению устойчивости титина и небулина к протеолизу и поддержанию хоть и сниженного, но относительно стабильного содержания этих белков в саркомере. В пользу этого предположения свидетельствует отсутствие увеличения содержания протеолитических

T2-фрагментов в четырехглавой мышце у пациентов, что может быть следствием замедленного протеолитического расщепления титина.

Заключение. Таким образом, ХрАМ относится к часто встречающимся, но редко диагностируемым проявлениям алкогольной болезни. Слабость мышц бедра, более выраженную в задней антигравитационной группе мышц, следует рассматривать в качестве основного клинического проявления ХрАМ при отсутствии биохимических и нейрофизио-

логических маркеров заболевания. МРТ мышц нижних конечностей позволяет выявить уменьшение объема мышц в сочетании с жировой дегенерацией и является информативным неинвазивным методом диагностики ХрАМ. В патогенезе атрофического процесса скелетных мышц при хронической алкогольной интоксикации задействованы структурные белки саркомера – титин и небулин, регулирующие взаимодействие основных сократительных белков – актина и миозина – и мышечное сокращение в целом.

ЛИТЕРАТУРА

- Lang CH, Frost RA, Deshpande N, et al. Alcohol impairs leucine-mediated phosphorylation of 4E-BP1, S6K1, eIF4G, and mTOR in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003 Dec;285(6):E1205-15. Epub 2003 Aug 26.
- Reilly ME, Eryilmaz EI, Amir A, et al. Skeletal muscle ribonuclease activities in chronically ethanol treated rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998 Jun;22(4):876-83.
- Gritsyna YV, Salmov NN, Bobylev AG, et al. Increased Autolysis of μ -Calpain in Skeletal Muscles of Chronic Alcohol-Fed Rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2017 Oct;41(10):1686-1694. doi: 10.1111/acer.13476. Epub 2017 Sep 21.
- Hunter RJ, Neagoe C, Jarvelainen HA, et al. Alcohol affects the skeletal muscle proteins, titin and nebulin in male and female rats. *J Nutr.* 2003 Apr;133(4):1154-7.
- Mercuri E, Pichiecchio A, Counsell S, et al. A short protocol for muscle MRI in children with muscular dystrophies. *Eur J Paediatr Neurol.* 2002;6(6):305-7.
- Hogrel JY, Barnouin Y, Azzabou N, et al. NMR imaging estimates of muscle volume and intramuscular fat infiltration in the thigh: variations with muscle, gender, and age. *Age (Dordr).* 2015 Jun;37(3):9798. doi: 10.1007/s11357-015-9798-5. Epub 2015 Jun 4.
- Автандилов ГГ. Медицинская морфометрия. Москва: Медицина; 1990. 379 с. [Avtandilov GG. *Meditsinskaya morfometriya* [Medical morphometry]. Moscow: Meditsina; 1990. 379 p.]
- Vikhlyantsev IM, Podlubnaya ZA. Nuances of electrophoresis study of titin/connectin. *Biophys Rev.* 2017 Jun;9(3):189-199. doi: 10.1007/s12551-017-0266-6. Epub 2017 May 29.
- Грицына ЮВ, Салмов НН, Бобылёв АГ и др. Хроническая алкогольная интоксикация не сопровождается увеличением протеолитической активности кальпаинов в сердечной мышце крыс. Биохимия. 2017;(2):280-9. [Gritsyna YuV, Salmov NN, Bobylev AG, et al. Chronic alcohol intoxication is not accompanied by an increase in the proteolytic activity of calpain in rat heart muscle. *Biokhimiya.* 2017;(2):280-9. (In Russ.)].
- Koike H, Sobue G. Alcoholic neuropathy. *Curr Opin Neurol.* 2006 Oct;19(5):481-6.
- Preedy VR, Adachi J, Ueno Y, et al. Alcoholic skeletal muscle myopathy: definitions, features, contribution of neuropathy, impact and diagnosis. *Eur J Neurol.* 2001 Nov;8(6):677-87.
- Зиновьева ОЕ, Шенкман БС. Алкогольная миопатия. Неврологический журнал. 2007;(5):4-8. [Zinov'eva OE, Shenkman BS. Alcoholic myopathy. *Nevrologicheskii zhurnal.* 2007;(5):4-8. (In Russ.)].
- Preedy VR, Ohlendieck K, Adachi J, et al. The importance of alcohol-induced muscle disease. *J Muscle Res Cell Motil.* 2003;24(1):55-63.
- Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor bindings proteins. *Endocr Rev.* 2002 Dec;23(6):824-54.
- Шенкман БС, Маслова ГА, Стогова ЮВ и др. Атрофия медленных и быстрых волокон локомоторной мышцы у больных хроническим алкоголизмом. Клинико-физиологический анализ. Технологии живых систем. 2009;(8):3-10. [Shenkman BS, Maslova GA, Stogova YuV, et al. Atrophy of slow and fast fibers of the locomotor muscle in patients with chronic alcoholism. *Clinical and physiological analysis. Tekhnologii zhivyykh sistem.* 2009;(8):3-10. (In Russ.)].
- Tskhovrebova L, Trinick J. Titin and nebulin in thick and thin filament length regulation. *Subcell Biochem.* 2017;82:285-318. doi: 10.1007/978-3-319-49674-0_10.
- Gregorio CC, Trombitas K, Centner T, et al. The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J Cell Biol.* 1998 Nov 16;143(4):1013-27.
- Horowitz R, Kempner ES, Bisher ME, Podolsky RJ. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature.* 1986 Sep 11-17;323(6084):160-4.
- Voelkel T, Linke W. Conformation-regulated mechanosensory control via titin domains in cardiac muscle. *Pflugers Arch.* 2011 Jul;462(1):143-54. doi: 10.1007/s00424-011-0938-1. Epub 2011 Feb 25.
- Wu MC, Forbes JG, Wang K. Disorder profile of nebulin encodes a vernierlike position sensor for the sliding thin and thick filaments of the skeletal muscle sarcomere. *Phys Rev E.* 2016 Jun;93(6):062406. doi: 10.1103/PhysRevE.93.062406. Epub 2016 Jun 3.
- Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci.* 2008 Apr;86(14 Suppl):E19-35. Epub 2007 Aug 20.
- Vikhlyantsev IM1, Podlubnaya ZA. New titin (connectin) isoforms and their functional role in striated muscles of mammals: facts and suppositions. *Biochemistry (Mosc).* 2012 Dec;77(13):1515-35. doi: 10.1134/S0006297912130093.
- Ottenheijm CA, Voermans NC, Hudson BD, et al. Titin-based stiffening of muscle fibers in Ehlers-Danlos Syndrome. *J Appl Physiol (1985).* 2012 Apr;112(7):1157-65. doi: 10.1152/jappphysiol.01166.2011. Epub 2012 Jan 5.
- Steiner JL, Lang CH. Dysregulation of skeletal muscle protein metabolism by alcohol. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015 May 1;308(9):E699-712. doi: 10.1152/ajpendo.00006.2015. Epub 2015 Mar 10.
- Shenkman BS, Belova SP, Zinov'yeva OE, et al. Effect of chronic alcohol abuse on anabolic and catabolic signaling pathways in human skeletal muscle. *Alcohol Clin Exp Res.* 2018 Jan;42(1):41-52. doi: 10.1111/acer.13531. Epub 2017 Nov 23.

Поступила 24.09.2018

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать. Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами.