

РОЛЬ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В ПОДДЕРЖАНИИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК M. SOLEUS КРЫС ПРИ ПАССИВНОМ РАСТЯЖЕНИИ МЫШЦЫ НА ФОНЕ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ

© М. В. Таракина,¹ О. В. Туртикова,¹ Т. Л. Немировская,¹ А. А. Коконцев,² Б. С. Шенкман^{1,*}

¹ Институт медико-биологических проблем РАН и ² Институт медицинской радиологии, Москва;
* электронный адрес: shenkman@imbp.ru

Рабочая гипертрофия мышц обычно сопряжена с активацией миосателлитов и последующей инкорпорацией их ядер в мышечные волокна. Ранее многократно показано, что растяжение мышцы на фоне гравитационной разгрузки предотвращает развитие в ней атрофических изменений и сопровождается интенсификацией синтеза белка. Мы предположили, что элиминирование пролиферативных возможностей клеток-предшественников γ -облучением приведет к частичной утрате способности мышечных волокон к поддержанию их размера. Для оценки роли клеток-предшественников в развитии профилактического эффекта пассивного растяжения был проведен эксперимент с локальным облучением голени крыс в дозе 2500 рад и последующим вывешиванием или вывешиванием с растяжением. Растяжение на фоне вывешивали полностью предотвратило атрофию, трансформацию волокон и снижение числа миоядер, наблюдаемые при вывешивании. Облучение не оказало никакого влияния на профилактический эффект пассивного растяжения. Сделан вывод о том, что профилактическое действие растяжения при вывешивании проявляется и в отсутствие делящихся миосателлитов.

Ключевые слова: скелетные мышцы, пассивное растяжение, ядерный домен, миосателлиты.

Принятые сокращения: МВ — мышечные волокна, ППС — площадь поперечного сечения, m. soleus — камбаловидная мышца.

В условиях микрогравитации в скелетной мышце наблюдаются атрофические изменения, выражающиеся в снижении площади поперечного сечения мышечных волокон (МВ) и уменьшении содержания мышечных белков (Shenkman et al., 1994; Ohira et al., 2002). Показано, что при гравитационной разгрузке понижается уровень синтеза белка и усиливается протеолиз (Goldspink et al., 1986; Thomason, Booth, 1989).

Предполагается, что атрофические процессы в определенной степени могут быть обусловлены и уменьшением числа миоядер (собственно ядер мышечных волокон) вследствие апоптоза (Ohira et al., 1992; Allen et al., 1995). Единственным источником дополнительных ядер в мышцах могут быть клетки-миосателлиты. При размножении они сливаются друг с другом и с МВ, способствуя мышечному росту (Schultz, McCormick, 1994), репарации и регенерации (Russel, 1992; Grounds, 1998).

Известно, что применение резистивной нагрузки или растяжения скелетной мышцы на фоне гравитационной разгрузки снижает или полностью предотвращает развитие в ней атрофических изменений (Riley et al., 1990; Nemirovskaya et al., 2002, и др.). Показано (Goldspink, 1977; Jaspers et al., 1988), что растяжение на фоне вывешивания (моделируемой гравитационной разгрузки) предотвращает ингибирование белкового синтеза и утилизации аминокислот в m. soleus. Известно также, что хроническое растяжение мышцы обычно сопровождается

возрастанием уровня синтеза мышечных белков (Soh et al., 2000).

Можно предположить, что этот эффект обусловлен как общей интенсификацией анаболических процессов в самих волокнах, так и делением клеток-миосателлитов и их слиянием с МВ. При гипертрофии, вызванной как функциональной перегрузкой, так и растяжением мышцы, клетки-сателлиты активно пролиферируют и сливаются с прилежащими волокнами (Darr, Schultz, 1987; Winchester et al., 1991).

Известно, что для подавления пролиферативных свойств клеток-предшественников можно использовать ионизирующее воздействие γ -радиации в дозе, при которой происходят разрывы ДНК, но, как правило, не наблюдаются видимых повреждений волокон (Adams et al., 2002).

При функциональной перегрузке облученных мышц в условиях нормальной гравитации получены противоречивые результаты. Так, в серии работ на грызунах показано, что при тенотомии мышц-синергистов не наблюдается гипертрофии m. extensor digitorum longus и увеличения числа миоядер в течение 4 нед, однако сохраняется сдвиг экспрессии генов тяжелых цепей миозина в медленную сторону (как и при обычных условиях действия этой модели перегрузки) (Rosenblatt, Parry, 1992, 1993; Rosenblatt et al., 1994). Кроме того, облучение мышц голени предотвращает компенсаторную гипертрофию m. soleus при уда-

лении мышц-синергистов в течение того же времени и практически полностью подавляет формирование новых волокон (Phelan, Gonyea, 1997). В одной из работ гипертрофии функционально нагруженного *m. plantaris* не наблюдалось в течение 3 мес после облучения (Adams et al., 2002). В то же время в эксперименте по растяжению облученных мышц крыльев японских перепелов размножение миосателлитов ингибировалось, однако гипертрофический эффект растяжения снизился незначительно (Winchester et al., 1991). Применительно к гравитационной разгрузке известно только то, что облучение приводит к неполному восстановлению мышц после атрофии, вызванной вывешиванием (Mitchell, Pavlath, 2001).

Остается непонятным, будет ли наблюдаться поддержание мышечной массы растянутой мышцы в условиях моделируемой микрогравитации при подавлении активности миосателлитов. Целью нашего эксперимента являлось выявление вклада ядер миосателлитов в поддержание размеров МВ при растяжении на фоне гравитационной разгрузки.

Материал и методика

Использованы 43 самца крыс Wistar в возрасте 2,5 мес со средней массой 270 г. Животные получали стандартный корм в соответствии с рационом для лабораторных животных и воду *ad libitum*. Все процедуры с животными проводили в соответствии с правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского национального комитета по биологической этике (Генин и др., 2001). Гравитационную разгрузку задних конечностей крыс проводили вывешиванием за хвост по методу Новикова—Ильина (Novikov, Ilyin, 1981) таким образом, чтобы задние конечности не касались пола, а передние на него опирались. Тело крыс при этом располагалось под углом 45° к полу клетки (рис. 1). При растяжении экстензоров голени обе задние конечности крыс были иммобилизованы при тыльном сгибании голеностопного сустава под углом 35° (Riley et al., 1990; Nemirovskaya et al., 2002) (рис. 2). Продолжительность экспериментов составила 14 сут.

Перед началом эксперимента животные были случайным образом поделены на 6 групп. Животные группы «Контроль» (К) в течение эксперимента находились в виварии.

Для блокирования пролиферации сателлитов мы использовали дозу в 2500 рад, применяемую в работах на грызунах и японских перепелах (Rosenblatt, Parry, 1992, 1993; Rosenblatt et al., 1994; Lowe, Alway, 1999; Mitchell, Pavlath, 2001; Adams et al., 2002). За 5 сут до начала эксперимента обе голени крыс групп «Облучение» (О), «Вывешивание и облучение» (ВО) и «Вывешивание, растяжение и облучение» (ВРО) были подвергнуты γ -облучению в дозе 2500 рад в течение 15 мин на дистанционном терапевтическом гамма-аппарате типа РОКУС-АМ (разработчик НПО «АГАТ», Москва; завод-изготовитель «Равенство», Санкт-Петербург). Источником излучения являлся радионуклид ^{60}Co . Подводимую дозу контролировали клиническим дозиметром типа Keithley-3540 (США). Перед воздействием животные были обездвижены с помощью нембуталового наркоза (20 мг на 1 кг массы тела внутривенно) и укрыты свинцовыми щитами таким образом, чтобы экспонированными по отношению к источнику, содержащему ^{60}Co , оказались только голени.

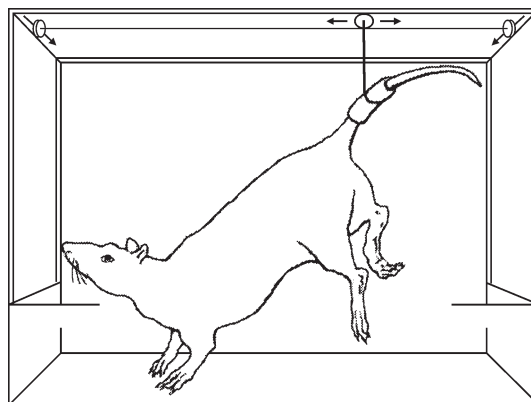


Рис. 1. Вывешивание крысы за хвост по методу Новикова—Ильина (Novikov, Ilyin, 1981).

Указанная доза радиации, согласно литературным данным (Dawn et al., 1999; Rosenblatt, Parry, 1992; Adams et al., 2002), подавляет пролиферативные способности миосателлитов, не вызывая видимых повреждений МВ. Крысы группы О все последующее время находились в виварии. Животных группы «Вывешивание» (В) и ВО вывешивали в течение 14 сут. Животных групп «Вывешивание и растяжение» (ВР) и ВРО вывешивали с иммобилизацией обеих задних конечностей.

На 15-е сут эксперимента животных забивали внутрибрюшинной инъекцией нембутала (50 мг/кг). *M. soleus* замораживали в жидком изопентане, охлажденном в жидком азоте, и хранили при -80°C . Поперечные срезы *m. soleus* толщиной 7 мкм делали в криостате Leica CM 1900 при -20°C .

Использовали следующие реактивы: моноклональные антитела мыши против быстрых и медленных изоформ тяжелых цепей миозина (ТЦМ) NCL-MHCf и NCL-MHCs, моноклональные антитела мыши против дистрофина NCL-Dys 2 (все антитела фирмы Novocastra Laboratories, Великобритания); антитела против CD56 (Becton Dickinson); поликлональные антитела козы против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с FITC, f-GAM (ИМТЕК, Россия); антитела козы против иммуноглобулинов мыши (H + L), конъюгированные с Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, США); биотинилированные антитела овцы против иммуноглобулинов мыши и конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (Amersham Biosciences, Великобритания); нормальная сыворотка козы (ИМТЕК, Россия); 4'6-диамидино-2-фенилиндол-дигидрохлорид (DAPI)

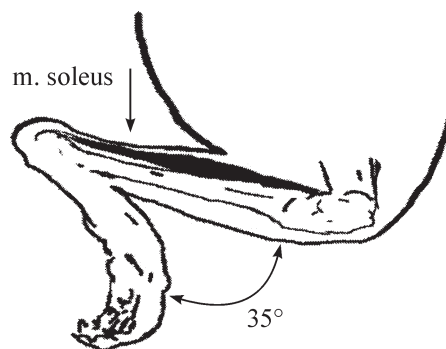


Рис. 2. Растяжение *m. soleus* крыс. Конечность фиксирована в положении тыльного сгибания.

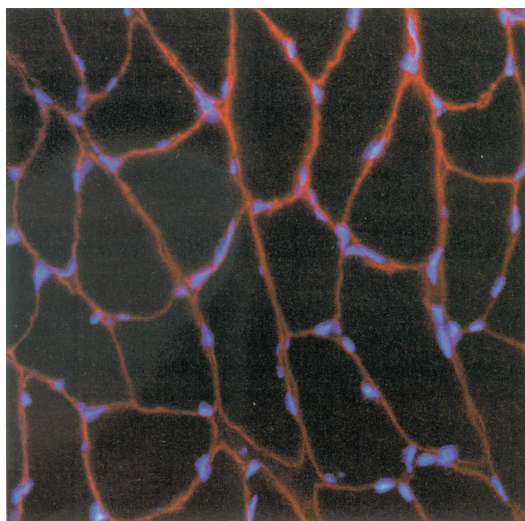


Рис. 3. Двойное мечение *m. soleus* крысы DAPI (синий цвет) и антителами к дистрофину (красный цвет).

(MP Biomedicals, США); PBS (AMRESCO, США); диаминобензидин тетрагидрохлорид (DAB) (ICN, США); гематоксилин (Sigma, США).

Замороженные мышечные срезы выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре, далее образцы 60 мин инкубировали во влажной камере при 37 °С с соответствующими первыми антителами, разведенными в PBS (1 : 30 для антител против быстрых и медленных изоформ ТЦМ, 1 : 20 для антител против дистрофина). Затем срезы промывали PBS 3 раза по 5 мин, добавляли вторые антитела, конъюгированные с FITC, и инкубировали в темноте 60 мин при комнатной температуре. При окраске образцов, меченных антителами к дистрофину, в раствор вторых антител, конъюгированных с Alexa Fluor, добавляли DAPI из расчета 2 мкг на 1 мл раствора антител. После отмывки вторых антител в PBS срезы заключали в среду, стабилизирующую флуоресцентную метку Fluoro-

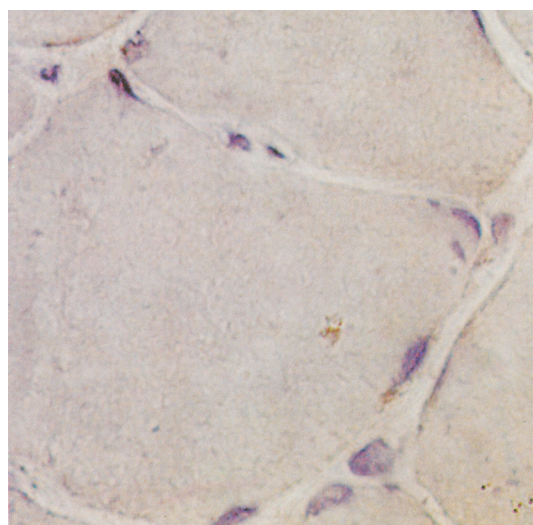


Рис. 4. Иммуногистохимическое окрашивание против CD56 (NCAM).

NCAM (стрелки) визуализируется в виде коричневой каймы по краю сателлитной клетки. Ядра окрашены в фиолетовый цвет гематоксилином.

mount-G. Полученные образцы фотографировали при 40-кратном увеличении с использованием флуоресцентного микроскопа Leica Q500MC (Германия) и цифровой камеры Leica TCM 300F; все измерения проводили на фотографиях с помощью программного обеспечения Leica. При определении площади поперечного сечения (ППС) МВ анализировали не менее 100 МВ, при измерении периметра и числа миоядер — не менее 200 МВ. Для идентификации собственных ядер МВ (миоядер) волокна контурировали антителами к субсарколеммальному белку дистрофину (Hikida et al., 1997). Все ядра, находящиеся в пределах области, ограниченной продуктами иммуногистохимической реакции, считали миоядрами (рис. 3). По этим же срезам рассчитывали среднюю величину ППС мышечных волокон.

Для выявления сателлитных клеток проводили иммунопероксидазное окрашивание против NCAM (CD56) (рис. 4) (Schubert et al., 1989; Kadi et al., 1999; Kadi et al., 2004). CD56 аналогичен антигену leu19 (neural cell adhesion molecule — NCAM), является молекулой межклеточного узнавания и экспрессируется в миообластах на ранних стадиях миогенеза и в сателлитных клетках у взрослого животного (Kadi et al., 2004). Поперечные мышечные срезы толщиной 7 мкм оттаивали, высушивали на воздухе, регидратировали в PBS в течение 20 мин и инкубировали в 2%-ной нормальной козьей сыворотке в течение 40 мин при комнатной температуре. Затем срезы инкубировали в течение 2 ч при 37 °С с первыми антителами против CD56 (Becton Dickinson) в разведении 1 : 100 в 1%-ном бычьем сывороточном альбумине, после чего промывали 3 раза по 5 мин в PBS. После этого срезы инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч в биотинилированных овечьих антителах против иммуноглобулинов мыши (в разведении 1 : 200), а затем в течение 30 мин в стрептавидине, конъюгированном с пероксидазой хрена (1 : 100) (Amersham Biosciences). После каждой инкубации срезы промывали в PBS 3 раза в течение 5 мин. Для визуализации связывания первых антител применяли DAB в PBS, содержащем 3%-ную перекись водорода. После промывания срезы окрашивали 30 с гематоксилином, после чего отмывали, обезвоживали, проводя через растворы спиртов возрастающей концентрации, и заключали в канадский бальзам. Визуализацию сателлитных клеток проводили, используя объектив 100×. Миоядра и сателлитные клетки подсчитывали в каждом волокне.

Рассчитывали число миоядер на одно МВ, среднюю величину ППС на одно миоядро и объем цитоплазмы, приходящийся на одно миоядро. Количество миоядер на длину сегмента МВ (величина X) вычисляли по формуле 1 (Schmalbruch, Hellhammer, 1977): $X = NL/(l + d)$, где X — количество миоядер на сегмент МВ, N — число миоядер в волокне на его поперечном срезе, L — длина сегмента (1 мм), l — толщина среза, d — длина миоядра, равная 13.4 мкм для *m. soleus* крысы (Hikida et al., 1997). Объем цитоплазмы, приходящийся на одно миоядро (величина Y), рассчитывали по формуле 2 (Rosser et al., 2002): $Y = (CL)/X$, где C — ППС МВ, L — длина сегмента (1 мм), X — количество миоядер на сегмент МВ. Для расчетов использовали программу Microsoft Excel, рассчитывали среднее значение и его стандартную ошибку. Облучение подвергало часть ядер деструкции, в таких случаях для определения числа миоядер, приходящихся на одно МВ, подсчитывали все миоядра, включая разрушенные.

Таблица 1

Сырая масса и площадь поперечного сечения мышечных волокон (ППС МВ) *m. soleus* крыс в разных группах после эксперимента

Показатель	Группа крыс					
	К	В	Р	О	ВО	РО
Сырая масса <i>m. soleus</i> , мг	119 ± 5	56 ± 2 ^a	122 ± 4	125 ± 4	60 ± 3 ^б	116 ± 4
ППС МВ I типа, мкм ²	2555 ± 138	1291 ± 145 ^a	3055 ± 145	2652 ± 114	1340 ± 82 ^б	2896 ± 175
ППС МВ II типа, мкм ²	1853 ± 186	1198 ± 83 ^a	1864 ± 199	2129 ± 56	1162 ± 27 ^б	1900 ± 136

Примечание. К — контроль, В — вывешивание, Р — растяжение, О — облучение, ВО — вывешивание на фоне облучения, РО — растяжение на фоне облучения. ^a Достоверные отличия от группы К. ^б Достоверные отличия от группы О ($P < 0.05$).

При статистической обработке результатов использовали одномерный вариант ANOVA и *t*-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественного анализа групп.

Результаты

Масса мышцы и размеры волокон. В результате вывешивания масса *m. soleus* снизилась более чем в 2 раза по сравнению с контролем (табл. 1). В группе с растяжением потеря массы *m. soleus*, сопровождающая гравитационную разгрузку задних конечностей, была полностью предотвращена. Между группами К, В, и ВР и аналогичными группами с облучением (О, ВО и РО) достоверных различий в массе *m. soleus* не обнаружено. Таким образом, радиационное воздействие не повлияло на протекание атрофических процессов в *m. soleus* крысы и не элиминировало профилактические свойства растяжения.

Данные морфометрических измерений *m. soleus* (табл. 1) аналогичны изменению массы мышцы: ППС МВ в группе В снизилась на 50 % для мышечных волокон медленного (I) типа и на 35 % для волокон быстрого (II) типа по сравнению с контрольной группой. Растяжение предотвратило уменьшение ППС МВ. Статистически значимых различий ППС волокон обоих типов между необлученными и аналогичными им группами с облучением не выявлено.

Миоядра и ядерный домен. Снижение на 50 % массы *m. soleus*, вызванное гравитационной разгрузкой, сопровождалось уменьшением миоядерного числа (количество миоядер на поперечный срез МВ) на 23 % (рис. 5). Растяжение мышцы на фоне вывешивания возвращало миоядерное число (см. выше) на контрольный уровень. В группе О наблюдалась тенденция к снижению миоядерного числа по сравнению с группой К, а после вывешивания и облучения миоядерное число упало на 30 % по сравнению с аналогичной необлученной группой. В группе ВО число миоядер снизилось на 50 % по сравнению с группой ВР и на 18 % по сравнению с группой ВО.

Мы проанализировали также число миоядер, приходящихся на 1 мм периметра мышечного волокна. Поскольку при гравитационной разгрузке периметр МВ уменьшается примерно на 27 % (табл. 2), число миоядер на 1 мм периметра после вывешивания не изменилось относительно контроля. В то же время наблюдалось достовер-

ное снижение данного параметра для группы с растяжением по сравнению с вывешенными животными, но не с контролем. Облучение привело к достоверному уменьшению данного отношения для групп с вывешиванием и растяжением относительно аналогичных групп, не подвергшихся радиационному воздействию.

При анализе срезов, окрашенных DAPI, оказалось, что часть ядер в препаратах групп с облучением, в первую очередь с вывешиванием и растяжением на фоне действия радиации (ВО и РО), разрушилась. Таким образом, существует некоторое повреждающее действие растяжения, выражающееся в дроблении материала части миоядер и выраженной деструкции ядер при растяжении на фоне облучения.

В результате вывешивания отношение ППС/миоядро и объем цитоплазмы на одно миоядро снизились на 36 %, растяжение же позволило поддержать значения этих параметров на уровне контрольной группы (табл. 2; рис. 6). Облучение само по себе не привнесло достоверных изменений. В то же время в группе ВО миоядерный домен достоверно увеличился на 30 % по сравнению с группой В и примерно на столько же уменьшился относительно группы О. В группе ВО миоядерный домен увеличился в 2 раза по сравнению с группой ВР и в 3 раза по сравнению с группой ВО.

Миосателлиты. Количество сателлитных клеток (положительно окрашенных против NCAM) в группе ВР увеличилось вдвое по сравнению с группой В и на 72 % превысило показатели контрольных животных. У животных группы ВО количество сателлитных клеток в

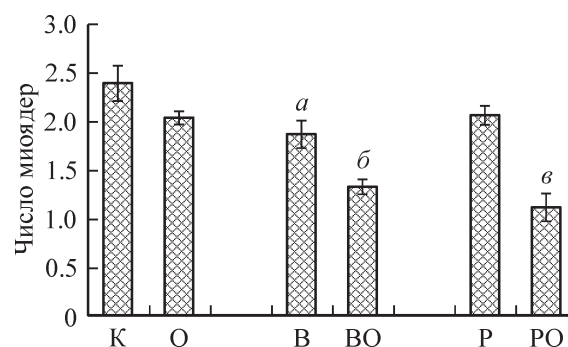


Рис. 5. Число миоядер, приходящихся на одно мышечное волокно *m. soleus*, в разных группах крыс.

О — группы, подвергшиеся γ -облучению; а—б — достоверные отличия от групп К В и Р соответственно ($P < 0.05$).

Таблица 2

**Параметры, характеризующие изменение ядерно-цитоплазматического соотношения
в m. soleus крысы**

Параметр	Группа крыс					
	К	В	Р	О	ВО	РО
ППС МВ, мкм ²	2451 ± 101	1223 ± 53 ^а	2660 ± 240	2530 ± 114	1158 ± 70 ^б	2682 ± 191
Периметр МВ, мкм	199 ± 4	1.85 ± 0.13 ^а	202 ± 8	200 ± 4	136 ± 4 ^б	204 ± 7
МЯ на 1 мм периметра	11.94 ± 0.82	12.74 ± 0.90	10.06 ± 0.44 ^в	10.02 ± 0.41	9.64 ± 0.42 ^в	5.28 ± 0.77 ^г
МЯ на 1 мм длины МВ	111 ± 9	86 ± 6 ^а	95 ± 5	94 ± 3	61 ± 3 ^в	50 ± 8 ^г
ППС на 1 МЯ	1053 ± 76	674 ± 45 ^а	1308 ± 87 ^в	1290 ± 71	887 ± 50 ^{б,в}	2737 ± 355 ^{в,д}

Примечание. ППС МВ — площадь поперечного сечения мышечных волокон, МЯ — миоядро. ^{а—д} Достоверные отличия от групп К, О, В, Р и ВО соответственно ($P < 0.05$).

2.6 раза превышало значения этого показателя у крыс группы ВО, но было на 26 % ниже, чем в соответствующей необлученной группе (ВР) (рис. 7).

Обсуждение

Известно, что пассивное растяжение постуральной m. soleus позволяет в значительной степени предотвратить развитие атрофических изменений при моделировании гравитационной разгрузки (Goldspink et al., 1986; Leterme et al., 1994). В нашем эксперименте снижение более чем на 50 % сырой массы и ППС МВ при вывешивании были полностью предотвращены пассивным растяжением m. soleus.

Среди возможных механизмов, лежащих в основе увеличения интенсивности синтеза белка при растяжении, особое внимание привлекают возможность активации покоящихся резидентных стволовых клеток (клеток-миосателлитов), их введение в пролиферативный цикл с последующим слиянием с материнским волокном и увеличением таким образом его ядерного пула. Как показано (Hill, Goldspink, 2003), эти процессы (в частности, активация пролиферации одноядерных клеток в мышеч-

ной ткани) сопровождаются развитием анаболических эффектов при растяжении интактной быстрой мышцы.

В работах ряда авторов (Allen et al., 1997; Mitchell, Pavlath, 2001), а также и в нашем эксперименте показано, что уменьшение ППС МВ при вывешивании сопровождается сокращением числа миоядер, приходящихся на 1 МВ (т. е. миоядерного числа). Снижение миоядерного числа наблюдается также и при атрофии, вызванной изоляцией поясничного отдела спинного мозга (Allen et al., 1995), пребыванием в условиях космического полета (Allen et al., 1996; Hikida et al., 1997), а также хронической денервацией (Rodrigues, Schmalbruch, 1995).

Мы показали, что при пассивном растяжении m. soleus в течение 2 нед миоядерное число поддерживается на уровне контроля. Растяжение мышцы является компонентом эксцентрической нагрузки и сопровождается синтезом IGF-1; в связи с этим интересны данные литературы о том, что ежедневные тренировки, совмещенные с введением IGF-1, значительно замедляют снижение миоядерного числа и ППС при вывешивании (Allen et al., 1997).

Использование радиации для блокирования деления миосателлитов предотвращает функциональную гипертрофию (Phelan, Gonyea, 1997). В то же время показано,

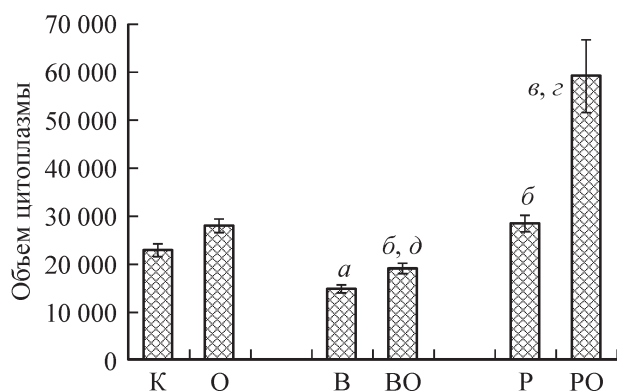


Рис. 6. Объем цитоплазмы в 1 мкм³, приходящийся на одно миоядро в мышечных волокнах m. soleus в разных группах крыс.

О — группы, подвергшиеся γ -облучению; ^{а—д} — достоверные отличия от групп К, В, Р, ВО и О соответственно ($P < 0.05$).

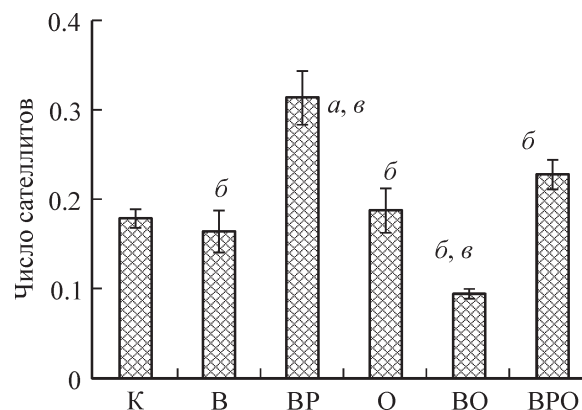


Рис. 7. Число сателлитных клеток, приходящихся на поперечный срез одного мышечного волокна m. soleus в разных группах крыс.

^{а—в} — достоверные отличия от групп К, ВР и ВРО соответственно ($P < 0.05$).

что, несмотря на активное деление клеток-сателлитов, при растяжении мышц крыльев японских перепелов гипертрофия, вызванная растяжением, развивается даже в отсутствие делящихся миосателлитов (Lowe, Alway, 1999). Наш эксперимент продемонстрировал, что облучение не препятствует поддержанию ППС МВ при хроническом растяжении на фоне вывешивания. При этом количество миоядер в группе ВРО снизилось в 2 раза по сравнению с аналогичной необлученной группой. Действие механического напряжения на фоне предварительного облучения ткани, очевидно, приводит к развитию деструктивных процессов ядерного аппарата мышечного волокна.

Таким образом, можно предположить, что для поддержания размера МВ при растяжении количество ядер не является существенным фактором. Не исключено, что в этом случае действуют иные механизмы, связанные с процессами транскрипции и трансляции. Последнее предположение основывается на полученных нами результатах по 2-кратному увеличению ядерного домена при растяжении на фоне облучения.

Концепция ядерного домена как объема цитоплазмы МВ, управляемого продуктами экспрессии генов одного миоядра, впервые введена в 1985 г., (Cheek, 1985). Несмотря на то что понятие ядерного домена довольно условно и очевидно, что экспрессия генов и распределение белков по мышечному волокну зависят от множества переменных, этим понятием удобно пользоваться при описании механизмов пластичности мышц.

Развитие мышечной гипертрофии может быть обусловлено как возрастанием числа ядерных доменов (за счет инкорпорации ядер миосателлитов), так и непосредственным увеличением размеров МВ, вызванным активизацией собственных миоядер. Экспериментальные работы, основанные на морфометрическом анализе ядерно-цитоплазматического отношения (Seiden, 1976; Kadi et al., 1999), показывают, что, скорее всего, работая, а также функциональная гипертрофия объясняется возрастанием числа ядерных доменов (при их стабильном размере), которое обеспечивается активацией миосателлитов.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что процессы, протекающие в *m. soleus* при растяжении и при развитии рабочей гипертрофии, различны. При растяжении мышцы на фоне гравитационной разгрузки размеры ядерного домена достигают контрольных значений, а поддержание размеров МВ при растяжении на фоне облучения, сопровождаемое возрастанием миоядерного домена, может быть объяснено интенсификацией процессов белкового синтеза непосредственно в МВ.

В ряде работ показано усиление пролиферативной активности сателлитных клеток при растяжении (Winchester et al., 1992; Hill, Goldspink, 2003). Мы наблюдали увеличение числа клеток, экспрессирующих NCAM (CD56) при растяжении мышцы вывешенных животных. Однако в литературе не описаны данные о связи экспрессии этой молекулы с какой-либо конкретной фазой жизненного цикла сателлитных клеток. У облученных животных при растяжении на фоне вывешивания число сателлитов, приходящихся на волокно, увеличивается по сравнению с вывешенными животными. Возможно, это объясняется тем, что небольшая их часть после облучения способна завершить митоз. Эти клетки могут либо оставаться неповрежденными при облучении, либо успевают завершить процесс репарации ДНК (Mozdzjak et al., 1996). Кроме того, не исключается возможность миграции мышечных клеток-предшественников из депо (Adams, 2006). Следует отметить, что число сателлитов у

животных, вывешенных с растяжением *m. soleus* на фоне облучения, все же существенно ниже, чем у животных аналогичной необлученной группы, и не превышает значений интактного контроля.

Таким образом, нами показано, что растяжение *m. soleus* крыс на фоне гравитационной разгрузки не приводит к изменению в ней количества миоядер. Облучение в дозе, подавляющей пролиферативные возможности способных к делению клеток, уменьшает число сателлитов, но не снижает при этом проявления противоатрофического действия растяжения.

Работа выполнена при финансовой поддержке целевой программы ОБН РАН «Физиологические механизмы регуляции внутренней среды и организации поведения живых систем» и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00763).

Список литературы

- Генин А. М., Ильин А. Е., Капланский А. С., Касаткина Т. Б., Кузнецова К. А., Пестов И. Д., Смирнова Т. А. 2001. Биоэтические правила проведения исследований на человеке и животных в авиационной, космической и морской медицине. *Авиакосм. экол. мед.* 35 : 14—20.
- Adams G. R. 2006. Satellite cell proliferation and skeletal muscle hypertrophy. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 31 : 782—790.
- Adams G. R., Caiozzo V. J., Haddad F., Baldwin K. M. 2002. Cellular and molecular responses to increased skeletal muscle loading after irradiation. *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* 283 : 1182—1195.
- Allen D. L., Linderman J. K., Grindeland R. E., Mukku V., Edgerton V. R. 1997. Growth hormone/IGF-1 and/or resistive maintains myonuclear number in hindlimb unweighted muscles. *J. Appl. Physiol.* 83 : 1857—1861.
- Allen D. L., Monke S. R., Talmadge R. J., Roy R. R., Edgerton V. R. 1995. Plasticity of myonuclear number in hypertrophied and atrophied mammalian skeletal muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* 78 : 1969—1976.
- Allen D. L., Yasui W., Tanaka T., Ohira Y., Nagaoka S., Sekiguchi C., Hinds W. E., Roy R. R., Edgerton V. R. 1996. Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J. Appl. Physiol.* 81 : 145—152.
- Cheek D. B. 1985. The control of cell mass and replication. The DNA unit — a personal 20 year study. *Early Hum. Develop.* 12 : 211—239.
- Cox V. M., Williams P. E., Wright H., Jams R. S., Gillott K. L., Young I. S., Goldspink D. F. 2000. Growth induced by incremental static stretch in adult rabbit latissimus dorsi muscle. *Exp. Physiol.* 85 : 193—202.
- Darr K. C., Schultz E. 1987. Exercise induced satellite cell activation in growing and mature skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 63 : 1816—1821.
- Dawn A., Lowe S., Always E. 1999. Stretch-induced myogenin, MyoD, and MRF4 expression and acute hypertrophy in quail slow-tonic muscle are not dependent upon satellite cell proliferation. *Cell Tissue Res.* 296 : 531—553.
- Goldspink D. F. 1977. The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 264 : 267—282.
- Goldspink D. F., Morton A. J., Loughna P., Goldspink G. 1986. The effect of hypokinesia and hypodynamia on protein turnover and the growth of four skeletal muscles of the rat. *Pflügers Arch.* 407 : 333—340.
- Grounds M. D. 1998. Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 854 : 78—91.
- Hikida R., Nostran S., Murray J., Staron R., Gordon S., Kraemer W. 1997. Myonuclear loss in atrophied soleus muscle fibers. *Anat. Rec.* 247 : 350—354.

- Hill M., Goldspink G. 2003. Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J. Physiol.* 549 : 409—418.
- Jaspers S. R., Fagan J. M., Satarug S., Cook P. H., Tischler M. E. 1988. Effects of immobilization on rat hind limb muscles under non-weight-bearing conditions. *Muscle Nerve.* 11 : 458—466.
- Kadi F., Ericsson A., Holmner S., Butle-Browne G. S., Thornell L. E. 1999. Cellular adaptation of the trapezius muscle in strength-trained athletes. *Histochem. Cell Biol.* 111 : 189—195.
- Kadi F., Schjerling P., Andersen L., Charifi N., Madsen L., Christensen L., Andersen J. 2004. The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *J. Physiol.* 558 : 1005—1012.
- Leterme D., Cordonnier C., Mounier Y., Falempin M. 1994. Influence of chronic stretching upon rat soleus muscle during non-weight-bearing conditions *Pflügers Arch.* 429 : 274—279.
- Lowe D. A., Alway S. E. 1999. Stretch-induced myogenin, MyoD, and MRF4 expression and acute hypertrophy in quail slow-tonic muscle are not dependent upon satellite cell proliferation. *Cell Tissue Res.* 296 : 531—539.
- Mitchell P. O., Pavlath G. K. 2001. A muscle precursor cell-dependent pathway contributes to muscle growth after atrophy. *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* 281 : 1706—1715.
- Mozdziak P. E., Schultz E., Cassens R. G. 1996. The effect of *in vivo* and *in vitro* irradiation (25 Gy) on the subsequent *in vitro* growth of satellite cells. *Cell Tissue Res.* 283 : 203—208.
- Nemirovskaya T. L., Shenkman B. S., Muchina A., Volodkovich Y., Sayapina M., Larina O., Bratseva E. 2002. Role of afferent control in maintaining structural and metabolic characteristics of stretched soleus in rats exposed to hindlimb suspension. *J. Gravit. Physiol.* 9 : 121—122.
- Novikov V. E., Ilyin E. A. 1981. Age-related reactions of rat bones to their unloading. *Aviat. Space Environ. Med.* 52 : 551—553.
- Ohira Y., Jiang B., Roy R. R., Oganov V., Ilyina-Kakueva E., Marini J. F., Edgerton V. R. 1992. Rat soleus muscle fiber responses to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 73 : 51—57.
- Ohira Y., Yoshinaga T., Nomura T., Kawano F., Ishihara A., Nonaka I., Roy R. R., Edgerton V. R. 2002. Gravitational unloading effects on muscle fiber size, phenotype and myonuclear number. *Adv. Space Res.* 30 : 777—781.
- Ohira Y., Yoahinaga T., Yasui W., Ohara M., Tanaka T. 2000. Effects of hindlimb suspension with stretched or shortened muscle length on contractive properties of rat soleus. *J. Appl. Biomechanics.* 16 : 80—87.
- Phelan J. N., Gonyea W. J. 1997. Effect of radiation on satellite cell activity and protein expression in overloaded mammalian skeletal muscle. *Anat. Rec.* 247 : 179—188.
- Riley D. A., Slocum G. R., Bain J. L. W., Sedlak F. R., Sowa T. E., Mellender J. W. 1990. Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure and electromyography. *J. Appl. Physiol.* 69 : 58—66.
- Rodrigues A. D., Schmalbruch H. 1995. Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscles. *Anat. Rec.* 243 : 430—437.
- Rosenblatt J. D., Parry D. J. 1992. Gamma irradiation prevents compensatory hypertrophy of overloaded mouse extensor digitorum longus muscle. *J. Appl. Physiol.* Dec. 73 : 2538—2543.
- Rosenblatt J. D., Parry D. J. 1993. Adaptation of rat extensor digitorum longus muscle to gamma irradiation and overload. *Pflügers Arch.* 423 : 255—264.
- Rosenblatt J. D., Yong D., Parry D. J. 1994. Satellite cell activity is required for hypertrophy of overloaded adult rat skeletal muscle. *Muscle Nerve.* 17 : 608—613.
- Rosser B., Dean M., Bandman E. 2002. Myonuclear domain size varies along the lengths of maturing skeletal muscle fibers *Int. J. Develop. Biol.* 46 : 747—754.
- Russel B. 1992. Repair of injured skeletal muscle: a molecular approach. *Med. Sci. Sports Exerc.* 24 : 189—196.
- Schmalbruch H., Hellhammer U. 1977. The number of nuclei in adult rat muscles with special reference to satellite cells. *Anat. Rec.* 189 : 169—176.
- Schubert W., Zimmermann K., Cramer M., Starzinski-Powitz A. 1989. Lymphocyte antigen Leu-19 as a molecular marker of regeneration in human skeletal muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 86 : 307—311.
- Schultz E., McCormick K. M. 1994. Skeletal muscle satellite cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 123 : 213—257.
- Seiden D. 1976. A quantitative analysis of muscle cell changes in compensatory hypertrophy and work-induced hypertrophy. *Amer. J. Anat.* 145 : 459—468.
- Shenkman B. S., Kozlovskaya I. B., Kuznetsov S. L., Nemirovskaya T. L., Desplanches D. 1994. Plasticity of skeletal muscle fibres in space-flown primates. *J. Gravit. Physiol.* 1 : 64—66.
- Thomason D. B., Booth F. W. 1989. Influence of performance on gene expression in skeletal muscle: effects of force inactivity. *Adv. Myochem.* 2 : 79—82.
- Winchester P. K., Alway S. E., Gonyea W. J. 1991. Satellite cell activity in the stretch induced large muscle of the quail. *Amer. J. Physiol.* 260 : 206—212.

Поступила 16 IV 2007

THE CONTRIBUTION OF MUSCLE PROGENITOR CELLS TO MAINTAINING MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF UNWEIGHTED RAT SOLEUS MUSCLE DURING PASSIVE STRETCH

M. V. Tarakina,¹ O. V. Turtikova,¹ T. L. Nemirovskaya,¹ A. A. Kokontcev,² B. S. Shenkman^{1,*}

¹ Institute for Biomedical Problems RAS and ² Institute of Medical Radiology, Moscow; *e-mail: shenkman@imbpr.ru

Skeletal muscle work hypertrophy is usually connected with muscle progenitor SC (satellite cells) activation with subsequent incorporation their nuclei into myofibers. Passive stretch of unloaded muscle was earlier established to prevent atrophic processes and be accompanied by enhanced protein synthesis. We hypothesized that elimination of SC proliferation capacity by γ -irradiation would partly prevent stretched muscle fiber capability to maintain their size under condition of gravitational unloading. To assess the role of muscle progenitor (satellite) cells in development of passive stretch preventive effect SC proliferation was suppressed by local exposure to ionizing radiation (2500 Rad) and then subsequent hindlimb suspension or hindlimb suspension with concomitant passive stretch were carried out. Reduction of myofiber cross-sectional area and decrease in myonuclei number accompanying unloaded muscle atrophy were completely abolished by passive stretch both in irradiated and sham-treated animals. We concluded that satellite cells did not make essential contribution to passive stretch preventive action under condition of simulated weightlessness.

Key words: gravitational unloading, miofibers, immunohistochemistry, m. soleus, passive stretch, myonuclei, satellite cells.