

КЛЕТОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКИ И ПАССИВНОГО НАПРЯЖЕНИЯ M. SOLEUS МЫШЕЙ, ДЕФЕКТНЫХ ПО ДИСТРОФИНУ

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

¹ ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН и

² ГУ Центр биомедицинских технологий РАМН, Москва;

* электронный адрес: shenkman@imbpr.ru

Существует предположение о том, что в передаче сигнала, отражающего механическое состояние скелетной мышцы (механотрансдукции), участвует дистрофин — субсарколеммальный белок, соединяющий цитоскелет мышечного волокна (МВ) с экстрацеллюлярными структурами. Недавние работы свидетельствуют о возможной сигнальной роли дистрофина в предотвращении активации протеолитических процессов, сопровождающих развитие атрофии МВ, и в реализации анаболического эффекта пассивного растяжения мышцы. Для оценки роли дистрофина в развитии указанных процессов был проведен эксперимент по вывешиванию с растяжением и без него 2-месячных мышей линии C57 black и mdx (МВ последних лишены дистрофинового слоя). Растяжение привело к частичному предотвращению атрофии МВ обоих типов у мышей обеих линий. В результате вывешивания пролиферативная активность в m. soleus снижается и резко увеличивается при пассивном растяжении мышцы. Мы не обнаружили взаимосвязи между нарушенным синтезом дистрофина и пролиферативной активностью сателлитных клеток при вывешивании и вывешивании с растяжением. Таким образом, нарушенный синтез дистрофина в определенной степени замедляет атрофию медленных МВ и практически не влияет на проявление профилактического действия растяжения.

Ключевые слова: дистрофин, мышцы линии mdx, гравитационная разгрузка, мышечные волокна, иммуногистохимия, m. soleus, пассивное растяжение, миоцита, сателлиты.

Принятые сокращения: МВ — мышечные волокна, ППС МВ — площадь поперечного сечения мышечного волокна, ТЦМ — тяжелые цепи миозина, m. soleus — камбаловидная мышца.

Дистрофин — это белок субсарколеммального цитоскелета, который, как принято считать, выполняет защитную роль, повышая устойчивость липопротеинового слоя сарколеммы к механическим альтерациям (Winder, 1997). В то же время недавние работы свидетельствуют о возможной сигнальной роли дистрофина, предотвращающего активацию протеолитических процессов в мышечной ткани при системной кахексии (Acharya et al., 2005; Glass, 2005). Кроме того, ранее было показано, что у животных с генетическим дефектом, нарушающим нормальный синтез дистрофина (мышцы линии mdx), при пассивном растяжении быстрой мышцы не наблюдается синтеза механозависимого фактора роста MGF (сплайс-варианта инсулиноподобного фактора роста IGF-1); это позволяет предположить, что дистрофин (или комплекс ассоциированных с ним белков) является сигнальным звеном, необходимым для реализации известного анаболического эффекта пассивного растяжения мышцы (Goldspink et al., 1996).

Активация протеолитических процессов в большой степени определяет и развитие атрофии мышечных волокон, преимущественно медленных постуральных мышц при функциональной разгрузке, реализуемой в условиях, имитирующих действие микрогравитации (Goldspink et al., 1986). Поэтому естественно было предположить,

что у животных, генетически дефектных по дистрофину, атрофические процессы при моделировании гравитационной разгрузки будут развиваться более интенсивно, чем у нормальных животных.

Известно, что пассивное растяжение постуральной m. soleus позволяет в значительной степени предотвратить развитие атрофических изменений при моделировании гравитационной разгрузки (Goldspink et al., 1986; Leturme et al., 1994; Немировская и др., 2003). Данные наших исследований свидетельствуют о том, что такой эффект растяжения зависит преимущественно от механизмов, локализованных в самой мышце, а не связан с работой проприоцепторов растяжения (Nemirovskaya et al., 2002). Однако клеточные механизмы антиатрофических эффектов растяжения на фоне функциональной разгрузки остаются в значительной степени неясными. Среди возможных механизмов, лежащих в основе увеличения интенсивности синтеза белка при растяжении, особое внимание привлекает 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. Эти процессы связывают с экспрессией основных сплайс-вариантов инсулиноподобного фактора роста (IGF-1Ea и MGF) (Adams et al., 1999). Как показали

Хилл и Голдспинк (Hill, Goldspink, 2003), эти процессы (в частности, активация пролиферации одноядерных клеток в мышечной ткани) сопровождают развитие анаболических эффектов при растяжении интактной быстрой мышцы. Интенсивность пролиферации и количество сателлитных клеток изменяется в отсутствие цитоскелетного белка дистрофина (Reimann et al., 2000). Данные о поведении мышечных клеток-предшественников при миодистрофии Дюшена или у мутантных мышечных mdx немногочисленны и противоречивы (Schuierer et al., 2005).

В основу настоящего исследования были положены две гипотезы, вытекающие из недавних публикаций, в которых обсуждается возможная сигнальная роль дистрофина: 1) глубина развития атрофических изменений волокон *m. soleus* при имитации гравитационной разгрузки у животных, дефектных по дистрофину, будет выше, чем у нормальных животных; 2) противоатрофический эффект пассивного растяжения в разгруженной мышце у животных, дефектных по дистрофину, будет менее выражен, чем у нормальных животных. Проверка этих гипотез и составила основное содержание настоящей работы.

Материал и методика

В эксперименте использовали 38 мышечных линий C57 Black и mdx в возрасте 8 нед, выращенных в питомнике ГНЦ РФ-ИМБП РАН и НЦБМТ РАМН «Светлые горы». Животных содержали в стандартных условиях, они получали корм в соответствии с рационом для лабораторных животных и воду *ad libitum*. Все процедуры с животными были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ-ИМБП РАН. Животные случайным образом были поделены на 6 групп.

Животные группы «Контроль C57 black — CC» ($n = 7$, $m = 26.0 \pm 1.9$ г) и группы «Контроль mdx — MC» ($n = 6$, $m = 30.3 \pm 1.5$ г) находились в виварии в стандартных условиях кормления и содержания. Животные группы «Вывешивание C57 black — CHS» ($n = 7$, $m = 22.5 \pm 0.5$ г) и группы «Вывешивание mdx — MHS» ($n = 6$, $m = 26.8 \pm 0.9$ г) находились в состоянии антиортостатического вывешивания. Животные группы «Вывешивание на фоне растяжения C57 black — CHSt» ($n = 7$, $m = 21.1 \pm 0.8$ г) и группы «Вывешивание на фоне растяжения mdx — MHSt» ($n = 6$, $m = 22.5 \pm 1.0$ г) были растянуты на фоне вывешивания.

Гравитационную разгрузку задних конечностей мышечной проводили вывешиванием за хвост по методу Ильина—Новикова таким образом, чтобы задние конечности не касались земли, а передние опирались на пол. Тело мышечной при этом располагалось под углом 45° к полу клетки. При растяжении экстензоров голени обе задние конечности мышечной были иммобилизованы при тыльном сгибании голеностопного сустава под углом 35° (Riley et al., 1990). Продолжительность эксперимента составила 20 сут. За 1 сут до завершения эксперимента животным был внутрибрюшинно введен 5'-бром-2'-дезоксигидроуридин (BrDU) в дозе 100 мг на 1 кг массы. На 21-е сут животных забивали методом цервикальной дислокации и выделяли *m. soleus* обеих задних конечностей. Пробы мышечной немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C вплоть до обработки.

Поперечные криостатные срезы мышечной ткани толщиной 7 и 10 мкм делали в криостате фирмы Leica при -20°C . При анализе образцов использовали следующие

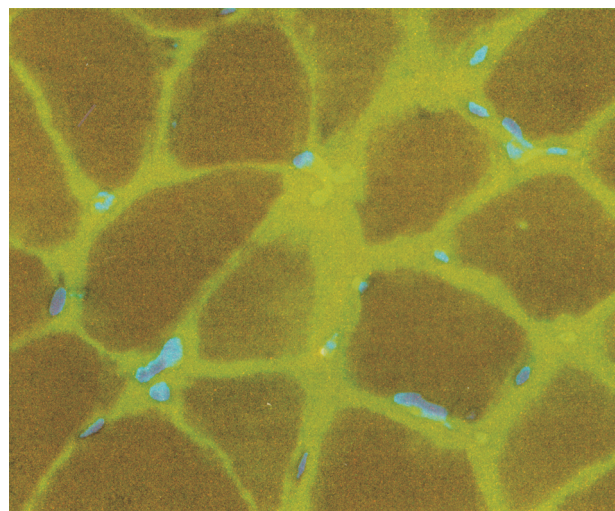


Рис. 1. Двойное мечение *m. soleus* мышечной DAPI и антителами к дистрофину.

реактивы: антитела козы против иммуноглобулинов мышечной (goat-anti-mouse IgG) (ИМТЕК, Россия); моноклональные антитела мышечной против быстрых и медленных изоформ тяжелых цепей миозина NCL-MHCf и NCL-MHCS; моноклональные антитела мышечной против дистрофина NCL-Dys2; моноклональные антитела мышечной против утrophина NCL-DRP2; моноклональные антитела козы против иммуноглобулинов мышечной, конъюгированные с FITC (ИМТЕК, Россия); биотинилированные антитела овцы против иммуноглобулинов мышечной и конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена (Amersham Biosciences, Великобритания); диаминобензидин тетрагидрохлорид (DAB; ICN, США); 4',6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид (DAPI; MP Biomedicals, США); PBS (AMRESCO, США); гематоксилин и эозин (Sigma, США).

Замороженные срезы мышечной ткани толщиной 10 мкм оттаивали и высушивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Образцы, окрашиваемые на миозины, дистрофин и утrophин, инкубировали в течение 45 мин во влажной камере при комнатной температуре с антителами козы против иммуноглобулинов мышечной (разведение 1 : 100 в PBS), после чего трижды отмывали в PBS. Срезы инкубировали в течение 60 мин во влажной камере при 37°C с соответствующими первичными антителами (разведения в PBS 1 : 30 для медленных и 1 : 40 для быстрых изоформ ТЦМ; 1 : 20 для антител против дистрофина; 1 : 2 для антител против утrophина). Затем срезы промывали в PBS 3 раза по 5 мин. Добавляли FITC-конъюгированные вторичные антитела и инкубировали в течение 60 мин в темноте при комнатной температуре. Для выявления миоядер (рис. 1) в раствор FITC-конъюгированных антител добавляли DAPI (1—2 мкг/мл). Вторичные антитела отмывали в PBS 3 раза по 5 мин, затем срезы заключали в среду, стабилизирующую флуоресцентную метку, и просматривали под флуоресцентным микроскопом.

Для выявления ядер, меченных BrDU, криостатные срезы мышечной толщиной 7 мкм немедленно фиксировали в спиртовом растворе уксусной кислоты (90 % этанола, 5 % уксусной кислоты и 5 % воды) в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего 3 раза по 5 мин про-

Таблица 1

**Масса *m. soleus* и размеры мышечных волокон
у мышей различных групп**

Группа мышей	Сырая масса <i>m. soleus</i> , мг	ППС медленных волокон, мкм ²	ППС быстрых волокон, мкм ²
CC	5.6 ± 0.2 ^a	1436.0 ± 152.4	1379 ± 117
MC	8.1 ± 0.4 ^b	1653 ± 102	1371 ± 77
CHS	3.2 ± 0.5 ^b	567 ± 66 ^b	591 ± 31 ^b
MHS	4.0 ± 0.3 ^a	740 ± 63 ^{a,b}	701 ± 63 ^a
CHSt	5.0 ± 0.6 ^b	1022.0 ± 115.3 ^{b,b}	946 ± 126 ^{b,b}
MHSt	7.4 ± 1.1 ^{г,д}	1327 ± 122 ^г	1043 ± 132 ^д

^a Достоверные отличия от группы MC. ^b То же от группы CC. ^в То же от группы CHS. ^г То же от группы MHS. ^д То же от группы CHSt ($P < 0.05$).

мывали в PBS, не допуская их пересыхания. Затем срезы инкубировали в течение 45 мин во влажной камере при комнатной температуре с антителами козы против иммуноглобулинов мыши (разведение 1 : 100 в PBS) и также трижды отмывали в PBS. После этого наносили раствор нуклеазы с мышинными моноклональными антителами против BrDU (Amersham Biosciences) и инкубировали 1 ч при 37 °С. Срезы инкубировали в течение 1 ч в биотинилированных овечьих антителах против иммуноглобулинов мыши в разведении 1 : 200, а затем в стрептавидине, конъюгированном с пероксидазой хрена в разведении 1 : 100 (Amersham Biosciences), при комнатной температуре. После каждой инкубации срезы промывали в PBS 3 раза в течение 5 мин. Затем срезы обрабатывали раствором DAB в PBS с 0.01 М имидазолом и 3%-ной перекисью водорода в течение 8 мин, обезживали, проводя через батарею спиртов возрастающей концентрации, и заключали в канадский балзам.

Для гистологического анализа срезы оттаивали, высушивали при комнатной температуре в течение 60 мин, затем окрашивали гематоксилином—эозином, обезживали в растворах спиртов возрастающей концентрации и заключали в канадский балзам.

Препараты фотографировали при 40-кратном увеличении с использованием флуоресцентного микроскопа фирмы Leica (Германия), снабженного цифровой видеокамерой Leica DC 300F. Все измерения проводили на фотографиях с помощью программного обеспечения Leica. При определении ППС MB анализировали не менее 100 MB, при измерении периметра и числа мио ядер, количества ядер с включенным BrDU — не менее 200 MB, при подсчете относительного содержания быстрых и медленных изоформ ТЦМ — не менее 500 MB.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Excel и SigmaPlot.

Результаты

Данные по сырой массе *m. soleus* мышей в контроле, после вывешивания и вывешивания с растяжением представлены в табл. 1. Масса *m. soleus* у мышей mdx в среднем выше, чем у мышей аналогичных групп cC57Bl. После вывешивания сырая масса мышцы достоверно уменьшалась на 43 % у мышей C57Bl и на 51 % у мышей mdx. Растяжение на фоне вывешивания приводит к восстановлению массы *m. soleus*. Достоверных различий по массе мышцы у контрольных животных и у животных после вывешивания с растяжением не наблюдается.

Патоморфологический анализ срезов *m. soleus* мышей линии mdx во всех группах показал в целом правильную форму MB; кроме того, наблюдалась небольшая перимитриальная инфильтрация, свидетельствующая, по всей видимости, об умеренном воспалительном процессе. В мышцах вывешенных животных (группы CHS и MHS) наблюдается разрастание соединительной ткани (рис. 2). Во всех группах мышей линии mdx были обнаружены волокна с центральными ядрами, количество которых достоверно больше, чем у мышей C57Bl соответствующих групп (рис. 3). В результате растяжения у мышей линии mdx отмечено 5-кратное возрастание числа центральных ядер по сравнению с животными соответствующей контрольной группы и группы вывешивания (рис. 2, e). Массовое появление центральных ядер наряду с большой вариабельностью размеров волокон в *m. soleus* мышей mdx при растя-

жении указывает на усугубление патологического процесса и активную регенерацию мышечных волокон.

У мышей линии C57 black в результате вывешивания ППС медленных MB (MB первого типа) снизилась на 60 %, а у мышей mdx — на 55 % по сравнению со значениями данного показателя у животных соответствующих контрольных групп (табл. 1). При этом ППС медленных MB после вывешивания в группе мышей линии mdx оказалась на 20 % выше, чем у мышей линии C57Bl. После растяжения на фоне вывешивания ППС MB первого типа у мышей C57Bl была на 45 % выше, чем в группе вывешенных животных этой линии, но все же ниже (на 29 %), чем в контрольной группе. Растяжение на фоне вывешивания предотвращает уменьшение площади медленных MB также и у мышей линии mdx (ППС медленных MB мышей группы MHSt на 44 % выше, чем медленных группы MHS), но, как и у мышей линии C57Bl, этот показатель не достигает значений, характерных для интактных животных.

После вывешивания ППС быстрых MB (MB второго типа) в *m. soleus* у мышей линии C57Bl была на 57 %, а у мышей mdx на 49 % ниже, чем у животных соответствующих контрольных групп. Достоверных различий в размерах быстрых MB между мышцами линий mdx и C57Bl выявлено не было. Растяжение на фоне вывешивания у мышей линии C57Bl привело к снижению ППС MB второго типа на 31 % по сравнению с контрольной группой, однако этот показатель на 38 % выше, чем у вывешенных животных. У мышей mdx ППС MB второго типа после вывешивания с растяжением достоверно не отличается от группы животных с нормальным двигательным режимом, но на 33 % больше, чем у вывешенных животных.

Данные по изменению мио ядерного числа, т. е. количества мио ядер, приходящихся на одно мышечное волокно, представлены в табл. 2. У мышей линии C57Bl в контроле среднее число мио ядер на мышечное волокно несколько выше (1.15 ± 0.12), чем у мышей mdx (0.9 ± 0.1). Та же тенденция сохраняется при вывешивании и при вывешивании с растяжением. После вывешивания у мышей линии C57Bl число мио ядер на одно волокно снижается на 35 %. Существенное (на 23 %), но недостоверное уменьшение этого параметра наблюдается и у мышей линии mdx. 3-недельное растяжение полностью предотвращает уменьшение мио ядерного числа и сохраняет его на уровне контроля у мышей обеих линий.

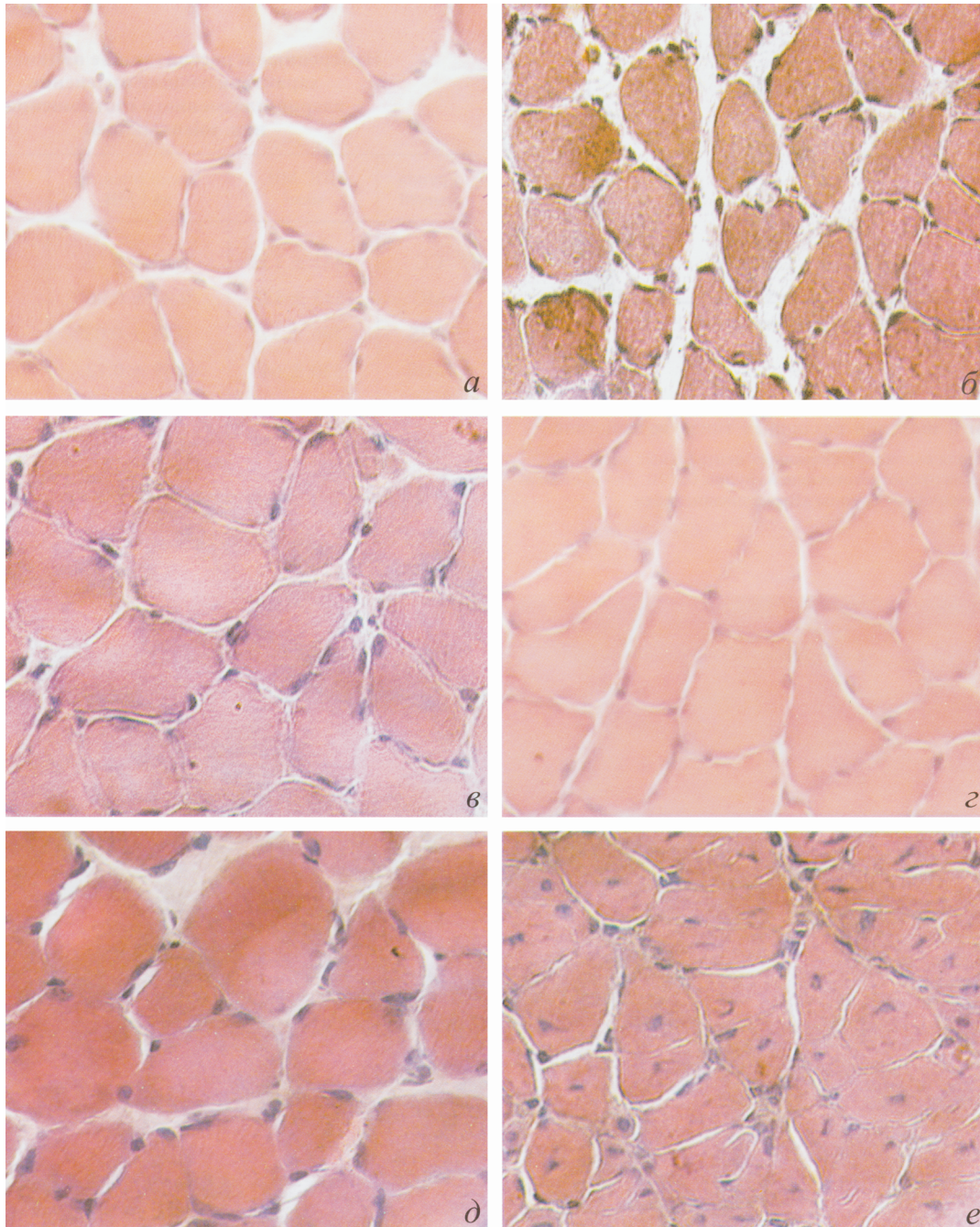


Рис. 2. Морфология *m. soleus* мышей после вывешивания и вывешивания с растяжением.

Группы: а — СС, б — CHS, в — CHSt, г — MC, д — MHS, е — MHSr.

Площадь поперечного сечения волокна, приходящаяся на одно миоадро, у мышей *mdx* независимо от воздействия в среднем на 36 % больше, чем у мышей линии C57Bl. После вывешивания этот параметр у мышей C57Bl и *mdx* снижается на 34 %, поскольку разгрузка вызывает уменьшение площади поперечного сечения волокон в среднем на 60 % от нормальной величины. Растяжение лишь частично, хотя и достоверно предотвращает вызванные разгрузкой изменения ядерно-плазменного соотношения. У мышей C57Bl и *mdx* после вывешивания с растяжением на одно миоадро приходится в среднем на 25 % меньше ППС волокна, чем у животных соответствующих контрольных групп.

На рис. 4 показано включение BrDU в пролиферирующие клетки *m. soleus* мышей линии C57Bl. Количество меченых ядер уменьшено при вывешивании и существенно повышается при растяжении *m. soleus*. Вывешивание мышей линии C57 Black подавляет пролиферативную активность в *m. soleus* (рис. 5). Количество ядер с включенным BrDU после вывешивания снизилось на 63 % по сравнению с контрольной группой. У мышей линии *mdx* это изменение недостоверно, хотя наблюдается тенденция (на 36 %) к снижению пролиферативной активности. Растяжение *m. soleus* на фоне вывешивания резко активизирует пролиферативные процессы, о чем свидетельствует 5-кратное увеличение количества ядер с включенным

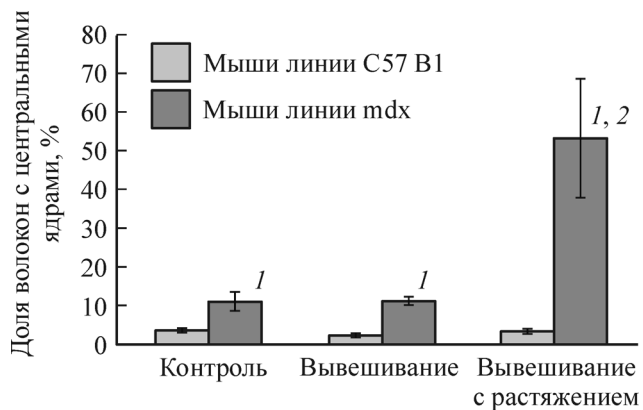


Рис. 3. Доля волокон, содержащих центральные ядра у мышей линии C57Bl и mdx при различных типах воздействия.

По вертикали — доля волокон, содержащих центральные ядра, %, 1 — достоверные отличия от соответствующей группы C57Bl, 2 — достоверные отличия от группы «Вывешивание mdx».

Таблица 2

Измеренные и рассчитанные параметры, характеризующие изменение ядерно-плазменного соотношения в m. soleus мышей

Группа мышей	ППС МВ, мкм ²	Число мио ядер на 1 МВ	ППС на 1 мио ядро
CC	1431 ± 132	1.15 ± 0.12	1361 ± 202
MC	1513 ± 123	0.90 ± 0.06	1855 ± 356
CHS	586 ± 37 ^a	0.75 ± 0.08 ^a	918 ± 67
MHS	630 ± 64 ^b	0.69 ± 0.12	1224 ± 231
CHSt	969 ± 44 ^a	1.11 ± 0.14	1014 ± 130
MHSt	1270 ± 198	0.92 ± 0.05	1397 ± 130

^a Достоверные отличия от группы CC. ^b То же от группы MC.

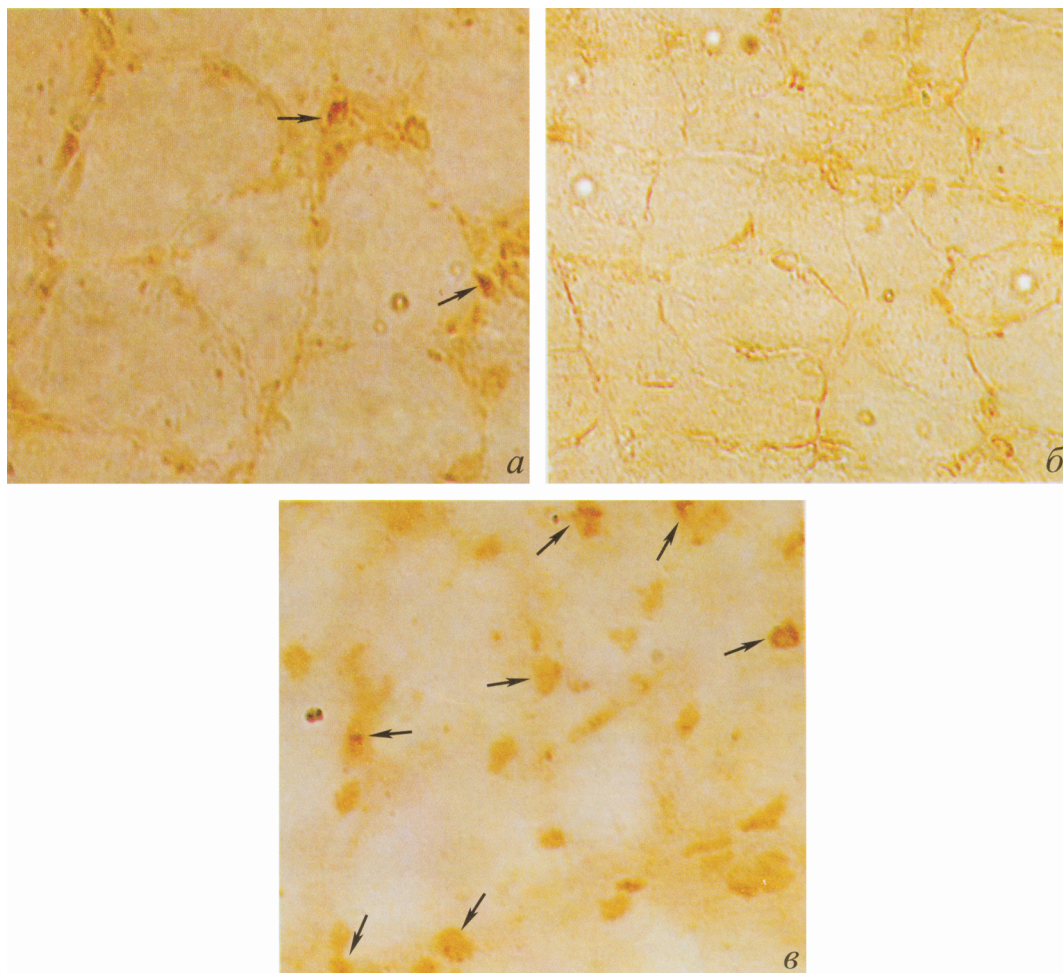


Рис. 4. Включение BrDU в ядра делящихся клеток m. soleus мышей C57Bl (использованы антитела против BrDU).

а — контроль, б — вывешивание, в — вывешивание с растяжением; стрелки указывают на меченые ядра.

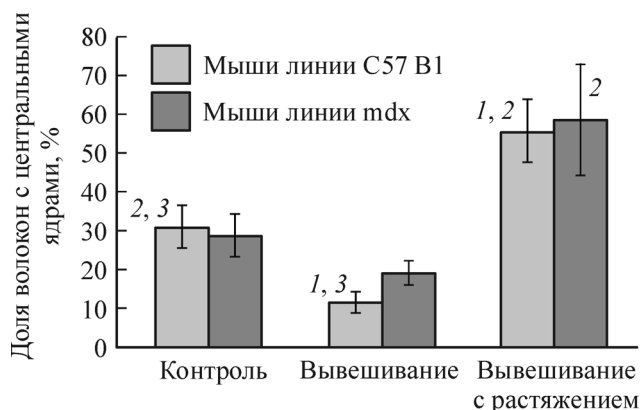


Рис. 5. Интенсивность пролиферации камбаловидной мышцы мышей C57Bl и mdx.

1—3 — достоверные отличия соответственно от групп «Контроль», «Вывешивание» и «Вывешивание с растяжением».

BrDU по сравнению с нерастянутой группой, причем интенсивность пролиферации почти вдвое превосходит таковую в контроле.

Обсуждение

В последние годы к дистрофину скелетных мышечных волокон как к цитоскелетному белку с возможной сигнальной функцией привлечено большое внимание исследователей. Так, известно, что помимо выполнения структурной функции в организации и защите саркомерного комплекса и регуляции трансмембранного переноса макромолекул дистрофин и ассоциированные с ним белки играют важную роль в регуляции дигидропиридиновых каналов (Johnson et al., 2005), нейрональной NO-синтазы и аквапоринового комплекса (Wakayama et al., 1997; Crosbie et al., 2002). Недавно было показано, что у животных, дефектных по гену дистрофина, при развитии системной кахексии, обусловленной интенсивным канцерогенезом, наблюдается лавинообразное усиление протеолитических процессов в мышечной ткани (Achaгуа, 2005). По мнению Гласса (Glass, 2005), эти данные могут свидетельствовать о центральной роли дистрофина в негативной регуляции сигнальных механизмов, запускающих протеолитический комплекс. Некоторые данные последнего времени указывают на определенное сходство сигнальных механизмов, интенсифицирующих протеолиз в скелетной мышце при атрофических процессах различной природы (Lecker et al., 2004). Поэтому естественно было предположить, что наличие дистрофина определенным образом сдерживает развитие атрофии и при функциональной разгрузке (disuse atrophy). Данные, полученные в настоящем исследовании, не могут трактоваться в пользу этой гипотезы. Глубина редукции площади поперечного сечения волокон *m. soleus* мышцей с нормальным и дефектным дистрофином при гравитационной разгрузке различалась незначительно. Атрофия волокон у мышцей линии mdx после вывешивания была даже несколько меньше выражена.

Известно, что редукция площади поперечного сечения волокон обычно сопровождается уменьшением содержания миоядер (Ohira et al., 2002). Как и в других исследованиях, в настоящей работе было обнаружено более глубокое уменьшение площади поперечного сечения во-

локон, чем уменьшение миоядерного числа (Ohira et al., 2002). Это находит свое выражение в уменьшении ППС волокна, приходящегося на одно миоядро. Из этих численных соотношений следует, что глубина атрофии зависит не только и не столько от степени редукции генетического материала, сколько от изменения соотношения синтетических и протеолитических процессов в цитоплазме. Обращает на себя внимание тот факт, что степень снижения миоядерного числа и ППС, приходящейся на одно ядро, оказывается весьма сходной у животных обеих линий, т. е. можно предположить, что отсутствие нормального дистрофина не оказывает значительного влияния ни на ядерную, ни на цитоплазматическую составляющую атрофического процесса. Таким образом, предположение о роли дистрофина в негативной регуляции атрофических сигнальных механизмов в скелетной мышце не находит своего подтверждения в отношении атрофии, развивающейся при гравитационной разгрузке. Такой вывод вполне согласуется с данными о принципиальных различиях NF-κB-зависимых сигнальных процессов, приводящих к усилению экспрессии ферментов убиквитин-протеосомного цикла, при вывешивании и при системной кахексии (Hunter et al., 2002).

Было показано существенное снижение интенсивности дистрофического процесса (судя по проценту центрально-ядерных волокон) в *m. soleus* у очень молодых (3-недельных) мышцей линии mdx при иммобилизации данной мышцей (Mokhtarian et al., 1999). В нашем предыдущем эксперименте с 10-суточным вывешиванием 12-месячных мышцей мы обнаружили прямо противоположный эффект: у вывешенных животных, дефектных по дистрофину, доля центрально-ядерных волокон оказалась выше, чем у контрольных животных той же линии (Таракин и др., 2006). В настоящем исследовании 20-суточное вывешивание 2-месячных мышцей mdx не привело к достоверному увеличению количества центрально-ядерных волокон в *m. soleus*. Сопоставление этих данных позволяет предположить, что влияние разгрузки на ход дистрофического процесса зависит от его выраженности: когда развитие патологии зашло уже достаточно далеко (у старых животных), гравитационная разгрузка может даже усиливать его.

Хорошо известно, что хроническое пассивное растяжение мышцей позволяет в значительной степени предотвратить развитие атрофии и изменение экспрессии изоформ тяжелых цепей миозина в быструю сторону при гравитационной разгрузке (Leterme et al., 1994). В работах лаборатории Г. Голдспинка анаболическое действие пассивного растяжения связывают с экспрессией нового сплайс-варианта инсулиноподобного фактора роста I, названного механозависимым фактором роста MGF. Этому ростовому фактору приписывается важная роль в инициации пролиферативной активности клеток миосателлитов, последующее слияние которых с материнским волокном приводит к увеличению его ядерного пула (Hill, Goldspink, 2003).

Наши результаты свидетельствуют о снижении пролиферации клеток-сателлитов при вывешивании, это же было показано ранее (Darr et al., 1989). Хорошо известно, что пролиферативная активность сателлитов в мышце активируется при ее растяжении (Carson et al., 1996). В настоящем исследовании показано увеличение пролиферативной активности одноядерных клеток мышечной ткани при растяжении мышцей на фоне функциональной разгрузки. В то же время известно, что применение пассивного растяжения быстрой мышцей у животных линии mdx (в отличие от мышцей с нормальной экспрессией дистро-

фина) не приводило к синтезу MGF (Goldspink et al., 1996). Кроме того, имеются данные о снижении числа сателлитных клеток и способности к регенерации в ответ на повреждение в *m. soleus* мышц линии *mdx* по сравнению с нормальными животными (Reimann et al., 2000). Это дало нам основание предположить, что применение хронического пассивного растяжения *m. soleus* при разгрузке у этих мышц не позволит эффективно противодействовать развитию атрофических процессов. Однако результаты, полученные в настоящем исследовании, не подтверждают эту гипотезу. У мышц обеих линий удалось добиться значительного уменьшения степени редукции площади поперечного сечения волокон, их миоядерных чисел и увеличения пролиферативной активности одноядерных клеток при пассивном растяжении на фоне гравитационной разгрузки.

В то же время в группе животных *mdx*, подвергнутых растяжению на фоне гравитационной разгрузки, наблюдали значительное увеличение доли центрально-ядерных волокон, что является общепризнанным признаком интенсификации дистрофического процесса. Судя по нашим неопубликованным данным, у этой группы животных также наблюдалось глубокое снижение сократительных возможностей скинированных волокон, что может указывать на резкое увеличение числа функционально инактивированных волокон.

Таким образом, результаты исследования эффектов гравитационной разгрузки и пассивного напряжения *m. soleus* у животных, дефектных по дистрофину, не подтверждают обе высказанные нами гипотезы о ключевой роли дистрофина в противодействии развитию атрофических процессов при функциональной инактивации мышц как в обычных условиях, так и при действии пассивного растяжения на этом фоне. В то же время пассивное растяжение на фоне отсутствия дистрофина, часто предотвращая редукцию площади поперечного сечения волокон, лишь интенсифицирует развитие дистрофического процесса.

Авторы благодарны проф. Г. Голдспинку (G. Goldspink, UCL, London, Великобритания) за полезное обсуждение экспериментальных задач настоящего исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-48757-а) программы президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине».

Список литературы

Таракин П. П., Гасникова Н. М., Ситников В. Ф., Шенкман Б. С. 2006. Влияние антиорто статического вывешивания на течение дистрофического процесса в мышцах задних конечностей мышцей линии *mdx*. Бюл. эксперим. биол. мед. 141 (6): 702—705.

Acharyya S., Butchbach M. E., Sahenk Z., Wang H., Saji M., Carathers M., Ringel M. D., Skipworth R. J., Fearon K. C., Hollingsworth M. A., Muscarella P., Burghes A. H., Rafael-Fortney J. A., Guttridge D. C. 2005. Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. *Cancer Cell*. 8 : 421—432.

Adams G., Haddad F., Baldwin K. 1999. Time course of changes in markers of myogenesis in overloaded rat skeletal muscles. *J. Appl. Physiol.* 87 : 1705—1712.

Carson J., Always S. 1996. Stretch overload-induced satellite cell activation in slow tonic muscle from adult and aged Japanese quail. *Amer. J. Physiol.* 270 : 578—584.

Crosbie R. H., Dovico S. A., Flanagan J. D., Chamberlain J. S., Ownby C. L., Campbell K. P. 2002. Characterization of aquaporin-4 in muscle and muscular dystrophy. *FASEB J.* 16 : 943—949.

Darr K., Schultz E. 1989. Hindlimb suspension suppresses muscle growth and satellite cell proliferation. *J. Appl. Physiol.* 67 : 1827—1834.

Glass D. J. 2005. A signaling role for dystrophin: inhibiting skeletal muscle atrophy pathways. *Cancer Cell*. 8 : 351—352.

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.

Goldspink G., Yang S. Y., Skarli M., Vrbova G. 1996. Local growth regulation is associated with an isoform of IGF-1 that is expressed in normal muscle but not in dystrophic muscle when subjected to stretch. *J. Physiol.* 10 : 496.

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.

Hunter R. B., Stevenson E. J., Koncarevic A., Mitchell-Felton H., Essig D. A., Kandarian S. C. 2002. Activation of an alternative NF-kappa B pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB J.* 16 : 529—538.

Johnson B. D., Scheuer T., Catterall W. A. 2005. Convergent regulation of skeletal muscle Ca²⁺ channels by dystrophin, the actin cytoskeleton and cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102 : 4191—4196.

Lecker S. H., Jagoe R. T., Gilbert A., Gomes M., Baracos V., Bailey J., Price S. R., Mitch W. E., Goldberg A. L. 2004. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 18 : 39—51.

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.

Mokhtarian A., Lefaucheur J. P., Patrick C. E., Sebille A. 1999. Hindlimb immobilization applied to 21-day-old *mdx* mice prevents the occurrence of muscle degeneration. *J. Appl. Physiol.* 86 : 924—931.

Nemirovskaya T. L., Shekman 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. Grav. Physiol.* 9 : 121—122.

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.

Reimann J., Irintchev A., Wering A. 2000. Regenerative capacity and number of satellite cells in soleus muscle of normal and *mdx* mice. *Neuromuscular disorders.* 10 : 276—282.

Riley D. A., Slocum G. R., Bain J. L., Sedlak F. R., Sowa T. E., Mellender J. W. 1990. Rat hindlimb unloading: soleus histochemistry, ultrastructure, and electromyography. *J. Appl. Physiol.* 69 : 58—66.

Schuijver M., Mann C., Bildsoe H., Huxley C., Hughes S. 2005. Analyses of the differentiation potential of satellite cells from *myoD*^{-/-}, *mdx* and *PMP22* C22 mice. *BMC Musculoskelet. Disord.* March, 11.6 : 15.

Wakayama Y., Inoue M., Murahashi M., Shibuya S., Jimi T., Kojima H., Oniki H. 1997. Ultrastructural localization of α 1-syntrophin and neuronal nitric oxide synthase in normal skeletal myofiber, and their relation to each other and to dystrophin. *Acta neuropathol.* 94 : 455—464.

Winder S. J. 1997. The membrane-cytoskeleton interface: the role of dystrophin and utrophin. *J. Muscle Res. Cell Motility.* 18 : 617—629.

THE CELLULAR EFFECTS OF FUNCTIONAL UNLOADING AND PASSIVE STRETCH
ON M. SOLEUS OF DYSTROPHIN-DEFICIENT MDX MICE

*O. V. Turtikova,¹ E. G. Altaeva,¹ M. V. Tarakina, A. M. Malashenko,² T. L. Nemirovskaya,¹ B. S. Shenkman¹. **

¹SRC, Institute for Biomedical Problems RAS and ²SI Center of Biomedical Technologies RAMS, Moscow;
* e-mail: shenkman@imbp.ru

Dystrophin, subsarcolemmal protein communicating muscle fiber cytoskeleton to extracellular matrix, is believed to participate in mechanical signal transduction. Recent works testify possible signaling role of this protein to prevent development of proteolytic processes accompanying muscle fiber atrophy and to stimulate the passive stretch anabolic effects. The experiment was carried out to assess the role of dystrophin in these processes. The study was performed on two months old C57 black and mdx (dystrophin-deficient) mice. Passive stretch resulted in attenuating atrophy development in two fiber types of both C57 black and mdx mice, at the same time fiber type slow-to-fast transformation did not occur in mdx soleus. We established ablatitious effect of chronic hindlimb unloading on SC proliferative activity in soleus muscle and drastic increase of proliferation under effect of passive stretch. We observed no relationship between altered dystrophin synthesis and satellite cell proliferation activity in soleus muscle under conditions of simulated microgravity and concurrent passive stretch. It is concluded that altered dystrophin synthesis partly retarded slow myofibers atrophy and had virtually no effect on passive stretch preventive action. Thus, the hypothesis about dystrophin key role in down-regulation of atrophy signaling mechanisms has not found its confirmation concerning gravitational unloading atrophy.

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