

Гипотрофия и угнетение регенерации мышц бедра у мышей, экспонированных на борту Бион М1 в течение 30 дней

Григорян Э.Н., Блэйбер Е¹. Поплинская В.А., Радугина Е.А., Маркитантова Ю.В., и Альмейда Е.А.М¹.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва; 1- Эймский Центр НАСА, Моффетт Филд, Калифорния, США

Exposure to Microgravity for 30 Days Onboard Bion M1 Caused Muscle Atrophy and Decreased Regeneration in the Mouse Femoral *Quadriceps*

Grigoryan E.N., Blaber E., Poplinskaya V.A., Markitantova Y.V., Radugina E.A., and Almeida E.A.C.

Kol'tzov Institute of Developmental Biology, RAS; 1- NASA Ames Research Center, Moffett Field, California, USA

Mechanical unloading of muscle during spaceflight in microgravity is known to cause muscular atrophy, changes in muscle fiber type composition, gene expression, and reductions in regenerative muscle growth. Although limited data exists for long-term effects of microgravity in human muscle, these processes have mostly been studied in rodents for short periods of time. Here we report on how 30-day, long-term, mechanical unloading in microgravity affects mouse muscle of the femoral *Quadriceps* group. To conduct these studies we used muscle tissue from 6 mice from the NASA Biospecimen Sharing Program conducted in collaboration with the Institute for Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, during the Russian Bion M1 biosatellite mission in 2013. Muscle morphology observed in histological sections shows signs of extensive atrophy and regenerative hypoplasia. Specifically, we observed a two-fold decrease in the number of myonuclei, their central location, low density of myofibers and myofibrils, in fragmentation and swelling of myofibers. Despite obvious atrophy, muscle regeneration nevertheless appears to have continued after 30 days in microgravity as evidenced by thin and short newly formed myofibers. Many of them however showed evidence of apoptotic, TUNEL positive cells and myofibrils degradation, suggesting long-term unloading in microgravity affects late stages of myofiber differentiation. Ground asynchronous and vivarium control animals showed normal, well-developed tissue structure with sufficient blood and nerve supply and evidence of regenerative formation of new myofibers free of apoptotic nuclei. Myonuclei stress response in spaceflight animals was detected by positive nuclear immunolocalization of c-jun and c-myc proteins. Regenerative activity of satellite cells in muscles is detected in mice of all animal groups, by pax7, MyoD, and myogenin immunostaining

and myogenin PCR analysis. In summary, long-term spaceflight in microgravity causes significant atrophy and degeneration of the femoral *Quadriceps* muscle group, and it may interfere with muscle regenerative processes by inducing apoptosis in newly-formed myofibrils during their differentiation phase.

Отсутствие механической нагрузки в космическом полете, как известно, вызывает мышечную атрофию, изменения в соотношении типов мышечных волокон и белков, изменения генной экспрессии и угнетение регенерации мышц. Несмотря на накопление информация о влиянии долговременной микрогравитации на мышцы человека, для грызунов данные в основном касаются кратковременных полетов. В статье приведены данные о влиянии 30-дневной механической разгрузки в условиях невесомости на мышцы *Quadriceps* проксимальной части бедра мышей. Использованы мышцы 6 мышей, полученные в соответствии с программой NASA Biospecimen Sharing Program и при участии ИМБП РАН, после завершения полета Российского биоспутника Бион М1 в 2013. В морфологическом исследовании на гистологических срезах выявлены все признаки атрофии и регенеративной гипоплазии. В частности, мы наблюдали двукратное снижение числа мио ядер, их центральную локализацию, низкую плотность волокон в ткани и миофибрилл в волокне, фрагментацию и набухание волокон. Несмотря на очевидную атрофию, регенерация все же имела место в течение 30 дней микрогравитации, что выражалось в формировании атипичных, тонких новых миофибрилл. Многие из них, однако, содержали ядра, TUNEL позитивные при окрашивании на апоптоз, и демонстрировали деградацию миофибрилл. Это свидетельствовало о том, что длительная разгрузка в невесомости делает невозможными дифференцировку и рост регенерирующих волокон. В тоже время в гравитационном и виварных контролях животные обладали нормальной, хорошо развитой структурой мышечной ткани, нормальным снабжением со стороны сосудистой и нервной систем, а также очевидной регенерацией с формированием новых жизнеспособных волокон. Миоядра в ткани «летавших животных» демонстрировали стресс-ответ, выявленный нами по иммунолокализации в них белков c-jun и c-мус. Регенеративная активность клеток сателлитов была определена у мышей всех групп по экспрессии белков маркеров рах7, MyoD, а также по иммунолокализации миогенина и ПЦР идентификации транскриптов генов *MyoG*. Таким образом, условия долговременного космического полета вызывают гипо- и атрофию мышц бедра *Quadriceps*, наряду с продолжающейся, но неполноценной регенерацией, сопровождаемой индукцией апоптоза и деградацией миофибрилл на стадии дифференцировки вновь образованных волокон.

Ключевые слова: бион М1, космический полет, мышь, мышцы группы *Quadriceps*, дегенерация, регенерация, клеточный стресс, апоптоз, факторы транскрипции

Изучение изменений, происходящих в скелетно-мышечной системе под действием невесомости, является одним из основных разделов гравитационной биологии и медицины. Известно, что разгрузка мышц млекопитающих и человека, вызванная условиями пониженной дозы гравитации, приводит к мышечной атрофии и угнетению регенерации этой ткани (Martin et al., 1988; Schultz et al., 1994; Grigoriev et al., 2004; Shenkman et al., 2010). В намного более многочисленных, по сравнению с полетными тестами, лабораторных экспериментах, моделирующих мышечную разгрузку, получена базовая информация о морфологических, биохимических и молекулярных процессах, приводящих к дегенерации, атрофии мышечных волокон (Nonaka, 2012; Baldwin et al., 2013). Изученные закономерности явления заключаются в переводе физического сигнала о разгрузке мышц в молекулярный сигнал, в инициации процессов деградации мышц на биохимическом уровне, за которыми следуют морфологические проявления процесса вплоть до существенной потери мышечной массы (Morey-Holton et al., 2005; Chopard et al., 2009; Baldwin et al., 2013). Наряду с этим показана возможность работы компенсаторных механизмов, обеспечивающих жизнеспособность и функцию мышечной ткани у животных, подвергнутых длительной гравитационной разгрузке (Sandona et al., 2012).

Результаты экспериментов, проведенных в космических полетах, позволяют констатировать, что процессы гипо- и атрофии мышц изучены главным образом у животных, экспонированных в условиях микрогравитации в течение относительно коротких по времени полетов (до 2 нед) (Ohira et al., 1992; 2002; Desplanches et al., 1990; Staron et al., 1998; Kraemer et al., 2000; Schuenke et al., 2009). Совокупность данных свидетельствует о том, что кратковременные полеты существенно сказываются на состоянии мышечной системы, индуцируя частичное ее разрушение, а также трансформацию «медленных» мышц в быстрые. Выявлены изменения и на молекулярном уровне, в частности в экспрессии мРНК многих генов, работа которых необходима для роста и специализации мышечных волокон (Allen et al., 2009). Для длительных космических полетов полученной на животных информации, намного меньше. Известно, что у мышей, экспонированных на МКС в течение 91 дня в соответствии с программой MDS (mice drawer system) камбаловидные мышцы подвергались значительной атрофии, которая, однако, не была большей, чем та, что возникала к 20-му дню полета. В этом типе мышц, а также мышце - длинном разгибателе пальцев была обнаружена “up” – регуляция

экспрессии генов, кодирующих связанные с атрофией убиквитинные лигазы (Sandona et al., 2012).

В нашей работе впервые изучены мышцы группы *Quadriceps*, полученные из проксимальной, прилегающей к тазобедренному суставу части бедра, и которые для грызунов можно расценивать как антигравитационные. Известно, что тазобедренный (pelvic-femoral) скелетно-мышечный комплекс у этих животных экстремально нагружен, и поэтому является чувствительным к гравитации, и, по нашему мнению, представляет собой ценную модель для изучения феномена скелетно-мышечной дегенерации в космических полетах. Параллельно исследованию состояния этого отдела скелетных мышц нам оказалось доступным изучение регенерации мышц группы *Quadriceps*.

Известно, что регенерация мышц имеет место у животных и человека в ответ на повреждение, при старении и заболеваниях, при сверх - нагрузках, травмах и т.д. (Massiero et al., 2009; Brooks, Myburgh, 2014). Известны также клеточные источники и запускающие процесс восстановления молекулярные механизмы (Kawano et al., 2009; Shenkman et al., 2010). Показано, что в ответ на сигнализирование о повреждении мышечного волокна активируется каскад событий, включающий высвобождение из-под базальной мембраны клеток сателлитов, их пролиферацию с образованием миобластов, дифференцировку и морфогенез нового мышечного волокна (Yablonka-Reuveni et al., 2013). Известно также, что экспериментально создаваемая разгрузка мышц приводит к угнетению регенерации (Darr, Schultz, 1989; Mozdziak et al., 1998). В литературе присутствует также точка зрения, что при сниженной гравитационной нагрузке регенерационные процессы ингибированы, а регенерация оказывается несовершенной или недостаточной относительно объемов поврежденной мышечной массы (Matsuba et al., 2009). Среди причин этого указывается, в частности, на подавление активации сателлитных клеток и их взаимодействия с макрофагами, функция которых в свою очередь также снижена (Kohn et al., 2012). Однако полной ясности в понимании того, какие из этапов регенерации мышц блокированы или ингибированы в условиях гравитационной разгрузки, пока нет.

В работе впервые исследовано состояние мышц проксимального отдела *Quadriceps* у мышей, участвующих в эксперименте на борту биоспутника Бион М1 продолжительностью 30 дней. У полетных животных обнаружены все признаки гипо- и атрофии мышечных волокон в то время как в виварном и гравитационном контроле мышцы сохраняют нативное, нормальное состояние. Проведено морфологическое изучение регенерации мышц, а также иммунохимическое и ПЦР исследование ряда молекулярных процессов, играющих ключевую роль в инициации и прогрессе

регенерации. В результате показано, что во время полета возможна инициация процесса восстановления вплоть до миогенеза и формирования небольших атипичных волокон – регенератов, претерпевающих, однако, позже очевидную дегенерацию в отсутствие основного морфогенетического фактора – нагрузки.

Материал и методы

Животные и выделение мышц. Исследование проведено на мышцах, участвующих в эксперименте на борту Российского биологического спутника Бион М1. Использованы самцы линии C57Bl/6N SPF в возрасте 8-9 недель, полученные из вивария Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, РАН (Пушино). Детали предполетного отбора, биоэтики проведения эксперимента, подготовки к полету, а также условия полета и контролей изложены в отчетах рабочей группы и статьях данного сборника. Нами в работе были использованы мышцы вскоре после полета (6 особей), из виварных (по 7 особей) и гравитационного (7 особей) контролей. В гравитационном контроле животные находились в условиях максимально приближенных к полетным: жили в отдельных модулях, оснащенных системами газообмена, поддержки необходимого уровня температуры и влажности. Два виварных контроля предусматривали оценку состояния и параметров нормальных лабораторных животных после полета и по завершении гравитационного контроля.

Выделение проксимальной части (прилежащей к тазовым костям) бедра группы мышц *Quadriceps* проводили хирургически на завершающем этапе забора биоматериала всеми участниками эксперимента. Свежевыделенный материал был разделен на две части. Половина материала (от каждого образца) была зафиксирована в коммерческом растворе для сохранения РНК, *RNAlater™* (Qiagen, США), и хранилась в нем до дальнейшей обработки при температуре -20°C . Оставшийся материал был фиксирован в 4% растворе формальдегида. В дальнейшем до обработки материал хранился в фиксаторе при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

Гистологическая обработка материала. Фрагменты мышечной ткани, полученной от мышцей всех групп: полетной, групп гравитационного контроля и двух виварных контролей, были отмыты от фиксатора, дегидратированы и залиты в парафин. Серийные срезы толщиной 7 мкм наклеивали на предметные стекла и окрашивали гематоксилин – эозином. Анализ морфологии ткани проводили с помощью микроскопа Olympus (Япония). Изображения получали на разных разрешениях микроскопа Leica DM5000B (Германия),

оснащенного компьютерной приставкой и программами пакета Leica Application Suite (Швейцария).

Количественные исследования. В работе использованы два способа определения относительного числа мио ядер. В первом случае на срезах подсчитывали число ядер (ядер волокна и сателлитных клеток в совокупности) на площадках мышечной ткани размером 0.25 мм^2 с помощью окулярной сетки. Использовали площадки ткани, имеющие нормальную морфологию плотно упакованных мышечных волокон, избегая неокрашенных областей – септ и мест локализации нервных и мышечных окончаний. Для каждого из образцов во всех группах животных анализировали от 50 до 70 поперечных срезов разных областей проксимальной части двуглавых мышц. Во втором случае аналогичные площадки ткани фотографировали с помощью микроскопа Leica DMRXA2, оснащенного фотокамерой Olympus DP70. Всего было проанализировано по 4 образца из виварного и синхронного контроля, и 5 образцов из полетной группы. Полученные изображения (в среднем 20 изображений на образец) обрабатывали в программе Image J, вычисляя площадь, занимаемую мышечной тканью (в пикселях), а также количество ядер в мышечной ткани. Данные, полученные обоими способами, анализировали в программе Microsoft Excel. При этом вычисляли количество ядер на единицу площади, как общей (Nc/Ta), так и занимаемой мышечными волокнами (Nc/Fa, только при втором способе анализа). Последнее давало возможность более корректной оценки при исключении пустот, не занятых мышечной тканью на срезах. Статистическую обработку данных проводили в программе STATISTICA 8.0., используя методы описательной статистики и оценки распределения, а также непараметрический критерий Краскела-Уоллиса для сравнения медиан нескольких выборок и *post hoc* критерий Данна для множественных сравнений.

Иммунохимические исследования. Глаза фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида, приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере (pH 7.4). Затем отмывали в фосфатном буфере, трех сменах фосфатного буфера с 5% сахарозой, трех сменах фосфатного буфера с 10% сахарозой, после чего оставляли на ночь в фосфатном буфере с 20% сахарозой при +4°C. После замораживания в среде Tissue-Tec OCT (Leica, Germany) с помощью криостата (Leica M1900, Germany) были получены поперечные криосрезы толщиной 10 мкм. Срезы отмывали в 0.1 М фосфатном буфере, инкубировали в течение 60 мин в блокирующем растворе, содержащем 3% BSA, и отмывали от сыворотки в 3-х сменах раствора 0.1 М PBS. Проводили пермеабиллизацию клеточных мембран в 0.1 М фосфатном буфере, содержащем: 0.25% Triton X-100, 0,1% Твин-20 в течение 15 мин.

Затем срезы инкубировали с антителами в течение 12 ч в блокирующем растворе, содержащем 3% BSA при +4C⁰. В работе использовали коммерческие антитела против c-myc (кроличьи поликлональные, Novus Biologicals, Великобритания, 1:100), c-jun (кроличьи поликлональные, LSBio, США, 1:100), pax7 и myogenin (оба АТ - кроличьи моноклональные, Abscam, Великобритания, 1:100). Разведение антител проводили с учетом рекомендаций фирмы производителя. После инкубации срезы отмывали 3 раза по 10 мин в 0.1 М фосфатном буфере и окрашивали в течение 60 мин вторыми антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa 488 или 546 (Molecular Probes, USA). Рабочее разведение вторых антител составляло 1:1000. После реакции со вторыми антителами, срезы отмывали в 0.1 М фосфатном буфере и заключали под покровные стекла в среду Vectashield (Vector, США). Для окраски ядер использовали Hoechst 42333 (Leica, Германия, 1:1000). Для подтверждения специфичности связывания антител проводили контрольную реакцию в отсутствие первых антител. В контрольных препаратах наблюдали отрицательную реакцию на иммунохимическое окрашивание. Результат реакции анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM RXA2 (Германия), с передачей изображения на компьютерную приставку, оснащенную программой Leica for Windows.

Исследование TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling). Для выявления апоптотических клеток по разрывам ДНК применяли метод TUNEL, используя набор реагентов DeadEnd Fluorometric TUNEL System, (Promega Corporation, США). Метод основан на выявлении гибнущих клеток с уже фрагментированной ДНК, за счет включения fluorescein-12-dUTP в 3'-ОН-концы ДНК, с помощью реакции ник-трансляции, катализируемой ферментом Recombinant Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (rTdT). Реакцию проводили по протоколу фирмы-производителя на замороженных срезах мышечной ткани, фиксированной 4% раствором формальдегида, приготовленном на 0.1 М фосфатном буфере. Для окраски ядер использовали краситель Hoechst 33342 (1:1000, Leica, Германия). Ядра клеток с меченой флуоресцеином-12-dUTP ДНК визуализировали с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM RXA2 (Германия).

ПЦР анализ. РНК образцов, фиксированных в RNAlater™, выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Качество и количество полученной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 8000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы очищали от геномной ДНК ферментом ДНКазой I (DNase I, RNase-free, Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. После этого проводили синтез первой цепи кДНК с помощью набора для проведения обратной транскрипции со

случайными гексапраймерами «Синтез первой цепи кДНК (рэндом)» (Силекс, Россия). Концентрация кДНК во всех библиотеках была измерена спектрофотометрически и доведена до стандартных значений – 125 нг/мкл, исходя из рекомендаций по работе на амплификаторах фирмы Applied Biosystems. Полуколичественную оценку экспрессии гена *Myogenin* проводили методом ОТ-ПЦР на матрице кДНК, в качестве внутреннего контроля были выбраны гены *Rpl19m* и *Hprt1m*. Праймеры для ПЦР (таблица), любезно предоставленные сотрудницей ИБР РАН Балан О.В., были сконструированы на основе нуклеотидных последовательностей, аннотированных в международной базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Температурный режим реакции определяли теоретически, используя программу OligoAnalyzer, а затем проверяли экспериментально. ПЦР-продукты разделяли электрофорезом в 1.5% агарозном геле (Amresco, США) в ТАЕ буфере в присутствии маркера длин фрагментов 1000-100 н.п. (Силекс, Россия). Качественную оценку интенсивности свечения продуктов ПЦР проводили на УФ-транслюминаторе Gel Doc™ XR+ System (BIO-RAD, США) с помощью программы QuantityOne.

Результаты и обсуждение

Морфологическое исследование. Виварные контроли. Морфологию мышечной ткани изучали на всех образцах двух виварных контролей, поставленных отдельно для полетного и гравитационного экспериментов. Поскольку результаты оказались сходны, мы приводим их суммарно для двух этих тестов. На препаратах нормальной мышечной ткани находятся пучки мышечных волокон, вдоль которых свободно располагаются миоядра и клетки сателлиты. Упаковка разделенных септами волокон - плотная. Ядра клеток саттеллитов часто вытянутые, веретеновидные, светлые, имеют гетерохроматин, 2-3 ядрышка и узкий ободок цитоплазмы; миоядра окрашены плотнее, их структура распознается плохо. Следует отметить, что первые являются клетками с цитоплазмой богатой органеллами, в то время как вторые – только клеточными ядрами. В нормальной ткани контрольных мышей ядерные элементы расположены всегда на периферии. Нет признаков смещения или вымещения клеток сателлитов и миоядер за пределы волокна. В массе мышечных волокон видны кровеносные сосуды разного калибра, нервные окончания, элементы соединительной ткани (в основном по периферии мышц, редко в септах). Признаки воспаления и/или фиброза отсутствуют. Мышечные волокна имеют нормальное строение, обладают поперечной исчерченностью, имеют базальную мембрану.

При этом все же можно наблюдать локальные, незначительные повреждения волокон и/или их разрывы. В этих случаях имеет место регенерация мышц. Она выражается в скоплении высвобождающихся клеток сателлитов, обычно вдоль волокна, но нередко и в свободных пространствах между волокнами. Клетки сателлиты формируют новые волокна, образуя цепочки миобластов, затем образуются миотрубочки, где начинается синтез сократительных белков и формирование новых миофибрилл, а затем и волокон мышцы. Формирующиеся новые волокна чаще можно обнаружить вблизи сосудов и нервных окончаний. Есть картины формирования новых миотрубочек вдоль существующего волокна и на концах его разрывов. При восстановлении поврежденных волокон возможны интеркаляции – подрастание новых формирующихся волокон к соседним зрелым волокнам.

Гравитационный (синхронный) контроль. В целом состояние мышечной ткани сходно с описанным выше для животных виварных контролей. Отличие касается числа нервно – мышечных окончаний, которое по предварительной оценке несколько выше. Миоволокна плотно упакованы, очевидных признаков атрофии или гипотрофии нет (рис. 1а). В пространстве между волокнами можно видеть фибробласты, эндотелиальные, нервные клетки. Признаков воспаления – наличия инфильтрации лимфоцитами пространств между волокнами – не выявлены; нет признаков фиброза.

Также как и в виварных контролях наблюдается формирование новых отдельных, немногочисленных волокон, а также восстановление старых. В первом случае клетки предшественники, выместившись из-под базальной мембраны волокна, формируют цепочку миобластов, выходящих затем в мышечную дифференцировку. Такой ранний регенерат претерпевает морфогенез и созревание с образованием нового волокна. Во втором случае вымещающиеся клетки как бы достраивают волокно, образуя скопления миобластов в определенной, подвергшейся дегенерации области волокна или происходит формирование волокна вдоль старого. Рост новых миоволокон чаще наблюдается вблизи нервных окончаний и просветов кровеносных сосудов. Области формирования новых мышечных волокон – области регенерации – легко распознаются по высокой концентрации свободных ядерных элементов и их нетипичной локализации. Часто такая картина наблюдается в местах разрывов мышц.

Полетная группа. При сравнении с виварным и гравитационным контролями в полетной группе отчетливо выявляются признаки гипо- и атрофии мышечных волокон. Прежде всего, хорошо заметно уменьшение размеров волокон и значительное увеличение

пространств между пучками в мышцах, а также помутнение волокон. В них хорошо различимы отдельные миофибриллы – т.е. имеет место разволокнение. Ишемические мышечные волокна имеют менее интенсивное окрашивание по сравнению с интактными в контролях. Для миоволокон животных полетной группы характерно также набухание и наличие разрывов с образованием бахромчатого края (рис. 2б). В результате падения натяжения часто меняется форма волокна. Отчетливо видна и деградация мышечных волокон, сопровождающаяся резорбцией миофибриллярного материала без участия макрофагов. Как известно, эти процессы происходят благодаря аутолизису и работе эндогенных протеаз. Миофибриллы дезорганизуются, но остаются внутри эндомизиальной трубки (рис. 2б). Еще одним признаком дегенерации мышечных волокон в полетной группе является наблюдаемое набухание, частые разрывы и потеря поперечно-полосатой исчерченности. В ряде случаев имеет место разрушение базальной мембраны и выселение миоядер. В дегенерирующих миоволокнах ядра часто имеют центральную, а не пристеночную локализацию. В целом же число миоядер у животных полетной группы значительно снижено, о чем свидетельствуют как визуальные наблюдения, так и подсчеты (см. ниже). При этом также как и в контролях, признаки воспаления или фиброза в полетной группе отсутствуют.

Интересно, что на фоне отчетливой атрофии часто различимы признаки ранних этапов регенерации – концентрации покинувших волокна клеток сателлитов и их скопление в сайтах повреждения. Эти небольшие скопления часто не сформированы в цепь, имеют произвольную форму, где клетки находятся в неправильной ориентации. Среди этих ядер наблюдаются и апоптотические. Можно обнаружить разрушение эндомизиальных мембран, пикноз и апоптоз ядер. Следует отметить, что при этом, по-видимому, ни иннервация, ни кровоснабжение мышц в полетной группе не страдают. Окончания нервов и просветы сосудов – очевидны.

В случаях регенерации волокон у животных полетной группы параллельно наблюдается их последующая неизбежная деградация. В лучшем случае формируются дезорганизованные в низкой плотности миофибриллы, входящие в состав атипичного по форме миоволокна. В большинстве же случаев вновь сформированные, всегда тонкие и короткие регенераты под базальной мембраной содержат продукты деградации мышечных белков – многочисленные округлые эозинофильные включения, разрушенные миофибриллы, распадающиеся на отдельные саркомеры. В редких случаях можно увидеть макрофаги, работающие чистильщиками остатков сократительного материала - дегенерирующих миофибрилл. С уверенностью можно говорить, что дегенерация

мышечной ткани в полетной группе доминирует над регенерацией. Степень выраженности атрофии мышечной ткани у животных внутри этой группы несколько различается, также наблюдаются отличия и по областям ткани.

Подсчет миоядер. Количество ядер мышечных волокон, являющихся, как известно, постмитотическими отражает способность к продукции мышечных белков, а число клеток сателлитов, находящихся также под базальной мембраной волокна – его восстановительную способность. Для исследования изменений в числе ядерных элементов мы проводили подсчеты двумя способами. В первом случае использовали непосредственный подсчет окрашенных гематоксилином, базофильных ядер на единицу площади среза. При таком подсчете миоядер на площадках мышечной ткани размером $0,25 \text{ мм}^2$ обнаруживалось в среднем 20 ядер в виварном контроле, 27 ядер в синхронном контроле и 12 ядер в полетной группе. Различия средних значений между всем группами были признаны достоверными с уровнем значимости менее 0,001 на основании критериев Краскела-Уоллиса и Данна.

При подсчетах с использованием программ компьютера также было продемонстрировано двукратное снижение числа ядер в мышцах животных полетной группы относительно контролей. Этот феномен выявлялся как при определении числа ядер относительно всей площади взятого изображения ($N_c/T_a = 3.9, 6.7, 7.8$ соответственно в полетной группе, виварном и синхронном контроле), так и относительно площади только массы мышечных волокон ($N_c/T_m = 6.3, 11.5, 11.0$ соответственно в полетной группе, виварном и синхронном контроле). Различия средних значений между полетной группой и контролями всем группами были признаны достоверными с уровнем значимости менее 0,001 на основании критериев Краскела-Уоллиса и Данна. Коэффициент положительной линейной корреляции для значений числа миоядер, полученных двумя способами, составил 0,99987 при уровне значимости 0,01, что говорит о полном соответствии результатов двух подходов.

Исследование гибели миоядер через апоптоз. Число постмитотических ядер миоволокна – является очень важным критерием, так как отражает содержание ДНК в симпласте для осуществления транскрипции. Мы использовали метод TUNEL для определения объемов клеточной гибели через апоптоз в мышцах контрольных и полетных мышей. На рисунке 2 хорошо видно, что число ядер, маркированных с помощью данного метода на повреждение ДНК, существенно выше в мышцах полетных мышей по сравнению с контрольными образцами. Эти результаты хорошо совпадают с

приведенными выше данными прямыми и проведенных с помощью компьютерных программ, подсчетов миоядер.

Экспрессия белков клеточного стресса, маркеров клеток сателлитов и миогенеза.

Приведенные выше морфологические изменения, произошедшие в мышцах группы *Quadriceps* за время пребывания мышей в полете, связаны с изменением работы различных генов, в частности и в первую очередь тех, экспрессия которых обуславливает рост, атрофию мышц, а также клеточный стресс (Ishihara et al., 2008). В ответ на стресс происходит активация ядер клеток сателлитов, направленная на их высвобождение для формирования миобластов и их пролиферацию. При окрашивании антителами против белков клеточного стресса (с-тус и с-jun) удалось наблюдать такую активацию – позитивную иммунореакцию с-тус и с-jun в ядерных элементах, включающих как миоядра, так и ядра клеток сателлитов. При этом явление имело место, как в полетных образцах мышц, так и в контроле. На изображениях, снятых при разных режимах регистрации флуоресценции видно, что при двойном окрашивании ядер (Hoechst + с-тус, и с-jun антитела) иммунопозитивный ответ демонстрируют отдельные ядра на периферии волокон. Изучение ряда изображений дает основание предполагать, что число ядер, обладающих экспрессией протонкогенов с-тус и с-jun, в полетной группе существенно (1,5-2 раза) выше.

Еще одним ранним регенерационным ответом в мышцах является экспрессия белка – транскрипционного фактора Pax7, признанного маркера активации клеток источников регенерации – клеток сателлитов (Lepper et al., 2011). При иммуногистохимическом изучении экспрессии фактора транскрипции Pax7 обнаружена его локализация в ядрах, о чем свидетельствует двойное окрашивание Hoechst и антителами против Pax7. Подчеркнем, что окрашивание наблюдалось как в образцах мышц полетных, так и контрольных животных. Это свидетельствует о том, что инициация регенерации мышечных волокон при участии клеток сателлитов имеет место, как в полете, так и в наземных контролях. При этом предварительный количественный анализ, свидетельствует в пользу увеличения числа Pax7- позитивных клеток в мышцах полетных мышей.

О регенерации во всех исследованных образцах мышц мышей полетной и контрольных групп свидетельствуют также результаты по экспрессии миогенина – транскрипционного фактора специфически экспрессирующегося на этапе выхода клеток предшественников в миогенную дифференцировку при формировании миотрубочек в развитии и при регенерации (Buckingham, 2001). Мы изучали экспрессию этого

транскрипционного фактора двумя методами – иммуногистохимически и с помощью ПЦР. При окрашивании антителами против антигена – белка миогенина и NucleoRed мы выявили его экспрессию в ядрах клеток, локализующихся за пределами мышечных волокон и относящихся, с большой вероятностью к миобластам – источникам формирования новых мышечных волокон. Окрашивание наблюдали как в полетных, так и контрольных образцах. Подтверждением этих сведений явились результаты ПЦР исследования (рис. 3). Они показали присутствие мРНК транскриптов гена миогенина *Myog* во всех исследованных образцах мышц, как контролей, так и полетной группы мышей. Это свидетельствует о протекании процесса формирования мышечных трубочек вне зависимости от дозы гравитации. Другими словами, этап регенерации, на котором формируются мышечные трубочки, осуществим как при 1g в ходе персистентной, происходящей в мышцах регенерации, так и при атрофии, вызванной длительной невесомостью в полетной группе мышей.

Наряду с этим в полетной группе как описано выше отчетливо выражены как дегенерация существующих волокон, так и атипичных регенератов. Данные по регенерации мышечных волокон в совокупности свидетельствуют о том, что в отсутствие нагрузки возможна активация клеток предшественников – сателлитных клеток – источников регенерации и попытка реконструкции мышечных волокон, морфогенез которых, однако, не может быть завершен. В результате вновь сформированные регенераты мышц в отсутствие гравитации – необходимого условия для морфогенеза волокна *de novo* и его созревания - дегенерируют.

Литература

- Allen D.L., Bandstra E.R., Harrison B.C., et al. Effects of spaceflight on murine skeletal muscle gene expression // J. Appl. Physiol. 2009. V. 106. № 2. P. 582-595.
- Chopard A., Hillock S., Jasmin B.J. Molecular events and signaling pathways involved in skeletal muscle disuse-induced atrophy and the impact of countermeasures // J. Cell Mol. Med. 2009. V. 13. № 9B. P. 3032-3050.
- Sandona D., Desaphy J.F., Camerino G.M. et al. Adaptation of mouse skeletal muscle to long-term microgravity in the MDS mission // PLoS One. 2012. V 7. № 3: e33232.
- Shenkman B.S., Turtikova O.V., Nemirovskaya T.L., Grigoriev A.I. Skeletal muscle activity and the fate of myonuclei // Acta Naturae. 2010. V.2. № 2. P. 59 – 65.
- Grigoriev A.I., Kozlovskaya I.B., Shenkman B.S. The role of support afferents in organisation of the tonic muscle system // Russian Journal of physiology. 2004. V. 90. № 5. P. 508-521.

- Ohira Y., Jiang B., Roy R.R., Oganov V., Ilyina-Kakueva E., et al. Rat soleus muscle fiber responses to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.* 1992. V. 73. P. 51S – 57S.
- Ohira Y., Yoshinaga T., Nomura T., Kawano F., Ishihara A., et al. Gravitational unloading effects on muscle fiber size, phenotype and myonuclear number // *Adv. Space Res.* 2002. V. 30. P. 777–781.
- Desplanches D., Mayet M.H., Ilyina-Kakueva E.I., Sempore B., Flandrois R. Skeletal muscle adaptation in rats flown on Cosmos 1667. *J. Appl. Physiol.* 1990. V. 68. P. 48–52.
- Staron R.S., Kraemer W.J., Hikida R.S., Reed D.W., Murray J.D., et al. Comparison of soleus muscles from rats exposed to microgravity for 10 versus 14 days // *Histochem. Cell Biol.* 1998. V. 110. P. 73–80.
- Kraemer W.J., Staron R.S., Gordon S.E., Volek J.S., Koziris L.P., et al. The effects of 10 days of spaceflight on the shuttle Endeavor on predominantly fast twitch muscles in the rat // *Histochem. Cell Biol.* 2000. V. 114. P. 349–355.
- Schuenke M.D., Reed D.W., Kraemer W.J., Staron R.S., Volek J.S., et al. Effects of 14 days of microgravity on fast hindlimb and diaphragm muscles of the rat // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2009. V. 106. P. 885–892.
- Kawano F., Takeno Y., Nakai N., Higo Y., Terada M., et al. Essential role of satellite cells in the growth of rat soleus muscle fibers // *Am. J. Physiol.* 2008. V. 295/ P. C458 – C467.
- Masiero E., Agatea L., Mammucari C., Blaauw B., Loro E., et al. Autophagy is required to maintain muscle mass // *Cell Metab.* 2009. V. 10. P. 507–515.
- Martin T.P., Edgerton V.R., Grindeland R.E. Influence of spaceflight on rat skeletal muscle // *J. Appl. Physiol.* 1988. V.65. P. 2318–2325.
- Kenneth M. Baldwin,^{1,*} Fadia Haddad,^{1,2} Clay E. Pandorf,³ Roland R. Roy,^{4,5} and V. Reggie Edgerton^{4,5,6,7} Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional/pretranslational mechanisms. *Front Physiol.* 2013; 4: 284.
- Shohei Kohno,¹ Yui Yamashita,¹ Tomoki Abe,¹ Katsuya Hirasaka,^{1,2} Motoko Oarada,³ Ayako Ohno,¹ Shigetada Teshima-Kondo,¹ Akira Higashibata,⁴ Inho Choi,⁵ Edward M. Mills,² Yuushi Okumura,¹ Junji Terao,⁶ and Takeshi Nikawa¹. Unloading stress disturbs muscle regeneration through perturbed recruitment and function of macrophages. *J Appl Physiol* (1985). May 15, 2012; 112(10): 1773–1782.
- Schultz E, Darr KC, Macius A. Acute effects of hindlimb unweighting on satellite cells of growing skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 1994;76:266–270.
- Darr KC, Schultz E. Hindlimb suspension suppresses muscle growth and satellite cell proliferation. *J Appl Physiol.* 1989;67:1827–1834.

Matsuba Y, Goto K, Morioka S, Naito T, Akema T, et al. Gravitational unloading inhibits the regenerative potential of atrophied soleus muscle in mice. *Acta Physiol (Oxf)* 2009;196:329–339.

Naomi E. Brooks, Kathryn H. Myburgh/Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: the response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways // *Front Physiol.* 2014; V5. P. 99

Mozdziak PE, Truong Q, Macius A, Schultz E. Hindlimb suspension reduces muscle regeneration. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1998;78:136–140

Morey-Holton E, Globus RK, Kaplansky A, Durnova G. The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data. *Adv Space Biol Med.* 2005;10:7–40

Ishihara A, Fujino H, Nagatomo F, Takeda I, Ohira Y (2008) Gene expression levels of heat shock proteins in the soleus and plantaris muscles of rats after hindlimb suspension or spaceflight. *J Physiol Sci* 58: 413–417.

Lepper C., Partridge T.A., Fan C-M. / An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration // *Development.* 2011. 138(17): 3639–3646.

Buckingham M. Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 2001 Aug;11(4):440-8.

Таблица.

Ген	Последовательности олигонуклеотидов		Длина ПЦР-фрагмента	Номер последовательности в GenBank	Температура отжига
	Прямой праймер	Обратный праймер			
<i>RPL19M</i>	5'-agggtactgccaatgctcgga-3'	5'-ccttgacagagcttgatgatc-3'	326 н.о.	XM_006532610.1	60°C
<i>HPRTM</i>	5'-gctggtgaaaagacctct-3'	5'-cacaggactagacacctgc-3'	249 н.о.	NM_013556.2	60°C
<i>Myogenin</i>	5'-tacgtccatcgtgacagcat-3'	5'-tcagctaaattccctcgtgg-3'	263 н.о.	NM_031189.2	60°C