

## СТРУКТУРНІ ЗМІНИ СКЕЛЕТНИХ М'ЯЗІВ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ПОЄДНАНОГО ЗАСТОСУВАННЯ ФІЗИЧНИХ НАВАНТАЖЕНЬ ТА РНК-ІНТЕРФЕРЕНЦІЇ ГЕНА ФАКТОРА, ЩО ІНДУКУЄТЬСЯ ГІПОКСІЄЮ 3 $\alpha$ (HIF3A)

Дроздовська С.Б., Пастухова В.А., Чухрай С.Н., Гавенаускас Б.Л., Досенко В.Є.

Національний університет фізичного виховання і спорту України; Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України; Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

Дроздовська С.Б., Пастухова В.А., Чухрай С.Н., Гавенаускас Б.Л., Досенко В.Є. Структурні зміни скелетних м'язів щурів під впливом поєданого застосування фізичних навантажень та РНК-інтерференції гена фактора, що індукується гіпоксією 3 $\alpha$  (HIF3a) // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 2. – С. 44-47.

Досліджено зміни структури скелетних м'язів під впливом фізичних навантажень аеробної спрямованості та під дією поєданого застосування фізичних навантажень і РНК-інтерференції гена фактора, що індукується гіпоксією 3 $\alpha$ . Виявлено, що поєднання аеробного тренування та siRNA-індукованого заглушення гену HIF3 $\alpha$  викликає більш низький приріст кількості мітохондрій у порівнянні з ефектом фізичних навантажень аеробного характеру. Підвищення фізичної витривалості, що виникає при застосуванні РНК-інтерференції гена HIF3 $\alpha$ , супроводжується порушенням структурної цілісності м'язових волокон.

**Ключові слова:** скелетні м'язи, фізичні навантаження, РНК-інтерференція, мітохондрії

Дроздовская С.Б., Пастухова В.А. Чухрай С.Н., Гавенаускас Г.Л., Досенко В.Е. Структурные изменения скелетных мышц крыс под влиянием сочетанного применения физических нагрузок и РНК-интерференции гена фактора, индуцированного гипоксией 3 $\alpha$  (HIF3A) // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 2. – С. 44-47.

Исследованы изменения структуры скелетных мышц под влиянием физических нагрузок аэробной направленности и под действием сочетанного применения физических нагрузок и РНК-интерференции гена фактора индуцируемого гипоксией 3 $\alpha$ . Выведено, что сочетание аэробной тренировки и siRNA - индуцированного подавления гена HIF3 $\alpha$  вызывает более низкий прирост количества митохондрий по сравнению с эффектом физических нагрузок аэробного характера. Повышение физической выносливости, возникающее при применении RNA-интерференции гена HIF3 $\alpha$ , сопровождается нарушением структурной целостности мышечных волокон.

**Ключевые слова:** скелетные мышцы, физические нагрузки, РНК-интерференция, митохондрии

Drozovska S.B., Pastukhova V.A., Chukhray S.N., Gavenauskas B.L., Dosenko V.E. The influence of combined use of physical exercise and RNA-interference of factor gene induced by hypoxia 3 $\alpha$  (HIF3A) on the structural changes in skeletal muscle in rats // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 2. – С. 44-47

The changes of the structure of skeletal muscle under the influence of aerobic exercise direction and under the influence of combined use of physical activity and RNA-interference factor gene induced by hypoxia 3 $\alpha$  were observed. We found that a combination of aerobic exercise and siRNA - induced gene suppression HIF3 $\alpha$  causes a lower increase in the number of mitochondria compared with the effect of aerobic exercise. Increased exercise capacity due to using RNA-interference gene HIF3 $\alpha$ , is accompanied by the damage of myofibrils.

**Key words:** skeletal muscle, exercise, RNA- interference, mitochondria

Структура скелетних м'язів є відображенням їх функцій. Під впливом фізичних навантажень у скелетних м'язах відбуваються структурні перебудови, які, з одного боку, залежать від інтенсивності та обсягу навантажень, з іншого, відображають характер адаптаційних процесів, що відбуваються у м'язах [1, 2].

Однією з найважливіших, генетично детермінованих фізичних якостей, що зчиняють вирішальний вплив на результативність виступів спортсменів у видах спорту з переважно аеробним енергозабезпеченням є витривалість. Тренування, спрямовані на підвищення витривалості, сприяють підвищенню резистентності м'язів до втоми, обумовленої збільшенням кількості мітохондрій і капілярів, збільшенням їх щільності [4]. У ході тренувань на витривалість відбувається як трансформація типу м'язових волокон, так і перетворення структурних білків [7]. Зміни

кількості та складу білків викликані перетвореннями, що відбуваються у ДНК м'язових волокон та пов'язані з змінами генної транскрипції і трансляції РНК [3].

Фізична витривалість залежить від адекватної адаптації організму до гіпоксії навантаження. Одним з вирішальних факторів цього процесу є фактор, що індукується гіпоксією (HIF). Цей білок є регулятором транскрипції багатьох генів-мішеней, що кодують білки, залучені до процесу адаптації до гіпоксії [5, 6]. Існують декілька ізоформ HIF $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$ , HIF3 $\alpha$ ). Встановлено, що гіпоксична гіпоксія на протязі 2 годин викликає збільшення рівня HIF-3 $\alpha$  mRNA, тоді як рівень HIF-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ , and -2 $\alpha$  не змінюється [4], що дало змогу висловити припущення, що HIF-3 $\alpha$  є швидко реагуючим компонентом HIF системи, для захисту від гіпоксичних ушкоджень. Але

роль гену HIF-3 $\alpha$  у розвитку процесів адаптації до довготривалих фізичних навантажень, під час яких розвиваються гіпоксичні стани, не досліджувалася.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконувалася згідно теми 2.22 зведеного плану науково-дослідної роботи у сфері фізичної культури і спорту на 2011 – 2015 рр.

**Мета** - вивчити морфологічні зміни у скелетних м'язах щурів з заглушеним геном HIF-3 $\alpha$  та дослідити вплив експресії цього гену на процеси адаптації до фізичних навантажень, спрямованих на розвиток витривалості.

**Матеріали та методи дослідження.** При проведенні дослідження були дотримані всі критерії, правила та технологічні стандарти по роботі з тваринами. Експеримент проводився на дорослих самцях щурів Fisher (вагою від 200 до 220 г). Вплив введення siRNA на фізичний стан щурів оцінювали в трьох групах: 1 група – контрольна (КГ); 2 група – щури, які виконували фізичні навантаження (плавання протягом 5 тижнів, тривалістю 30 хв. на день) (ЕГ1), 3 група – щури, які виконували фізичні навантаження на фоні введення siRNA (ін'єкція у хвостову вену на четвертому та п'ятому тижні тренування) (ЕГ2). Кожна експериментальна група складалась з 7 щурів.

Щури плавали по 3 особини у резервуарі, з навантаженням  $7,0 \pm 1,3\%$  від маси тіла, що відповідає  $70-75\%$   $\text{VO}_2 \text{max}$ , тривалістю 30 хв. кожного дня, протягом 35 днів [2]. Тест на визначення фізичної витривалості, яку оцінювали за максимальним часом плавання з вантажем  $14,0 \pm 1,2\%$  від маси їх тіла до стану виснаження проводили перед початком тренування, перед першою та другою ін'єкціями, а також, через 3 дні після них.

На четвертому та п'ятому тижнях курсу плавання з вантажем тварини отримували ін'єкції siRNA у хвостову вену у дозі 48 мг. Щури контрольної групи отримували ін'єкцію  $0,65\%$  розчину NaCl (саліна) у кількості 1 мл. Ефективність РНК-інтерференції була оцінена за допомогою методу Real-time PCR у м'язах з переважанням швидкоскоротливих (m. gastrocnemius) та повільноскоротливих м'язових волокон (m. soleus).

Загальна РНК виділялася за допомогою методу фенольно-хлороформної екстракції (Trizol RNA Prep 100, Isogen, Росія). Концентрацію RNA визначали за допомогою NanoDrop спектрофотометра ND1000 (NanoDrop Technologies Inc, USA). Зворотну транскрипцію проводили із використанням набору RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit ("Fermentas", Литва), додаючи 1,2–1,5 мг загальної RNA і рандомний гексамерний праймер. Полімеразну ланцюгову реакцію (Real-time PCR) виконували з використанням приладу Applied Biosystems 2700, PerkinElmer, USA, використовуючи специфічні праймери для кожного гену.

Двохланцюгову siRNA (sense 5'-UGU UCA GCG AAA UAU AAC CUU-3' and antisense 5'-UUA CAA GUC GCU UUA UAU UGG-3'), HIF3 $\alpha$  siRNA (sense 5'-AGU AUC AUC UGC GUC CAC UUU-3', and antisense 5'-AGU GGA CGC AGA UGA UAC UUU-3') синтезовано з відповідних олігонуклеотидів Metabion (Germany).

Морфометричні дані отримані на напівавтоматичної устрої обробки графічних зображень за допомогою програми «Органела». Визначалися об'ємна

та кількісна щільності, площа зрізу та фактор форми мітохондрій. Для кожного показника визначалися його середня величина, похибка середнього, середнеквадратичне відхилення, показник точності.

Для електронномікроскопічного дослідження матеріал фіксували у  $2,5\%$  розчині глютарового альдегіду з дофіксацією у  $1\%$   $\text{OsO}_4$  за Колфільдом. Зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації ( $70\%$ ,  $80\%$ ,  $90\%$ ,  $100\%$ ) та ацетоні. Просочували та заливали у суміш епон-аралдит. Ультратонкі зрізи з блоків отримували на ультратомі LKB III (Швеція) та контрастували насиченим розчином  $2\%$  уранілацетату на  $70^\circ$  етиловому спирті та цитратом свинцю. Препарати досліджували та фотографували під електронним мікроскопом ПЕМ – 125К.

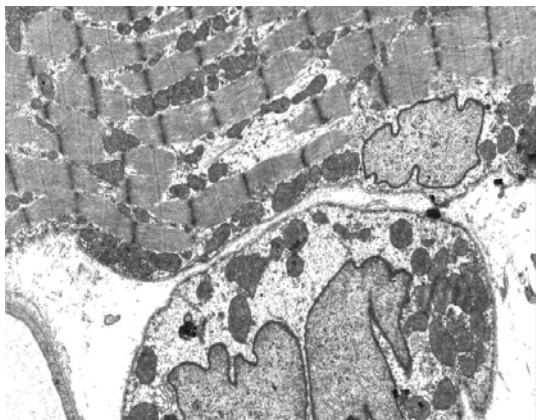
**Отримані результати та їх обговорення.** Після п'яти тижнів тренування результати тестування виявили, що введення siRNA на фоні тренування значно сильніше підвищує витривалість ніж тренування. Так, результати часу плавання в ЕГ2 становили  $13,43 \pm 0,53$  хв, що на  $49\%$  більше ніж в контрольному плаванні ( $p < 0,05$ ), тоді як в ЕГ1 він становив лише  $8,98 \pm 0,25$  хв, що лише на  $38\%$  ( $p < 0,05$ ) вище ніж у контролі. Ці результати свідчать про значне збільшення витривалості під поєднаною дією RNA-інтерференції та тренування на витривалість.

Вплив фізичних навантажень та поєднана дія фізичних навантажень та інтерференції призвели до різноспрямованих змін у м'язах. Фізичне навантаження викликало зменшення маси та об'єму працюючих м'язів. Маса литкового м'язу виявилась на 60 г, а товщина на  $0,3$  мм менше контрольних, тоді як розміри камбалоподібного м'язу майже не змінилися. Відомо, що тренування спрямовані на розвиток витривалості, можуть знижувати площу поперечного перерізу міофібрил та самих волокон, що сприяє кращій дифузії метаболітів і харчових речовин між скоротливими філаментами і цитоплазмою та інтерстиціальною рідиною [1]. Крім того, литковий м'яз за переважанням білих м'язових волокон належить до швидкоскоротливих м'язів, які є менш пристосованими до роботи аеробного характеру, спрямованої на розвиток витривалості. Тому морфометричні зміни цього м'язу мають фізіологічне обґрунтування. А камбалоподібний м'яз за видом волокон належить до повільноскоротливих м'язів, які краще адаптовані до роботи аеробного характеру.

Використання інтерференції призвело до зростання товщини литкового м'язу на  $19,2\%$  у порівнянні з контролем і на  $26,5\%$  ( $p < 0,01$ ) у порівнянні з поодиноким впливом фізичного навантаження. Маса литкового зменшилась у порівнянні з контролем на  $40\%$ , але переважає масу м'язів щурів, що знаєди поодинокого впливу фізичного навантаження на  $6\%$ . Зміни камбалоподібного м'язу були не такі виразливі. Товщина м'язу зросла на  $11\%$  у порівнянні з контролем і на  $4\%$  у порівнянні з II групою.

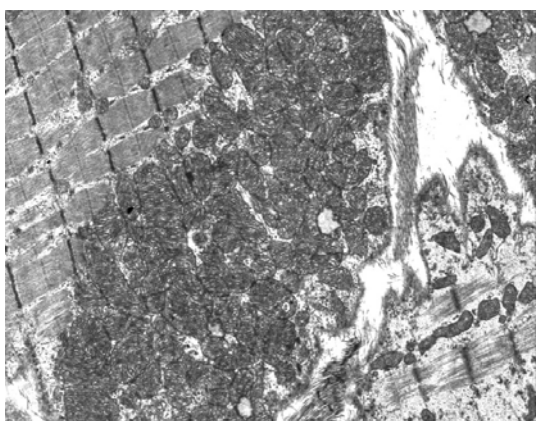
При довготривалому фізичному навантаженні відбулися зміни ультраструктурної організації м'язів тварин. Так, у литковому м'язі тварин переважають компенсаторно-пристосувальні процеси. Ядра у симпластах таких тварин мають чітко структуровану каріолему, яка утворює глибокі інвагінації, що збільшує площу їх поверхні, а хроматин рівномірно заповнює каріоплазму без формування електроннощільних скупчень, що є ознакою переважання еухрома-

тину. Подекуди спостерігаються два розташованих поряд ядра. Все це свідчить про активні транскрипційні процеси при фізичному навантаженні. Міофібрили без ознак перескорочення, формують типові саркомери. Лише в окремих ділянках відмічаються незначне розходження міофібрил та їх лізис (рис. 1).



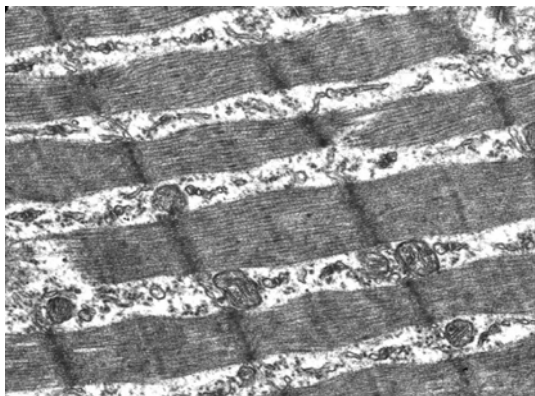
**Рис.1.** М'язові волокна у литковому м'язі щурів після довготривалого фізичного навантаження. Міофібрили, мітохондрії, ядро. Електронномікроскопічне фото. Зб.: 12000.

Мітохондрії при довготривалому фізичному навантаженні розташовуються підсарколемально та поміж саркомерами, вони різняться за формою та розмірами. Загалом їх кількість дорівнює  $(93,19 \pm 16,03) \times 10^{-2}$  в  $1 \mu\text{м}^3$ , що значуще більше, ніж у литковому м'язі інтактних тварин (табл.). При аналізі розподілу їх за цим показником видно, що таке збільшення відбувається внаслідок суттєвого зниження числа ділянок, які були притаманні інтактним щурам, та появи ділянок майже повністю заповнених мітохондріями (рис. 2).

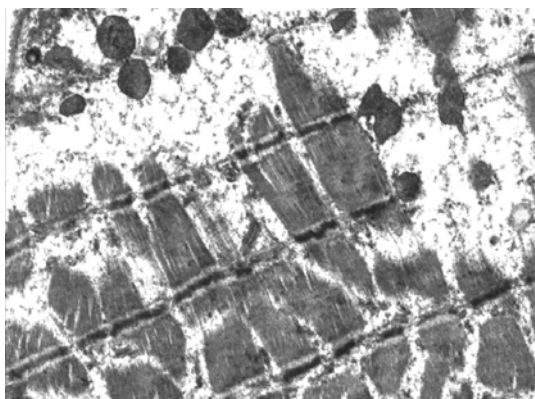


**Рис. 2.** М'язові волокна у литковому м'язі щурів після довготривалого фізичного навантаження. Скупчення мітохондрій. Електронномікроскопічне фото. Зб.: 12000.

Збільшується не тільки кількість, а й середня площа зрізу мітохондрій у порівнянні з інтактними тваринами (табл.). Це обумовлено появою великих за розмірами органел, які не спостерігалися у інтактних щурів, на фоні зменшення (майже втричі) числа найдрібніших мітохондрій. Здебільшого мітохондрії утворюють підсарколемальні скупчення або ланцюжки поміж волокон (рис. 3), як це характерно для кардіоміоцитів. Серед мітохондрій в цій групі тварин переважають округлої форми органели, що підтверджується показником фактора форми, який наближений до 1 (табл.).



**Рис. 3.** М'язові волокна у литковому м'язі щурів після довготривалого фізичного навантаження. Міофібрили, мітохондрії. Електронномікроскопічне фото. Зб.: 20000.



**Рис. 4.** М'язові волокна у литковому м'язі щурів, які отримували siRNA на фоні довготривалого фізичного навантаження. Ознаки деструкції міофібрил. Електронномікроскопічне фото. Зб.: 16000.

Про функціонування мітохондрій у напруженому режимі свідчить і наявність в них великої кількості розташованих паралельно крист (рис. 3).

Застосування siRNA на фоні фізичного тренування викликало деструктивні зміни міофібрил – це і локальні розходження, і лізис. Деструкція міофібрил варіює за виразністю. В одних саркомерах лізис поширюється лише на окремі міофібрили, в інших деструкції підлягають I- та H-диски і навіть цілі саркомери, внаслідок чого пучок міофібрил втрачав свою цілісність (рис. 4).

Морфометричний аналіз показав, що насиченість мітохондріями різних ділянок симпластів при застосуванні siRNA на фоні фізичного тренування статистично однакова і загалом дорівнює  $(26,01 \pm 7,33) \times 10^{-2} / \mu\text{м}^3$ , що значуще не відрізняється від контролю (див. табл.). В той же час це суттєво відрізнялося від групи тварин, де фізичне навантаження викликало значну гіперплазію. Збереженість кількісної щільності мітохондрій на контрольному рівні після застосування siRNA супроводжувалось їх гіпертрофією, що суттєво відрізняло їх від інтактних тварин. В більший мірі збільшувалися розміри мітохондрій, які розташовувалися периферійно, де площа їх зрізу дорівнювала  $(36,51 \pm 1,99) \times 10^{-2} \mu\text{м}^2$ . В центральних ділянках середня площа мітохондрій складала  $(26,03 \pm 1,92) \times 10^{-2} \mu\text{м}^2$ . Загалом цей показник дорівнює  $(31,27 \pm 1,06) \times 10^{-2} \mu\text{м}^2$ , а об'ємна щільність -  $8,66 \pm 1,52 \%$ .

Таблиця. Морфометричні показники мітохондрій скелетних м'язів в різних групах щурів

М'яз	Група тварин	Об'ємна щільність МТ, %	Кількісна щільність МТ, 10 <sup>-2</sup> /мкм <sup>3</sup>	Площа зрізу МТ, 10 <sup>-2</sup> мкм <sup>2</sup>	Фактор форми
m. gastrocnemius	КГ	3,37±0,57	22,2±5,18	15,93±0,67	0,83±0,01
	ЕГ1	27,37±7,17	93,19±16,03	43,68±1,88	0,82±0,01
	ЕГ2	8,66±1,52	29,63±2,36	31,27±1,06	0,81±0,01
m. soleus	КГ	3,72±0,79	27,29±0,59	16,03±1,06	0,80±0,1
	ЕГ1	17,49±7,07	29,44±9,27	42,49±2,54	0,78±0,01
	ЕГ2	2,60±0,75	16,37±2,59	22,15±1,63	0,68±0,1

Кількісна щільність мітохондрій у камбалоподібному м'язі за середніми показниками значуще не відрізняється від контролю в обох зонах, але при фізичному навантаженні похибка середньої величини дуже велика. Це є результатом нерівномірного розподілу мітохондрій в різних ділянках симпласту. При фізичному навантаженні і підсарколемально, і міжфібрилярно переважають ділянки з найменшим числом цих органел (до  $20 \times 10^{-2}$  в мкм<sup>3</sup>). В той же з'являються ділянки, де їх кількість значна ( $60-80 \times 10^{-2}$  / мкм<sup>3</sup>), тоді як у інтактних тварин переважають ділянки з середнім числом ( $20-40 \times 10^{-2}$  / мкм<sup>3</sup>) мітохондрій. Хоча загальна кількість мітохондрій в м'язових волокнах камбалоподібного м'язу не збільшується, за рахунок їх значної гіпертрофії значуще (майже в 4 рази) збільшується їх об'ємна щільність. Як і у контролі більший об'єм мітохондрій займають у підсарколемальній зоні симпластів.

В камбалоподібному м'язі введення siRNA на фоні фізичного навантаження також посилювало структурну мозаїчність симпластів, яка мала свої особливості. З одного боку, в камбалоподібному м'язі більше число симпластів, ніж у литковому, містило міофібрили без виразних деструктивних змін. Останні проявлялися, головним чином, незначними розходженнями міофібрил. В той же час, з'являлися волокна із значними деструктивними змінами саркомерів, які поширювалися інколи на весь симпласт на відміну від литкового м'язу, де морфологічні ознаки порушень скорочувальних властивостей та деструкції міофібрил обмежувалися окремими ділянками.

Мітохондрії мають матрикс підвищеної електронної щільності, в якому розташовується незначне число крист. Органели невеликі за розмірами, здебільшого дещо витягнутої неправильної форми внаслідок інвагацій зовнішньої мембрани. Це підтверджується морфометричним аналізом: фактор форми дорівнює  $0,68 \pm 0,1$ , що значуще менше показника у контролі ( $0,80 \pm 0,1$ ) та після фізичного навантаження ( $0,73 \pm 0,1$ ). Придушення гену HIF3A сприяє тому, що при довготривалому фізичному навантаженні вони набувають витягнутої неправильної форми. Останнє може забезпечувати збільшення площі поверхні мітохондрій в умовах напруженого функціонування. При цьому, розміри самих мітохондрій, тобто площа їх зрізу значуще, але незначно збільшується у порівнянні з контролем, в більшій мірі в центральних ділянках. В результаті одночасного збільшення розмірів та зменшення кількості мітохондрій, об'єм, який вони займають у цитоплазмі, не відрізняється від контрольних показників. В той же час кількісні характеристики мітохондрій при фізичному навантаженні при застосування siRNA та без нього суттєво відрізняються. Заглушення гену HIF3A запобігало розвитку гіпертрофії, якої зазнавали мітохондрії при фізич-

ному навантаженні і на периферії, і міжфібрилярно, і загалом по усьому симпласту. Середні показники площі зрізу та розподіл мітохондрій за цим показником значуще відрізняються у групах, що порівнюються.

**Висновки:** Застосування siRNA – індукованого приглушення гену HIF3a призводить до зростання фізичної працездатності у щурів, що свідчить про негативний ефект активації цього гену для розвитку адаптації до гіпоксії навантаження. Посаднання аеробного тренування та siRNA – індукованого приглушення гену HIF3a викликає більш низький приріст кількості мітохондрій у порівнянні з ефектом поодинокого аеробного тренування та порушення структурної цілісності м'язових волокон. На основі результатів даного дослідження можна висунути гіпотезу про захисний, протективний, гальмівний ефект роботи даного гену для механізмів адаптації до м'язової роботи. Дані питання вимагають подальших досліджень.

#### ЛІТЕРАТУРА:

- Мак-Комас А.Дж. Скелетные мышцы / А.Дж. Мак-Комас // Киев: Олимпийская литература, 2001. - 407 с.
- Радзівський П. О. Механізми адаптації до нормобаричної гіпоксії в курсі інтервального гіпоксичного тренування у висококваліфікованих спортсменів / П. О. Радзівський // Фізіол. журн. - 2005. - № 2. - С. 9096.
- Уилмор Дж.Х. Физиология спорта и двигательной активности / Дж.Х. Уилмор, Д.Л. Костилл // Киев: Олимпийская литература, 1997. - 504 с.
- Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity / P. J. Adhihetty, I. Irrcher, A.-M. Joseph et al. // Experimental Physiology. - 2003. - Vol. 88, №1. - P. 99-107.
- Heidbreder M. Hypoxia rapidly activates HIF-3α mRNA expression / M. Heidbreder, F. Fröhlich, O. Jöhren et al. // FASEB J. - 2003. - Vol.17. - P.1541-1543.
- Hoppeler H. Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle / H. Hoppeler // Int. J. Sports. - Med. - 1986. - Vol.7. - P.187-204.
- Klitgaard H. Myosin heavy chain composition of single fibres from m.biceps brachii of male body builders / H.Klitgaard, M. Zhou, E.A. Richter // Acta Physiologica Scandinavica. - 1990. - Vol. 140. - P.175-180.
- Lundby C. The response of human skeletal muscle tissue to hypoxia / C. Lundby, J.A.L. Calbet, P. Robach // Cellular and Molecular Life Sciences. - 2009. - Vol. 66, № 22. - P. 3615-3623.
- Loss of Skeletal Muscle HIF-3α results in Altered Exercise Endurance / S.D. Mason, R.A. Howlett, M.J. Kim et al. // Plos. Biology. Issue. - 2010. - Vol. 2. - P. 1540-1547.

Надійшла 23.01.2013 р.

Рецензент: проф. С.А.Кашенко