

MILAN ČABRIĆ

Filozofski fakultet

OOUR Prirodoslovno-matematičke znanosti, Split

ASIM REŠIĆ

Opća bolnica, Split

Izvorni znanstveni članak

UDC 591.86:612.7

Primljeno 23. 9. 1985.

**MORFOMETRIJSKA ANALIZA NUKLEUSA
I MIONUKLEUSNE DNA KOD SKELETNIH
MIŠIĆA SPORTISTA I NESPORTISTA OBA
POLA**

Biopsija / Mionukleusi / DNA / Skeletni mišići / Sportisti / Nesportisti

Kod muškaraca dobijene su relativno značajne statističke razlike između grupe nesportista i pojedinih grupa sportista (fudbaleri, karatisti i rukometaši) u volumenu mionukleusa i koncentraciji DNA kako po jednom mionukleusu tako i na jedinicu volumena mišićnog tkiva. Između grupa studentkinja (grupe nesportista i sportista) nije dobijena značajnija statistička razlika među ispitivanim pokazateljima.

1. UVOD

Nukleus, kao centar biosinteze proteina, a u tom kontekstu osobito DNA, predstavlja ne samo stožer plastičnog metabolizma ćelije već iz njega proističe i morfološka osnova svake buduće funkcije. Zbog toga je, u to smo duboko ubedeni, proučavanje promena na ovim ćelijskim strukturama ključ za razumevanje osnovnih morfo-funkcionalnih karakteristika, kako ćelija i tkiva tako i organizma u pojedinim fazama njegovog rasta, razvoja, hipa i hiperfunkcije.

Još u klasičnim radovima Benninghoffa (1949, 1953) i Puffa (1952) detektovana su „funkcionalna povećanja nukleusa“, koja je Eichner (1952) okarakterisao kao „radnu hipertrofiju nukleusa“. Caspersson (2) je među prvima ukazao da promena obima nukleusa predstavlja jedan od najvažnijih indikatora ćelijske funkcije: hiperfunkcija izaziva povećanje, a hipofunkcija smanjenje obima nukleusa. Bilo je vrlo logično zaključiti, što je, uostalom, Stöcker (1963) u svom već klasičnom radu potvrdio, da se obim nukleusa proporcionalno povećava sa povećanjem biosinteze proteina u ćeliji. Postalo je jasno, što su potvrdili Commoner (3), Monnickendam i Ballis (13) i drugi, da promene veličine nukleusa moraju pratiti i promene njegovog genoma, tj. DNA. Veličina genoma, kako navodi Olme (14) ispoljava se kroz tzv. „nukleotipni efekat“, koji se, zapravo, ogleda u fenotipskom uticaju na sintezu proteina, bez bilo kakvih promena u informacionom sadržaju DNA.

Osnovni cilj ovog istraživanja je, kao uostalom i jednog ranijeg rada Čabrića i Jamesa (4), da se kvantifikuju promene genoma mišićnih ćelija u zavisnosti od stepena njihove funkcije. Polaznu osnovu predstavljalo je istraživanje Davida (10), koji je ustanovio da somatske ćelije čoveka sadrže 0,04 pikograma DNA po svakom kubnom mikrometru nukleusa. Poznavanjem ove vrednosti i utvrđivanjem nekih relevantnih morfometrijskih karakteristika mionukleusa (njihovu gustinu i volumen) dobijene su kvantitativne vrednosti prosečne koncentracije DNA u mionukleusima, kao i prosečne koncentracije DNA na jedinicu zapremine mišićnog tkiva.

Ovaj rad, zajedno sa već spomenutim istraživanjem Čabrića i Jamesa (4), predstavlja, koliko nam je poznato, jedinstveni pokušaj da se morfometrijskim metodama proceni koncentracija DNA u somatskim ćelijama.

2. METODI ISTRAŽIVANJA**2.1. Uzorak ispitanika**

Uzorak je bio sastavljen od 33 studenta telesnog odgoja Filozofskog fakulteta u Splitu. Od toga je bilo 24 studenta i 9 studentkinja. Prosečna starost muškaraca iznosila je $21,6 \pm 1,5$ (SD) godina, a devojaka $19,6 \pm 0,6$ godina.

Svi ispitanici su bili podeljeni na grupe nesportista i aktivnih sportista. Tako su među muškim ispitanicima formirane grupe aktivnih fudbalera, rukometaša i karatista, a kod devojaka grupa sportistkinja, sastavljena od košarkašica i odbojkašica. Prosečna dužina aktivnog bavljenja sportom iznosila je kod grupe fudbalera $6,6 \pm 2,6$, a rukometaša $6,2 \pm 2,3$, karatista $6,8 \pm 3,5$ i devojaka sportistkinja $4,5 \pm 2,1$ godina.

2.2. Biopsija i priprema tkiva

Svim ispitanicima uzet je biopsijski materijal iz predela mišića vastus lateralis, a po metodici koju je opisao Bergström (1).

Pre biopsije izvršena je lokalna anestezija 2%-tnim Xylocain-om. Nakon toga izvršena je longitudinalna incizija od oko 5–10 mm. Biopsija je obavljena uz pomoć specijalnih igala.

Tkivo je fiksirano u 3% gluteraldehidu ($C_5H_8O_2$), rastvorenom u 0,1 M fosfatnom buferu pri pM 7,4. Nakon toga tkivo je post-fiksirano u 2% vodenom rastvoru osmium tetroksida u toku jednog sata i pri temperaturi od $4^\circ C$, dehidrirano u alkoholu (od 25–100%) i ukalupljeno u Araldit.

Za potrebe elektronske mikroskopije sečene su ultratanke kriščiće mišićnog tkiva, približne veličine od 250 Å, koje su potom kontrastovane 3% uranil acetatom i olovo citratom (Palade, 15).

3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Na tabeli 1 prikazane su detektovane vrednosti volumena mionukleusa (V), broja mionukleusa na jedinicu volumena mišićnog tkiva (N_V), prosečne koncentracije DNA po jednom mionukleusu (DNA_C) i prosečne koncentracije DNA na jedinicu volumena skeletnog mišića (DNA_K) kod studenata nespportista, fudbalera, karatista i rukometaša.

Prosečna izmerena vrednost volumena mionukleusa bila je kod grupe studenata—nespportista $193,08 \pm 47,41$ (SD), grupe fudbalera $284,20 \pm 79,81$ ($P < 0,05$), karatista $320,96 \pm 133,87$ ($P < 0,1$) i rukometaša $317,80 \pm 95,67 \mu\text{m}^3$ ($P < 0,02$).

Srednja gustina mionukleusa iznosila je kod studenata—nespportista $3,082 \pm 0,557$, fudbalera $2,670 \pm 0,375$, karatista $2,90 \pm 0,22$ i rukometaša $3,037 \pm 0,545 \text{ mm}^{-3} \times 10^4$ (razlike nisu bile statistički značajne).

Koncentracija DNA po jednom nukleusu iznosila je, u proseku, kod grupe nespportista $7,12 \pm 1,90$, grupe fudbalera $11,37 \pm 3,19$ ($P < 0,05$), karatista $12,84 \pm 5,35$ ($P < 0,1$), rukometaša $12,71 \pm 3,83 \text{ pg/N}$ ($P < 0,02$).

Srednja koncentracija DNA na jedinicu zapremine mišićnog tkiva procenjena je kod grupe nespportista na $24,04 \pm 8,47$, grupe fudbalera $29,84 \pm 7,71$ (razlika nije statistički značajna), grupe karatista $36,80 \pm 14,67$ ($P < 0,1$) i grupe rukometaša $38,80 \pm 14,93 \text{ pg/mm}^{-3} \times 10^4$ ($P < 0,1$).

Na tabeli 2 prikazane su prosečne vrednosti ispitivanih pokazatelja kod grupa studentkinja—nespportista i studentkinja—sportistkinja (košarkašica i odbojkašica).

Izmereni srednji volumen mionukleusa bio je kod nespportistkinja $293,62 \pm 32,42$, a sportistkinja $289,07 \pm 55,93 \mu\text{m}^3$. Gustina mionukleusa iznosila je kod nespportistkinja $3,75 \pm 0,44$, a sportistkinja $4,27 \pm 0,52 \text{ mm}^{-3} \times 10^4$. Prosečna koncentracija DNA po jednom nukleusu iznosila je kod nespportistkinja $11,74 \pm 1,30$, a kod sportistkinja $11,56 \pm 2,24 \text{ pg/N}$. Srednja koncentracija DNA na jedinicu volumena mišićnog tkiva procenjena je kod nespportistkinja na $44,08 \pm 7,31$, a kod grupe studentkinja—sportista na $48,90 \pm 7,49 \text{ pg/mm}^{-3} \times 10^4$. Sve dobijene razlike nisu statistički značajne.

4. DISKUSIJA

Kod grupe muškaraca dobijena je relativno značajna statistička razlika u volumenu mionukleusa i to između studenata—nespportista s jedne strane i studenata—sportista s druge strane. Uostalom, to su očekivane razlike, potvrđene u nizu naših ranijih istraživanja (Čabrić i James, 5, 6, 7, 8, 9 i James i Čabrić, 11, 12). Kod grupe studentkinja, ta razlika nije značajna. Međutim, treba imati u vidu činjenicu da je podela na grupe studenata—nespportista krajnje uslovna. Naime, u pitanju su studenti telesnog odgoja, relativno intenzivno fizički opterećivani u toku svakodnevne nastave iz praktičnih predmeta, koji su, sem toga, i selekcionisani prema svojim fizičkim predispozicijama. S tim u vezi može se pretpostaviti da među studentkinjama „nespportistima“ i sportistima nema značajnije razlike u stepenu svakodnevne fizičke aktivnosti, odnosno da je ta razlika manja nego među istim grupama muškog pola. Uostalom, studentkinje—sportašice

imaju relativno mali sportski staž. Smatramo da u tom kontekstu treba posmatrati i sve ostale dobijene vrednosti ispitivanih pokazatelja.

Intenzivnu mišićnu aktivnost prati, po pravilu, pojava proliferacije mionukleusa (Čabrić i James, 5, 6, 7, 8 i 9, James i Čabrić, 11, 12). Međutim, u ovom istraživanju nismo dobili značajniju razliku u mionukleusnoj frekvenciji, mada su zabeležene vrednosti kod svih grupa dosta visoke. Verovatno ovu činjenicu treba posmatrati u sklopu ranije iznete konstatacije o uslovnoj podeli na grupe sportista i nespportista?

Kod grupe muškaraca uglavnom je dobijena značajna statistička razlika kako prosečne koncentracije DNA po jednom nukleusu, tako i koncentracije DNA na jedinicu zapremine mišićnog tkiva između studenata—nespportista i studenata aktivnih sportista. Između grupa studentkinja ta razlika postoji ali nije statistički značajna. Pitanje je, međutim, u kolikoj meri na taj rezultat utiče relativno skromni uzorak ispitanica?

Dobijeni rezultati koncentracije DNA se generalno uklapaju u rezultate dobijene u jednom ranijem istraživanju sprovedenom na skeletnom, srčanom i dijafragmalnom mišićnom tkivu kod treniranih i netreniranih životinja (Čabrić i James, 4).

Zaključak

U sprovedenom istraživanju, koje je obuhvatalo 24 studenata telesnog odgoja (devet nespportista i po pet fudbalera, rukometaša i karatista) i devet studentkinja (pet nespportistkinja i četiri aktivne sportistkinje) vršena su morfometrijska istraživanja prosečnog volumena mionukleusa, frekvence mionukleusa i koncentracije DNA po jednom nukleusu, odnosno na jedinicu zapremine skeletnog mišića (m. vastus lateralis).

Kod muškaraca dobijene su relativno značajne statističke razlike između grupe nespportista i pojedinih grupa sportista (fudbaleri, karatisti i rukometaši) u volumenu mionukleusa i koncentraciji DNA kako po jednom mionukleusu tako i na jedinicu volumena mišićnog tkiva. Između grupa studentkinja (grupe nespportista i sportista) nije dobijena značajnija statistička razlika među ispitivanim pokazateljima.

DOBIJENE VREDNOSTI PROSEČNOG VOLUMENA MIONUKLEUSA (V), BROJA MIONUKLEUSA NA JEDINICU VOLUMENA MIŠIČNOG TKIVA (N_V), PROSEČNE KONCENTRACIJE DNA PO JEDNOM MIONUKLEUSU (DNA_c) I PROSEČNE KONCENTRACIJE DNA NA JEDINICU VOLUMENA SKELETNOG MIŠIĆA (DNA_k) KOD POJEDINIH GRUPA MUŠKIH ISPITANIKA

No	NESPORTISTI				FUDBALERI				KARATISTI				RUKOMETAŠI			
	(V) μm^3	(N_V) $mm^{-3} \times 10^4$	DNA_c pg/N	DNA_k pg/ $mm^{-3} \times 10^4$	(V) μm^3	(N_V) $mm^{-3} \times 10^4$	DNA_c pg/N	DNA_k pg/ $mm^{-3} \times 10^4$	(V) μm^3	(N_V) $mm^{-3} \times 10^4$	DNA_c pg/N	DNA_k pg/ $mm^{-3} \times 10^4$	(V) μm^3	(N_V) $mm^{-3} \times 10^4$	DNA_c pg/N	DNA_k pg/ $mm^{-3} \times 10^4$
1	127,0	3,148	5,080	15,991	206,5	3,148	8,260	26,002	214,9	3,117	8,596	26,794	374,8	2,401	14,992	35,996
2	238,0	2,899	9,520	27,598	367,4	2,858	14,696	42,001	175,6	3,018	7,024	21,198	259,1	3,435	10,364	35,600
3	207,7	3,611	8,308	30,000	310,3	2,385	12,412	29,603	461,2	2,602	18,448	48,002	241,6	2,483	9,664	23,996
4	216,7	3,829	8,668	33,189	193,1	2,745	7,724	21,202	458,6	3,053	18,344	56,004	254,1	3,385	10,164	34,405
5	210,1	2,713	8,404	22,800	343,7	2,211	13,748	30,397	294,5	2,716	11,780	31,994	459,4	3,483	18,376	64,004
6	260,7	3,643	10,428	37,990	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	155,0	2,581	6,200	16,002	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	126,0	3,174	5,040	15,997	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	196,5	2,137	7,860	16,797	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
X	193,08	3,082	7,72	24,04	284,20	2,670	11,37	29,84	320,96	2,90	12,84	36,80	317,80	3,037	12,71	38,80
SD	47,41	0,557	1,90	8,47	79,81	0,375	3,19	7,71	133,87	0,22	5,35	14,67	95,67	0,545	3,83	14,93
SE	15,80	0,185	0,63	2,82	35,69	0,167	1,42	3,44	59,87	0,10	2,39	6,55	42,78	0,244	1,71	6,66

Tabela 2

DOBIJENE VREDNOSTI PROSEČNOG VOLUMENA MIONUKLEUSA (V), BROJA MIONUKLEUSA NA JEDINICU VOLUMENA MIŠIČNOG TKIVA (N_V), PROSEČNE KONCENTRACIJE DNA PO JEDNOM MIONUKLEUSU (DNA_c) I PROSEČNE KONCENTRACIJE DNA NA JEDINICU VOLUMENA SKELETNOG MIŠIĆA (DNA_k) KOD GRUPE NESPORTISTKINJA I SPORTISTKINJA

No	NESPORTISTKINJE				SPORTISTKINJE			
	(V) μm^3	(N_V) $mm^{-3} \times 10^4$	DNA_c pg/N	DNA_k pg/ $mm^{-3} \times 10^4$	(V) μm^3	(N_V) $mm^{-3} \times 10^4$	DNA_c pg/N	DNA_k pg/ $mm^{-3} \times 10^4$
1	270,7	3,103	10,828	33,599	240,3	3,995	9,612	38,400
2	270,3	3,699	10,812	39,993	258,3	4,994	10,332	51,598
3	282,7	4,033	11,308	45,605	366,9	3,816	14,676	56,004
4	295,9	4,258	11,836	50,398	290,8	4,264	11,632	49,600
5	348,5	3,644	13,940	50,797	—	—	—	—
X	293,62	3,75	11,74	44,08	289,07	4,27	11,56	48,90
SD	32,42	0,44	1,30	7,31	55,93	0,52	2,24	7,49
SE	14,50	0,19	0,58	3,26	27,97	0,26	1,12	3,74

LITERATURA

- Bergström, J.: Muscle electrolytes in man. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation Suppl., (1962), 66: 11-13
- Caspersson, T.: Cell, growth and cell function. W.W. Norton, New York, 1950.
- Commoner, B.: Roles of deoxyribonucleic acid in inheritance. Nature, (1964), 202: 960-968.
- Čabrić, M. i N.T. James: Kvantitativne promene genoma skeletnih, dijafragmalnih i srčanih mionukleusa izazvanih hroničnom hiperkinezijom. Kineziologija, (1965), 1:
- Čabrić, M. i N.T. James: Quantitative studies on Japanese waltzing Mice. Journal of Anatomy, (1981), 133: 695.
- Čabrić, M. i N.T. James: Quantitative studies on the muscles of exercise trained dogs. Journal of Anatomy, (1981), 133: 696.
- Čabrić, M. i N.T. James: Morphometric analyses on the muscles of exercise trained and untrained dogs. American Journal of Anatomy, (1983), 166: 359-368.
- Čabrić, M. i N.T. James: Stereološka analiza mionukleusa pre i posle intenzivnog mišićnog napreznja. Fizička kultura, (1982), 4: 307-309.
- Čabrić, M. i N.T. James: Stereološka analiza mišićnih vlakana i mionukleusa kod hipokineziranih pasa. Fizička kultura, (1983), 1: 15-17.
- David, M.: Quantitative ultrastructural data of animal and human cells. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1977.
- James, N.T. i M. Čabrić: Quantitative studies on the numerical frequency of myonuclei in the muscles of exercised rats: Evidence against the occurrence of fiber splitting. British Journal Experimental Pathology, (1981), 61: 600-605.

12. James, N.T. i M. Čabrić: Studies on the nuclei of hypertrophic skeletal muscles, *Journal of Anatomy*, (1981), 133: 150–151.
13. Monnickendam, M. i M. Balls: The relationship between cell size, respiration rates and survival of amphibian tissues in long-term organ cultures. *Comp. Biochem. Physiol.*, (1973), 44A: 871–880.
14. Olmo, E.: Nucleotype and cell size in vertebrates: a review. *Bas. Appl. Mistochem.*, (1983), 27: 227–256.
15. Palade, G.E.: A study of fixation for electron microscopy. *Journal Experimental Medicine*, (1952), 95, 285.

Milan Čabrić
Faculty of Arts
Department of Sciences and Mathematics
Split

Asim Rešić
General Hospital
Split

Original scientific paper
UDC 591.86:612.7
Received September 23, 1985.

MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE NUCLEUS AND MYONUCLEUS DNA IN SKELETAL MUSCLES OF ATHLETES AND NON-ATHLETES OF BOTH SEXES

Biopsy / Myonucleus / DNA / Skeletal muscles / Athletes / Non-athletes

This investigation involved 24 students of physical education (9 male non-athletes and 5 each of football players, handball players and karate athletes) and 9 female students (5 non-athletes and 4 active athletes). The morphometric study included the average volume of the myonucleus, frequency of the myonucleus and concentration of DNA per nucleus, i.e. per unit of volume of skeletal muscle (*m. vastus lateralis*).

In men, the obtained statistical differences were significant between the group of non-athletes and individual groups of athletes (football, handball, karate) in the volume of myonucleus and concentration of DNA, per one myonucleus as well as per unit of volume of muscle tissue. Groups of female students did not show a significant statistical difference among the indicators investigated in the study.

Милан Чабрич
Естественно-математическое отделение Философского факультета, Сплит
Асим Решич
Общая больница, Сплит

MORFOMETРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЯДРА И МЫШЕЧНОГО ЯДРА ДНА У МЫШЕЦ СКЕЛЕТА У СПОРТСМЕНОВ И НЕСПОРТСМЕНОВ ОБИХ ПОЛОВ

В настоящем исследовании, в котором приняло участие в качестве испытуемых 24 студентов физической культуры (9 неспортсменов и по пяти футболистов, гандболистов и каратистов) и 9 студенток (5 неспортсменок и 4 спортсменки), проведен морфометрический анализ среднего объема мышечного ядра, его частоты и концентрации ДНА в одном ядре, т.е. в единице объема мышцы скелета.

У мужчин получены относительно достоверные статистические разницы между группами неспортсменов и отдельными группами спортсменов по отношению объема мышечного ядра и концентрации ДНА, как в одном ядре, так и в единице объема мышечной ткани. Между различными группами студенток (спортсменок и неспортсменок) не получена статистически достоверная разница по отношению рассматриваемых параметров.