

MILAN ČABRIĆ

Filozofski fakultet, Studij tjelesnog odgoja u Splitu

NIGEL T. JAMES,Department of Anatomy and Cell Biology,
University of Sheffield,
Sheffield, England

Izvorni znanstveni članak

Primljeno 25. 4. 1985.

UDC 591.86 : 612.73

**KVANTITATIVNE PROMJENE
GENOMA SKELETNIH,
DIJAFRAGMALNIH I SRČANIH
MIONUKLEUSA IZAZVANIH
KRONIČNOM HIPERKINEZIJOM**

Sprovedena trenazna procedura inicirala je hiperplaziju mionukleusa kod skeletnih mišića, mišića dijafragme i leve srčane ventrikule. Hiperplaziju je pratilo odgovarajuće povećanje koncentracije DNP na jedinicu zapremine mišićnog tkiva.

1. UVOD

Još u pionirskim radovima Mirsky i Ris-a (23), a pogotovo u novijim istraživanjima, ukazano je na postojeću korelaciju između koncentracije nukleusne DNK i niza morfo-funkcionalnih karakteristika stanica, kao što su dužina pojedinih staničnih ciklusa (Nagl, 26; Grosset et al., 14), trajanje mitoze (Nagl, 27; Grosset et al., 15), dimenzija stanica (Manfredi Romanini, 21; Olmo, 28, 29, 30; Gupta, 16; Kuramoto, 19) i slično. Ova međuzavisnost, kako smatra Olmo (30), nije slučajna, jer, veličina genoma određuje takozvani »nukleotipni efekat«, koji Bennett (2) definiše kao »stanje nukleusa čiji je fenotipski utjecaj nezavisan od informacionog sadržaja DNK«.

Commoner (6) i Monnickendam et al. (24) ukazuju na tesnu korelaciju između veličine genoma i metaboličkih performansi organizma u celini. Bentley (3), Marescalchi (2) i Gilles (13) smatraju da se (nukleotipni efekat) pretežno ispoljava kroz veću sposobnost adaptacije organizma na uticaje spoljašnje sredine, to jest kroz povećavanje adaptivnih procesa interne homeostaze stanice.

S obzirom da je koncentracija DNK u jednom nukleusu stalna, što je potvrdilo niz biohemijskih analiza (spomenimo samo Capanna et al., 5; Manfredi Romanini et al., 20, 22; Bachmann, 1), to se ovaj efekat pretežno može manifestovati kroz mehanizam hiperplazije nukleusa. Na žalost, hiperplazija mionukleusa hiperfunkcionirajućih mišićnih stanica, detektovana u nizu naših ranijih radova (Čabrić i James, 7, 8, 9, 10, 11; James i Čabrić, 17, 18) nije, do sada, razmatrana sa tog, čini se, izuzetno važnog aspekta. Zbog toga smo u ovom istraživanju, sprovedenom na laboratorijskim pacovima, pokušali da dovedemo u vezu izmerenu nukleusnu frekvencu (gustinu nukleusa) kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja sa biokemijski određenom količinom DNK, procenjenom kod *Rattus norvegicus*-a na 7,6 pikograma* po nukleusu (David, 12).

2. Metodika ispitivanja

Ispitivani uzorak eksperimentalnih životinja bio je sastavljen od 23 laboratorijska pacova linije Sprague Dawley, težine 200—250 grama, muškog pola, odabranih po principu slučajnog uzorka.

Eksperimentalne životinje podeljene su u dve grupe, od kojih je svaka podvrgnuta proceduri doziranog plivanja. U prvoj grupi bilo je ukupno dvanaest pacova, od kojih je šest eksperimentalnih opterećivano plivanjem u toku 35. dana.

U drugoj grupi bilo je pet kontrolnih i šest eksperimentalnih životinja. Eksperimentalne životinje su u toku 28 dana podvrgnute proceduri doziranog plivanja.

U oba eksperimenta pacovi su plivali u bazenu dimenzija 125×100 cm. Dubina bazena iznosila je 50 cm, a temperatura vode je bila 28°C. Sve eksperimentalne životinje plivale su dva puta svaki dan, a vreme između dva perioda plivanja iznosilo je najmanje šest časova.

U prvih šest dana vreme jednokratnog plivanja povećano je za 5 minuta, to jest od početnih 5 do završnih 30 minuta. Nakon toga, sve do završetka eksperimenta, vreme trajanja jednokratnog perioda plivanja nije povećavano.

Nakon plivanja životinje su pažljivo osušene i stavljene u zajednički boks dimenzija 50×38 cm. Temperatura u prostorijama gdje su se nalazili boksovi bila je 20 do 22°C. Osvetljenje je bilo dnevno, a hrana (sastavljena od granulisanog koncentrata) i voda bili su na raspolaganju ad libitum.

* pikogram = 10⁻¹² grama

2.1. Uzimanje i priprema tkiva

Nakon završene eksperimentalne procedure sve kontrolne i eksperimentalne životinje su anestetizirane eterom, izvršena je biopsija (i, na kraju, dekapitacija).

Kod prve grupe pacova uzet je komadić (oko 30 g) mišića extensor digitorum longus-a, a kod druge deo dijafragme i apeks leve srčane ventrikule.

Tkivo je odmah nakon biopsije fiksirano, u toku tri sata, u 3% gluteraldehidu ($C_5H_8O_2$) rastvorenem u 0,1 M fosfatnom puferu pri pH 7,4. Nakon toga je tkivo post-fiksirano u 2% vodenom rastvoru OsO_4 u toku jednog sata pri temperaturi od 4°C, dehidrirano u alkoholu (od 25-100%) i ukalupljeno u Araldit.

2.2. Stereološke metode

Gustina mionukleusa (N_v) određena je po metodi koju su predložili Venable (32, 33) i Ontell (31), a koncentracija DNK na jedinicu zapremine tkiva je procenjena prema originalnoj formuli:

$$DNK_k = (N_v) \times (DNK/N)$$

gde je: (DNK/N) — količina DNK, izražena u pikogramima na jedan nukleus.

3. Rezultati ispitivanja

U tabeli 1 date su vrednosti gustine nukleusa (broja nukleusa na jedinicu zapremine mišića extensor digitorum longus-a) i veličine genoma kod prve grupe pacova. Gustina nukleusa (N_v) kod kontrolnih pacova je $2,28 \pm 0,21$ ($S\bar{x}$), a kod eksperimentalnih $2,99 \pm 0,30$ $mm^{-3} \times 10^4$. Povećanje iznosi 31,1% ($P < 0,1$). Koncentracija DNK iznosila je kod kontrolnih pacova $17,277 \pm 1,652$, a kod eksperimentalnih $22,775 \pm 2,276$ $pg/mm^{-3} \times 10^4$, što predstavlja povećanje od 31,8%.

U tabeli 2 predstavljene su vrednosti gustine mionukleusa dijafragme kod kontrolnih, kao i eksperimentalnih pacova, koji su opterećivani plivanjem u toku 28 dana. Gustina nukleusa kod kontrolnih životinja iznosila je $2,98 \pm 0,31$, a kod eksperimentalnih $4,05 \pm 0,46$ $mm^{-3} \times 10^4$. ($P < 0,1$). Broj nukleusa kod eksperimentalnih pacova je povećan, u odnosu na kontrolne, za 35,9%. Koncentracija DNK na jedinicu zapremine mišićnog tkiva iznosila je kod kontrolnih životinja $22,678 \pm 2,401$, a kod eksperimentalnih $30,767 \pm 3,503$ $pg/mm^{-3} \times 10^4$, što predstavlja razliku od 35,7%.

U tabeli 3 date su vrednosti nukleusne frekvencije i koncentracije DNK na jedinicu zapremine miokarda leve ventrikule, kod kontrolnih i eksperimentalnih pacova. Nukleusna frekvencija to jest gustina nukleusa, iznosila je kod kontrolnih životinja $2,70 \pm 0,22$, a kod eksperimentalnih $3,11 \pm 0,11$ $mm^{-3} \times 10^4$. Razlika nije statistički značajna, mada povećanje iznosi 15,2%. Koncentracija DNK (DNK_k) bila je kod kontrolnih $20,520 \pm 1,695$, a kod eksperimentalnih pacova $23,661 \pm 0,852$ $pg/mm^{-3} \times 10^4$, što predstavlja povećanje od 15,3%.

4. Diskusija

Nukleotipna hipoteza bazira se na pretpostavci da između veličine genoma, s jedne strane, i dimenzionalno-funkcionalnog stanja stanice (kao i organizma u celni), s druge strane, postoji značajna zavisnost. Ove dimenzionalne promene manifestuju se kako na planu hipertrofije same stanice tako i na planu hiperplazije pojedinih njenih organela. Povećanje veličine genoma prati značajna transformacija kondenzovanog hromatina u genetski znatno aktivniji, derepresovani hromatin (euhromatin) — Čabrić i James, (7, 9) — što po Cavalieru (4) ima presudan uticaj na nukleotipni efekat.

Na žalost, do sada niko nije istraživao ovaj efekat kod mišićnih stanica, posebno u toku hronične hiperkinezije. Ovo tim pre što se, po našem mišljenju, radna hipertrofija mišićnih vlakana, hiperplazija miokapilara (prema našim ranijim istraživanjima hiperplazija mišićnih kapilara tesno korelira sa odnosom euhromatin — heterohromatin u nukleusima endotelnih stanica kapilara), ribosoma i slično, pretežno može objasniti tim efektom.

Tabela 1

Broj mionukleusa (N_v) i koncentracija DNK (DNK_k) na jedinicu zapremine skeletnog mišićnog tkiva kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

No	(N_v) ($mm^{-3} \times 10^4$)		DNK_k ($pg/mm^{-3} \times 10^4$)	
	Kontrl.	Eksper.	Kontrl.	Eksper.
1	2,13	4,09	16,188	31,084
2	2,54	2,13	19,304	16,188
3	1,60	2,52	12,160	19,152
4	2,04	2,95	15,504	22,420
5	3,17	3,63	24,092	27,588
6	2,19	2,66	16,416	20,216
\bar{x}	2,28	2,99	17,277	22,775
$S\bar{x}$	0,21	0,30	1,652	2,276

Značajnost razlika na nivou $P < 0,1$

Tabela 2

Broj mionukleusa (N_v) i koncentracija DNK (DNK_k) na jedinicu zapremine mišićnog tkiva dijafragme kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

No	(N_v) ($mm^{-3} \times 10^4$)		DNK_k ($pg/mm^{-3} \times 10^4$)	
	Kontrl.	Eksper.	Kontrl.	Eksper.
1	4,12	2,66	31,312	20,216
2	2,85	3,87	21,660	29,412
3	3,08	4,79	23,408	36,404
4	2,24	5,88	17,024	44,688
5	2,63	3,53	19,988	26,828
6	—	3,56	—	27,056
\bar{x}	2,98	4,05	22,678	30,767
$S\bar{x}$	0,31	0,46	2,401	3,503

Značajnost razlika na nivou $P < 0,1$

Tabela 3

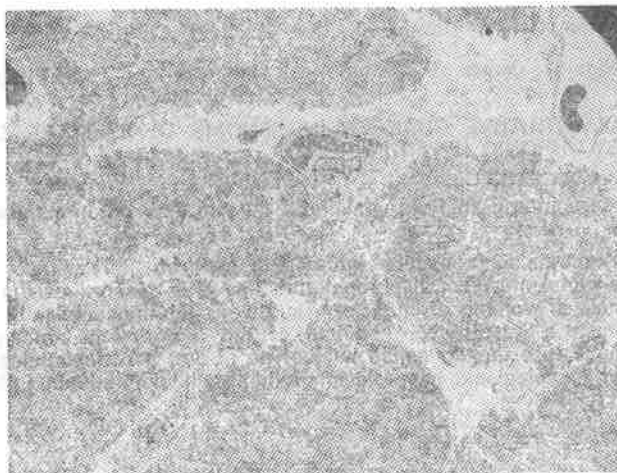
Broj miokardialnih nukleusa (N_v) i koncentracija DNK (DNK_k) na jedinicu zapremine miokarda leve ventrikule kod kontrolnih i eksperimentalnih životinja

No	(N_v) ($mm^{-3} \times 10^4$)		DNK_k ($\mu g/mm^{-3} \times 10^4$)	
	Kontrl.	Eksper.	Kontrl.	Eksper.
1	2,24	2,80	17,024	21,280
2	2,14	3,25	16,264	24,700
3	2,85	3,02	21,660	22,952
4	3,32	2,93	25,232	22,268
5	2,95	3,10	22,420	23,560
6	—	3,58	—	27,208
\bar{X}	2,70	3,11	20,520	23,661
$S\bar{X}$	0,22	0,11	1,695	0,852

Dobijene razlike nisu statistički značajne

6. LITERATURA

- Bachmann, K. (1972) Genome size in Mammals. *Chromosoma. Quart. J. Flor. Acad. Sci.*, 37: 85-93.
- Bennett, M. D. (1971) The duration of meiosis. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*, 178: 277-299.
- Bentley, P. J. (1971) *Endocrines and osmoregulation*. Springer Verlag, Berlin.
- Cavalier, S. T. (1978) Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA C value paradox. *J. Cell Sci.*, 34: 247-278.
- Capanna, E. i Manfredi Romanini, M. G. (1971) Nuclear DNA content and morphology of the karyotype in certain paleoctic Mirochiroptera. *Caryologia*, 24: 471-481.
- Commoner, B. (1964) Roles of DNA in inheritance. *Nature*, 202: 960-968.
- Čabrić, M. i James, N. T. (1983) Morphometric Analyses on the Muscles of Exercise Trained and Untrained Dogs. *Amer. J. Anatomy*, 166: 359-368.
- Čabrić, M. i James, N. T. (1981) Quantitative studies on the muscles of exercise trained dogs. *J. Anat.*, 133, 696.
- Čabrić, M. i James, N. T. (1981) Quantitative studies on Japanese Waltzing Mice. *J. Anat.*, 133, 695.
- Čabric, M. i James, N. T. (1981) Stereological Analyses of Hypertrophic Muscle. *Ster. Iug.*, 3/Suppl., 1: 649-654.
- Čabrić, M. i James, N. T. (1982) Stereological analyses of the capillaries of exercised animals. *Proc. Roy. Mic. Soc.*, 17/Suppl., 28.
- David, M. (1977) *Quantitative ultrastructural data of animal and human cells*. Gustav Fischer Verlag, N. York.
- Gilles, R. (1979) *Intracellular Organic Osmotic Effects*. John Wiley & Sons, N. York.
- Grosset, L. i Odartchenko, N. (1975) Relationships between cell cycle duration, S-period and nuclear DNA content in erythroblasts of four Vertebrates. *Cell Tiss. Kin.*, 8: 81-90.
- Grosset, L. i Odartchenko, N. (1975) Duration of mitosis and separate mitotic phases compared to nuclear DNA content of four vertebrates. *Cell. Tiss. Kin.*, 8: 91-96.
- Gupta, P. K. (1976) Nuclear DNA, nuclear area and nuclear dry mass in thirteen species of *Croalaria*. *Chromosoma*, 54: 155-164.
- James, N. T. i Čabrić, M. (1982) Quantitative Analyses of Normal and Hypertrophic Extensor Digitorum Muscles in Mice. *Experim. Neurology*, 76: 289-297.
- James, N. T. i Čabrić, M. (1981) Quantitative studies on the numerical frequency of myonuclei in the muscles of exercised rats: Evidence against the occurrence of fiber splitting. *Br. J. Exper. Path.*, 62: 600-605.
- Kuramoto, M. (1981) Relationships between number, size and shape of red blood cells in Amphibians. *Com. Biochem. Physiol.*, 69A: 771-775.
- Manfredi Romanini, M. G. (1968) Taxonomy and phylogeny of old world primates with references to the origin of man. Rosenberg & Sellier, Torino.
- Manfredi Romanini, M. G. (1973) The DNA nuclear content and the evolution of Vertebrates. U: Chiarelli, A. B. i Capanna, E. «Cytotaxonomy and Vertebrate evolution». Academic Press, London.
- Manfredi Romanini, M. G., De Stefano, G. i Fontana, F. (1967) Ricerche sul contenuto in ADN e sulle aree del limfociti in alcune specie di «Cercopithecoidea». *Riv. Anropologia*, 54: 3-12.
- Mirsky, A. E. i Ris, M. (1951) The DNA content of animal cells and its evolutionary significance. *J. Gen-Physiol.*, 34: 451-462.
- Monnickendam, M. i Balls, M. (1973) The relationship between cell sizes, respiration rates and survival of Amphibian tissues in long-term organ cultures. *Comp. Biochem. Physiol.*, 44A: 871-880.
- Morescalchi, A. (1977) Adaptation and karyotype in Amphibia. *Boll. Zool.*, 44: 287-294.
- Nagl, W. (1974) Roles of heterochromatin in the control of cell cycle duration. *Nature*, 249: 53-54.
- Nagl, W. (1974) Mitotic cycle time in perennial and annual plants with various amounts of DNA and heterochromatin. *Dev. Biol.*, 39: 342-346.
- Olmo, E. i Morescalchi, A. (1975) Evolution of the genome and cell sizes in salamanders. *Experientia*, 31: 804-806.
- Olmo, E. i Morescalchi, A. (1978) Genome and cell size in frogs. *Experientia*, 34: 44-46.
- Olmo, E. i Odierna, G. (1982) Relationships between DNA content and cell morphometric parameters. in reptiles. *Bas. Appl. Mistochem.*, 26: 27-34.
- Ontell, M. (1974) Muscle satellite cells: A validated technique for light microscopic identification and a quantitative study of changes in their population following denervation. *Anat. Rec.*, 178: 211-228.
- Venable, J. M. (1966) Constant cell populations in normal testosterone-deprived and testosterone-stimulated levator ani muscles. *Amer. J. Anat.*, 119: 263-270.
- Venable, J. M. (1966) Morphology of the cell in normal, testosterone-stimulated levator ani muscles. *Amer. J. Anat.*, 119: 271-302.



Slika 1. Presek miokarda leve ventrikule pacova iz eksperimentalne grupe životinja. Vidljiva su tri miokardialna nukleusa, tri neukleusa endotelnih stanica srčanih kapilara i šest kapilara. Uvećanje iznosi 3725 puta.

Milan Čabrić The Faculty for Physical Culture-Faculty of Arts Split

UDC 591.86 : 612.73

Nigel T. James Department of Anatomy and Cell Biology, University of Sheffield, Sheffield, England

QUANTITATIVE CHANGES IN GENOMS OF SKELETAL, DIAPHRAGMAL AND HEART MIONUCLEI CAUSED BY CHRONIC HYPERTENSION

stereometric analysis / skeletal muscle / diaphragm muscle. / heart muscle / mionucleus / DNA / animal experiments

The training procedure initiated in experimental animals a hyperplasia of mionuclei (15.2—35.9%) in the cells of skeletal muscles, diaphragm muscles and myocard of the left ventricle. Relating the measured number of nuclei in the unit of volume of muscle tissue with the biochemically determined amount of DNA in one nucleus, the authors have made a quantitative estimate of the increase in concentration of DNA, caused by training effort. The authors also believe that the so called nucleotype effect, a consequence of enlargement of genoms, is the basic factor in hypertrophy of muscles and hyperplasia of their cell elements, including the capillary network.

Милан Чабрич

Отделение физической культуры Философского факультета в Сплите Нигел Т. Джемс

Отделение анатомии и биологии клетки Университета в Шеффилде, Англия

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕНОМОВ МИОНУКЛЕУСОВ МЫШЕЦ СКЕЛЕТА, ДИАФРАГМЫ И СЕРДЦА, ВЫЗВАННЫЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПЕРКИНЕЗИЕЙ

Проведенная процедура тренировок вызвала у испытуемых животных гиперплазию мионуклеусов (15,2—35,9%) в клетках скелетной мышцы, мышцы диафрагмы и левой ventрикуле миокарда. Сопоставляя число нуклеусов в единице объема мышечной ткани и количество DNA в одном нуклеусе, которое определено биохимическим путем, оценивалось повышение концентрации DNA, появившееся в результате процедуры тренировочной нагрузки. Авторы считают, что так называемый нуклеотипный эффект появился в результате повышения числа геномов и что он является основной причиной возникновения гипертрофии мышцы и гиперплазии ее клеточных элементов, включая и капиллярную сеть.