DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-134-141

КСЕНОГЕННАЯ ЛИМФОЦИТАРНАЯ РНК СТИМУЛИРУЕТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКУЮ РЕГЕНЕРАЦИЮ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Н.В. Тишевская[1], Е.С. Головнева[1, 2], Р.В. Галлямутдинов[2], А.А. Позина[1], Н.М. Геворкян[3]

[1] ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Российская Федерация

[2] ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины», Челябинск, Российская Федерация

[3] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Российская Федерация

Цель: найти доказательства существования дистантного лимфоцитарного РНК-контроля физиологического миогенеза как способа управления процессом регенерации мышечной ткани. **Материалы и методы.** Исследование проведено на крысах-самцах породы Вистар, n = 33. В первой части эксперимента 12 крыс получали регулярную 40-дневную физическую нагрузку (плавание), половине из них 4 раза внутрибрюшинно вводили суммарную РНК, выделенную из лимфоцитов селезенки свиньи в возрасте 30 дней; 6 крыс составили группу интактного контроля. В гистологических препаратах разных групп скелетных мышц оценивали ширину и площадь поперечного сечения мышечных волокон, площадь ядер и количество миоцитов и миосателлитов. Во второй части эксперимента 15 интактным крысам вводили исследуемую ксеногенную РНК и определяли количество рибонуклеиновых кислот в лимфоцитах периферической крови, лимфоцитах селезенки, скелетных мышцах через 2 часа и через 24 часа после введения. **Результаты.** После 40-дневной физической нагрузки в скелетных мышцах увеличились ширина волокон и площадь ядер миоцитов, абсолютное количество миосателлитов и площадь их ядер не изменились. При введении ксеногенной РНК у тренированных крыс помимо увеличения толщины и площади поперечного сечения мышечных волокон абсолютное количество миосателлитов в *m. biceps femoris* увеличилось в 1,4 раза, в *m. triceps brachii* – в 1,3 раза, в *m. pectoralis major* – в 1,4 раза; площадь ядер миосателлитов увеличилась в среднем на 7%. У интактных крыс через 2 часа после введения ксеногенной РНК количество РНК в скелетных мышцах не изменилось, в лимфоцитах селезенки увеличилось на 19%, в лимфоцитах периферической крови – на 16%. Через 24 часа количество РНК в лимфоцитах оставалось достоверно выше контрольных значений, в мышечной ткани не отличалось от контроля. **Заключение.** Ксеногенная лимфоцитарная РНК стимулирует физиологический миогенез путем активации пролиферации клеток-миосателлитов.

Ключевые слова: миогенез, лимфоциты, РНК, регенерация.

XENOGENEIC LYMPHOCYTIC RNA STIMULATES SKELETAL MUSCLE REGENERATION

N.V. Tishevskaya[1], E.S. Golovneva[1, 2], R.V. Gallyamutdinov[2], A.A. Pozina[1], N.M. Gevorkyan[3]

[1] South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

[2] Multidisciplinary Center for Laser Medicine, Chelyabinsk, Russian Federation

[3] Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation

Objective: to find evidence of the existence of distant lymphocytic RNA control of physiological myogenesis as a way to control the muscle tissue regeneration process. **Materials and methods.** The study was conducted on male Wistar rats, n=33. In the first part of the experiment, 12 rats were subjected to regular 40-day physical activity (swimming), half of them were intraperitoneally injected 4 times with total RNA isolated from pig spleen lymphocytes at 30 days of age; 6 rats made up the intact control group. In histological preparations of different skeletal muscle groups, the width and cross-sectional area of muscle fibers, the area of nuclei, and the number of myocytes and myosatellite cells were evaluated. In the second part of the experiment, 15 intact rats were injected

Для корреспонденции: Тишевская Наталья Викторовна. Адрес: 454092, Челябинск, ул. Воровского, д. 64. Тел. (351) 232-74-67. E-mail: natalya-tishevskaya@yandex.ru

Corresponding author: Natalia Tishevskaya. Address: 64, Vorovsky str., Chelyabinsk, 454092, Russian Federation. Phone: (351) 232-74-67. E-mail: natalya-tishevskaya@yandex.ru

with the studied xenogeneic RNA and the amounts of ribonucleic acids in peripheral blood lymphocytes, spleen lymphocytes, and skeletal muscles were determined 2 hours and 24 hours after injection. **Results.** After the 40-day physical activity, the width of the fibers and the area of myocyte nuclei in the skeletal muscles increased; the absolute number of myosatellite cells and the area of their nuclei did not change. After administration of xenogenic RNA in the trained rats, in addition to an increase in the thickness and cross-sectional area of muscle fibers, the absolute number of myosatellite cells in m. biceps femoris, in m. triceps brachii, and in m. pectoralis major increased 1.4-fold, 1.3-fold, and 1.4-fold, respectively; the area of myosatellite nuclei increased on average by 7%. In intact rats, two hours after xenogeneic RNA injection, the amount of RNA in skeletal muscles remained unchanged, it increased by 19% in spleen lymphocytes, and by 16% in peripheral blood lymphocytes. At 24 hours, the RNA amount in the lymphocytes remained significantly higher than the control values, while in the muscle tissue, it didn't differ from the control. **Conclusion.** Xenogeneic lymphocytic RNA stimulates physiological myogenesis by activating myosatellite cell proliferation.

Key words: myogenesis, lymphocytes, RNA, regeneration.

Лимфоидные клетки активно участвуют в регуляции регенеративных процессов [1, 2], обеспечивая тем самым реактивность или резистентность организма в условиях изменяющейся внешней или внутренней среды, включая адаптационные ответы тканей на повышенную нагрузку. Восстановление целостности скелетных мышц после острого повреждения и их физиологическая регенерация при умеренно выраженной сократительной активности происходят за счет пролиферации и дифференцировки миосателлитов – коммитированных клеток-предшественниц, располагающихся между базальной мембраной и сарколеммой мышечного волокна. В регуляции этих процессов принимают участие гормоны, ростовые факторы, нейромедиаторы, многие из которых синтезируются и секретируются лимфоидными клетками. В последние 10 лет появились доказательства того, что после острого повреждения мышцы уже на начальных этапах восстановительного морфогенеза в мышечной ткани появляются Т-хелперы различных фенотипов, присутствие которых значительно ускоряет выход миосателлитов из состояния покоя и сопровождается формированием полноценных мышечных волокон как в живом организме, так и в условиях *in vitro* [3, 4]. Однако при этом авторы отмечали, что выраженность регенераторного ответа не соответствует количественному составу Т-клеток, пришедших в мышечную ткань, и ими было высказано предположение, что Т-лимфоцитарная регуляция миогенеза, вероятно, осуществляется не контактным, а дистантным путем через растворимые биологически активные вещества, продуцируемые Т-клетками.

Лимфоидная система является частью нейроиммуноэндокринного регуляторного контура, она способна информировать ткани организма о модуляции собственной функции, а также об изменениях, происходящих в «обслуживаемом» ею органе [5]. Посредниками в этой межклеточной сигнальной системе помимо гормонов, цитокинов и факторов роста являются чрезвычайно разнообразные по своим функциональным свойствам молекулы РНК, способные копировать и транспортировать информацию, регулировать экспрессию генов, катализировать образование химических связей. Получены данные о том, что суммарная РНК, выделенная из морфогенетически активных клеток, обладает более выраженным прорегенеративным действием, чем сами клетки [6]. Ранее нами было доказано, что лимфоцитарная суммарная РНК не имеет аллогенных и ксеногенных ограничений, в частности, суммарная РНК, выделенная из лимфоцитов периферической крови человека, стимулировала костномозговой эритропоэз у крыс как *in vivo*, так и *in vitro*. Целью настоящего исследования явился поиск доказательств существования дистантного лимфоцитарного РНК-контроля физиологического миогенеза как способа управления процессом регенерации мышечной ткани.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 33 крысах-самцах породы Wistar массой тела 260–310 г. Эксперимент проводился с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации, соответствовал приказу Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199Н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Животные содержались в стандартных клетках (n = 6) в условиях свободного доступа к воде и пище, при температуре воздуха в виварии +24 ± 2 °C в соответствии с правилами СП 2.2.1.3218. Ежедневный рацион животных состоял из специализированного гранулированного корма, соответствующего по содержанию питательных веществ, витаминов и минералов международным стандартам и ГОСТ Р 50258-92 (Комбикорма полнорационные для лабораторных животных). Все болезненные манипуляции с животными и их эвтаназию путем дислокации шейных позвонков проводили под эфирным наркозом в отдельном от вивария помещении.

В первой части эксперимента использовали 18 животных, которые были разделены на 3 группы по 6 особей в каждой группе: группа 1 – интактные крысы; группа 2 – контрольные крысы, в течение 6 недель участвующие в тренировочном процессе,

группа 3 – крысы, в течение 6 недель участвующие в тренировочном процессе и получавшие инъекции суммарной РНК. Тренировочный процесс представлял собой плавательную нагрузку в резервуаре емкостью 200 л, толщина слоя воды составляла 0,5 м, температура воды – +22–23 °С. Крысы помещались в указанный резервуар 3 раза в неделю, длительность нагрузки увеличивали каждую неделю на 5 минут (с 30 до 55 минут) [7]. Лимфоциты – источники морфогенетически активной ксеногенной РНК выделяли путем суспендирования селезенки 30-дневного поросенка в стеклянном гомогенизаторе с последующей фильтрацией взвеси через капроновый фильтр и 3-кратным центрифугированием клеток в стерильном 0,9% растворе NaCl. Суммарную РНК выделяли методом гуанидин тиоцианат–фенол–хлороформной экстракции. Концентрация выделенной РНК определялась спектрофотометрическим методом по оптической плотности препарата при длине волны 260 нм. Полученную суммарную РНК лиофилизировали и хранили в стерильных флаконах при температуре +5 °С. Перед инъекцией лиофилизированную РНК растворяли в стерильном 0,9% растворе NaCl. РНК вводили крысам внутрибрюшинно, используя метод стерилизующей фильтрации (стерильные шприцевые насадки с диаметром пор 0,22 мкм). Всего каждой крысе из группы 3 было произведено по 4 инъекции с частотой 1 раз в неделю, доза РНК при каждом введении составляла 30 мкг / 100 г веса, объем вводимого раствора – 0,5 мл. Для оценки морфофункционального состояния скелетной мышечной ткани препараты фиксировали 10% нейтральным формалином. После стандартной гистологической проводки, приготовления парафиновых блоков и нарезки препараты окрашивались гематоксилином-эозином. Окрашенные препараты изучали на микроскопе LEICA DMRXA (Германия), с помощью цифровой видеокамеры LEICA DFC 290 (Германия), сопряженной с персональным компьютером, получая изображения микропрепаратов в формате графических файлов *TIFF в цветовом пространстве RGB. Для морфометрических исследований использовали лицензионную версию программы анализа изображений ImageScope M (Россия). Количество миосателлитов и миоцитов подсчитывали при увеличении микроскопа ×400 (объектив ×40; окуляр ×10), площадь клеточных ядер определяли с использованием функции «ручное выделение» при увеличении ×1000.

Во второй части эксперимента использовали 15 животных, которые были разделены на 3 группы; 5 интактных крыс составили контрольную группу, им внутрибрюшинно ввели по 0,5 мл 0,9% раствора NaCl; 10 крысам внутрибрюшинно ввели по 30 мкг / 100 г веса ксеногенной суммарной РНК, растворенной в 0,5 мл 0,9% раствора NaCl. Затем 5 особей были выведены из эксперимента через 2 ч после введения РНК, оставшиеся 5 особей – через 24 ч. У всех 15 крыс из лимфоцитов периферической крови (выделенных путем центрифугирования в растворе фиколла-верографина с градиентом плотности 1,119 г/см^3, ПанЭко, Россия), лимфоцитов селезенки и ткани большой грудной мышцы методом гуанидин тиоцианат–фенол–хлороформной экстракции выделяли суммарную РНК и определяли ее количество спектрофотометрическим методом по оптической плотности препарата при длине волны 260 нм.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью лицензионного пакета прикладных программ: Excel 2020 и PAST версии 4.03. Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический метод Манна–Уитни. Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки (M ± м). Статистически значимыми считали различия $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамические характеристики плавательных движений у сухопутных грызунов таковы, что наибольшие гребковые усилия обеспечиваются двуглавыми мышцами бедра, большими грудными мышцами и трехглавыми мышцами плеча. При гистоморфологическом исследовании указанных мышц было установлено, что регулярная физическая нагрузка умеренной интенсивности приводит к гипертрофии мышечных волокон, но не сопровождается регенераторной гиперплазией. После 40-дневного тренировочного процесса во всех исследуемых скелетных мышцах увеличились ширина мышечных волокон и площадь ядер миоцитов (табл.). При этом в двуглавых мышцах бедра, несмотря на выраженную сократительную активность и напряжение во время плавания, количество зрелых мышечных клеток достоверно уменьшилось. Эти результаты согласуются с данными других исследователей, которые в мышечной ткани грызунов, подвергающихся регулярной плавательной нагрузке, обнаружили частичную фрагментацию и очаговый глыбчатый некроз миоцитов [8]. Клеточная форма регенерации мышечной ткани при регулярных нагрузках умеренной интенсивности отсутствовала: абсолютное количество миосателлитов и размеры их ядер во всех исследуемых мышцах не отличались от показателей интактных животных.

Введение ксеногенной суммарной РНК сопровождалось и достоверным увеличением показателей, характеризующих развитие гипертрофической формы регенерации мышечной ткани, и появлением признаков клеточной гиперплазии в мышечной ткани, испытывающей регулярные физические нагрузки (табл.). У подопытных крыс, получивших инъекции РНК, площадь поперечного сечения мышечных волокон увеличилась в среднем в 1,2 раза, толщина волокон возросла на 8–10%. Визуально волокна стали располагаться более плотно и компактно (рис. 1).

В двуглавой мышце бедра введение РНК позволило сохранить количество активно функционирующих зрелых мышечных клеток на физиологическом уровне (число миоцитов у крыс группы 3 не отличалось от показателей, зарегистрированных у интактных животных).

Очевидно, что под влиянием экзогенной лимфоцитарной РНК пул зрелых миоцитов начал пополняться за счет пролиферации клеток-миосателлитов: во всех исследуемых поперечнополосатых мышцах число этих коммитированных клеток-предшественниц и размеры их ядер увеличились по сравнению с показателями крыс контрольной группы, не получавших лимфоцитарную РНК. Миосателлиты легко визуализировались в гистологических препаратах (рис. 1): они имели округлые крупные светлые ядра с равномерно распределенным хроматином в виде крупных глыбок и мелких пылевидных включений.

У здоровых молодых грызунов, живущих в лабораторных условиях, доля клеток-миосателлитов в поперечнополосатых мышцах не превышает 25%. После регулярного принудительного плавания доля молодых пролиферирующих мышечных клеток в мышцах передних и задних конечностей у тренированных животных в процентном отношении была достоверно больше, чем у интактных крыс (рис. 2), хотя абсолютное количество клеток-миосателлитов в скелетных мышцах не изменялось (табл.). Это относительное увеличение доли миогенных клеток-предшественниц у тренированных животных было связано с уменьшением доли зрелых миоцитов, возникающим вследствие регулярного повреждающего действия физической нагрузки. На фоне введения ксеногенной лимфоцитарной РНК доля мышечных клеток-предшественниц возросла более заметно, и ее прирост наблюдался не только в мышцах конечностей, но и в большой грудной мышце. Увеличение процентного содержания клеток-миосателлитов у тренированных животных, получивших лимфоцитарную РНК, сочеталось с абсолютным приростом числа этих клеток. Так, у крыс группы 3 по сравнению с крысами группы 2 количество клеток-миосателлитов в двуглавой мышце бедра увеличилось в 1,4 раза, в трехглавой мышце плеча – в 1,25 раза, в большой грудной мышце – в 1,43 раза (табл.). О повышении пролиферативной активности миосателлитов у крыс группы 3 свидетельствовало также заметное увеличение размеров ядер этих клеток.

На лепестковой диаграмме, отображающей выраженность признаков гипертрофических и гипер-

Таблица

Влияние нагрузки умеренной интенсивности и ксеногенной лимфоцитарной РНК на физиологический миогенез

Effect of moderate intensity load and xenogeneic lymphocytic RNA on physiological myogenesis

Показатели	Интактные крысы (группа 1), n = 6	Физическая нагрузка (плавание)	
		Контроль (группа 2), n = 6	Введение РНК (группа 3), n = 6
Двуглавая мышца бедра (*m. biceps femoris*)			
Ширина мышечного волокна (мкм)	26,1 ± 1,4	31,1 ± 0,7*	34,6 ± 2,5*▲
Площадь поперечного сечения мышечного волокна (мкм^2)	1450,0 ± 58,6	1514,3 ± 41,7	2009,0 ± 127,9*▲
Количество миосателлитов (клетки/мм^2)	275,9 ± 22,7	302,2 ± 14,9	423,1 ± 28,6*▲
Площадь ядер миосателлитов (мкм^2)	30,7 ± 0,6	31,0 ± 0,9	32,2 ± 1,7
Количество миоцитов (клетки/мм^2)	1058,4 ± 46,5	877,2 ± 36,9*	1001,2 ± 64,4
Площадь ядер миоцитов (мкм^2)	14,7 ± 0,9	20,9 ± 0,8*	19,6 ± 1,1*
Большая грудная мышца (*m. pectoralis major*)			
Ширина мышечного волокна (мкм)	25,0 ± 1,0	30,4 ± 0,9*	32,6 ± 1,9*▲
Площадь поперечного сечения мышечного волокна (мкм^2)	1404,6 ± 77,2	1470 ± 27,5	1786,2 ± 92,3*▲
Количество миосателлитов (клетки/мм^2)	265,8 ± 14,9	280,7 ± 11,3	399,3 ± 23,2*▲
Площадь ядер миосателлитов (мкм^2)	29,9 ± 0,9	30,5 ± 1,3	32,0 ± 1,6*▲
Количество миоцитов (клетки/мм^2)	791,4 ± 40,5	785,5 ± 32,2	965,4 ± 51,3*▲
Площадь ядер миоцитов (мкм^2)	14,2 ± 0,6	17,7 ± 0,7*	17,3 ± 0,5*
Трехглавая мышца плеча (*m. triceps brachii*)			
Ширина мышечного волокна (мкм)	26,7 ± 0,6	30,8 ± 0,8*	33,5 ± 2,0*▲
Площадь поперечного сечения мышечного волокна (мкм^2)	1632,7 ± 54,1	1745,8 ± 82,9	1815,0 ± 65,9
Количество миосателлитов (клетки/мм^2)	292,6 ± 20,3	327,8 ± 13,7	411,1 ± 31,6*▲
Площадь ядер миосателлитов (мкм^2)	31,11 ± 1,05	32,24 ± 0,83	33,99 ± 1,47*▲
Количество миоцитов (клетки/мм^2)	910,6 ± 33,4	923,7 ± 33,4	977,4 ± 50,1
Площадь ядер миоцитов (мкм^2)	17,1 ± 0,6	20,8 ± 0,6*	17,4 ± 0,7▲

Примечание. * – отличия групп 2, 3 от группы 1 ($p < 0,05$); ▲ – различия между группой 3 и группой 2 ($p < 0,05$).

Note. * – differences between groups 2, 3 from group 1 ($p < 0,05$); ▲ – differences between group 3 and group 2 ($p < 0,05$).

пластических восстановительных процессов в конкретных скелетных мышцах (рис. 3) после введения лимфоцитарной РНК, видно, что оба указанных типа регенераторной активности почти равнозначно проявляют себя в мышцах задних конечностей. В мышцах передних конечностей регенераторный ответ на введение РНК при физической нагрузке был выражен слабее, чем в других исследуемых мышцах, но при этом преобладали гиперпластические процессы, связанные с активацией пролиферации клеток-сателлитов. Наибольшая ответная реакция на лимфоидный РНК-сигнал была зарегистрирована в больших грудных мышцах – в них под влиянием ксеногенной лимфоцитарной РНК мышечные волокна увеличили свой размер на 21%, а число клеток-миосателлитов в этих мышцах возросло на 42%. Вероятно, данный феномен был связан как с исходной относительно бóльшей долей клеток-миосателлитов в *m. pectoralis major* по сравнению с мышцами конечностей (рис. 2), так и с повышенной нагрузкой на грудные мышцы во время плавания.

При изучении *in vivo* свойств любых экзогенных биологически активных веществ всегда возникает вопрос, как именно эти вещества осуществляют

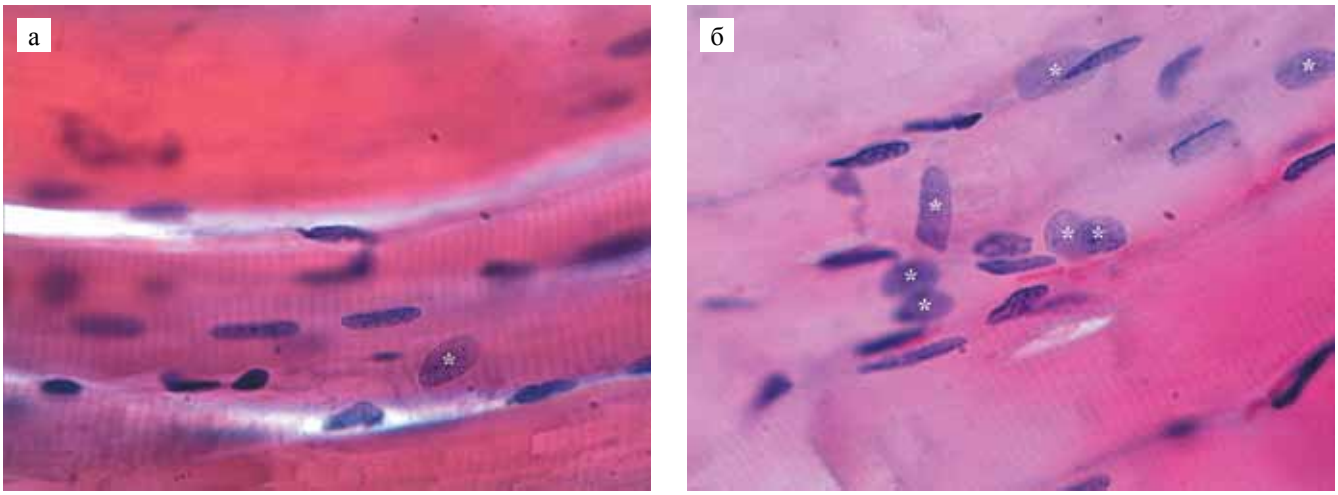

Рис. 1. Клетки-миосателлиты (ядра*) в поперечнополосатом мышечном волокне двуглавой мышцы бедра (*m. biceps femoris*): а – интактная мышца (группа 1); б – мышца после введения лимфоцитарной РНК на фоне регулярной нагрузки средней интенсивности (группа 3). Окраска: гематоксилин – эозин, ×1000, масляная иммерсия

Fig. 1. Myosatellite cells (nuclei*) in the transverse striated muscle fiber of the *m. biceps femoris*: a – intact muscle(group 1); б – muscle after injection of lymphocytic RNA against the background of regular load of moderate intensity (group 3). H&E staining, ×1000 magnification, oil immersion

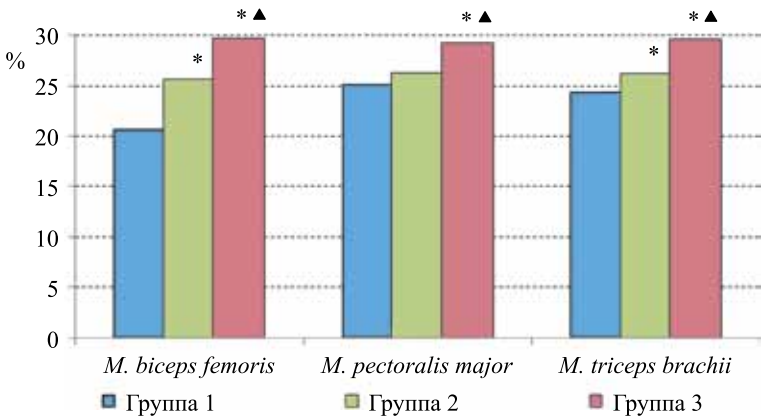

Рис. 2. Процентное содержание миосателлитов в мышцах интактных крыс (группа 1), в мышцах крыс после регулярной физической нагрузки (группа 2), в мышцах крыс после регулярной физической нагрузки и введения ксеногенной лимфоцитарной РНК (группа 3). * – отличия групп 2, 3 от группы 1 ($p < 0,05$); ▲ – различия между группами 2 и 3 ($p < 0,05$)

Fig. 2. Percentage of myosatellite cells in the muscles of intact rats (group 1), in the muscles of rats after regular exercise (group 2), in the muscles of rats after regular physical activity and injection of xenogeneic lymphocytic RNA (group 3). * – differences between groups 2, 3 and group 1 ($p < 0.05$); ▲ – differences between groups 2 and 3 ($p < 0.05$)

свои регуляторные функции. На настоящий момент неизвестно, какие клетки в организме являются мишенью для экзогенной морфогенетически активной лимфоцитарной РНК, т. е. действует ли она непосредственно на ткань или же передает информационный сигнал Т-лимфоцитам реципиента, которые, в свою очередь, активируют или тормозят пролиферацию и дифференцировку клеток. В рамках существующей концепции о лимфоидной РНК-регуляции восстановительных процессов [5, 9] мы предполагаем, что морфогенетически активная лимфоцитарная РНК действует на клетки других, нелимфоидных органов опосредованно, через Т-лимфоциты, приверженные определенной ткани или органу. В связи с этим во второй части эксперимента мы оценили динамику содержания суммарной РНК в лимфоцитах периферической крови, лимфоцитах селезенки и в мышечной ткани интактных животных после введения им ксеногенной лимфоцитарной РНК (рис. 4). Оказалось, что даже через сутки после введения в организм

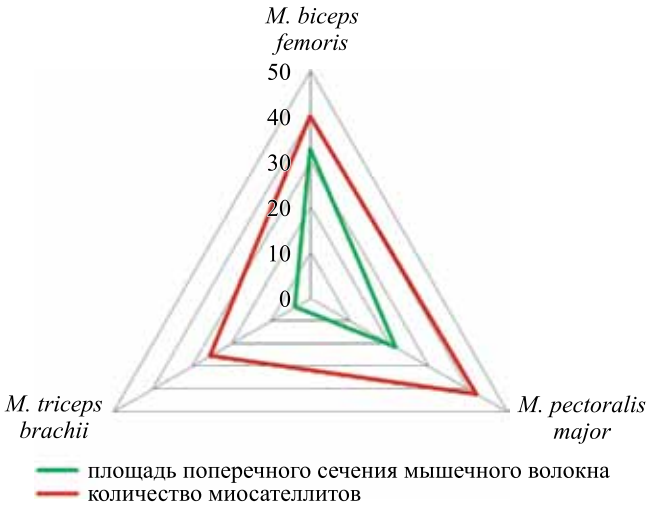

Рис. 3. Степень выраженности гипертрофии и гиперплазии в разных скелетных мышцах после введения ксеногенной лимфоцитарной РНК в условиях регулярной физической нагрузки (в процентах от контрольных значений)

Fig. 3. Severity of hypertrophy and hyperplasia in different skeletal muscles after injection of xenogeneic lymphocytic RNA under conditions of regular physical activity (as a percentage of control values)

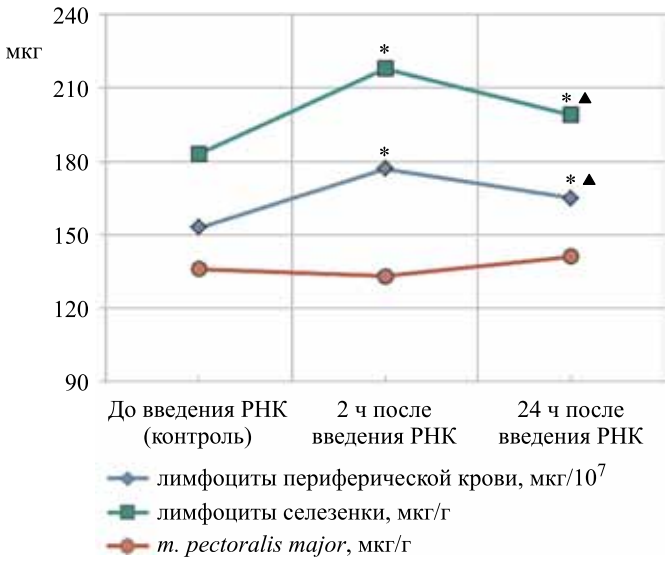

Рис. 4. Динамика содержания суммарной РНК в тканях интактных крыс после введения ксеногенной лимфоцитарной РНК. * – отличия от контроля ($p < 0,05$); ▲ – различия между показателями, полученными через 2 ч и через 24 ч после введения РНК ($p < 0,05$)

Fig. 4. Dynamics of total RNA content in tissues of intact rats after injection of xenogeneic lymphocytic RNA. * – differences from control ($p < 0.05$); ▲ – differences between the indicators obtained 2 hours and 24 hours after RNA injection ($p < 0.05$)

животных экзогенной РНК содержание суммарной РНК в поперечнополосатой мышечной ткани не изменилось, т. е. экзогенная лимфоцитарная РНК не проникала в миоциты. В отличие от мышечных клеток лимфоциты периферической крови и лимфоциты селезенки, по-видимому, активно поглощали экзогенную РНК как минимум в течение 2 часов после инъекции. К 24-му часу после введения лимфоцитарной РНК содержание РНК в лимфоцитах периферической крови и селезенки уменьшилось, но оставалось достоверно больше контрольного уровня.

ОБСУЖДЕНИЕ

О том, что аллогенная и ксеногенная РНК может быстро проникать в лимфоидные клетки, известно достаточно давно: 3% РНК, выделенной из лимфоцитов периферической крови здоровых людей или пациентов с хроническим лимфобластным лейкозом, через 3 минуты инкубации обнаруживалось внутри аллогенных лимфоцитов и лимфоидных клеток селезенки мышей, а через 15 минут внутри этих клеток находилось уже 8% экзогенной РНК [10]. Незначительное снижение удельной радиоактивности клеток после многократного отмывания и обработки панкреатической рибонуклеазой свидетельствовало о том, что экзогенная РНК действительно поглощалась лимфоцитами, а не адсорбировалась на их мембране. Так же быстро в лимфоидные клетки селезенки проникала гомологичная суммарная РНК, стимулируя при этом их синтетическую активность [11]. Современные данные мировой литературы свидетельствуют о том, что главными участниками лимфоидной регуляции миогенеза являются Т-хелперы, а именно регуляторные Т-клетки (Treg), которые в большом количестве обнаруживаются вокруг регенерирующих мышечных волокон [12, 13]. Предполагается, что это особая популяция Treg, которая пролиферирует не в лимфоузлах и селезенке, а в месте повреждения мышечной ткани. Особенностью этих Т-регуляторных клеток «мышечного типа» является их способность к синтезу фактора роста – амфирегулина. Поскольку среди Т-лимфоцитов селезенки обнаружены амфирегулин-продуцируюшие Т-клетки, вполне возможно, что эти уже «обученные» Т-клетки мигрируют из нее в поврежденную мышцу. К настоящему времени доказано, что «обслуживающие» конкретную мышцу Treg посредством амфирегулина напрямую усиливают пролиферацию и дифференцировку клеток-миосателлитов *in vivo* и *in vitro*, а у мышей, лишенных Treg, регенеративный потенциал миосателлитов значительно снижается [12]. Кроме того, в организме лабораторных грызунов обнаружены Т-клетки памяти, которые начинают экспрессировать специфические миорегуляторные белки при повторных повреждениях мышцы [14].

Результаты проведенного нами исследования являются доказательством того, что сигнал к усиленной пролиферации находящего в мышцах тканеспецифичного клона регуляторных Т-лимфоцитов может передаваться дистантно, с помощью молекул РНК. Во-первых, в качестве источника морфогенетически активной РНК мы использовали лимфоциты животного в периоде активного гистогенеза (вес поросят в течение первого месяца жизни увеличивается в 8 раз). Во-вторых, введение подопытным крысам ксеногенной морфогенетически активной лимфоцитарной РНК способствовало развитию не только саркоплазматической и миофибриллярной гипертрофии мышечных волокон, но и стимулировало процесс клеточной регенерации, сопровождающейся увеличением числа клеток-миосателлитов в поперечнополосатой мышечной ткани. В-третьих, после введения РНК в самой мышечной ткани количество рибонуклеиновых кислот не изменялось, но достоверно увеличивалось как в лимфоцитах селезенки, так и в лимфоцитах периферической крови. Вероятнее всего, посредниками в этой дистантной передаче РНК-сигнала от лимфоидных клеток скелетным мышцам являются молекулы микроРНК, которые не разрушаются плазменными и тканевыми РНКазами. В настоящее время во всем мире активно изучаются как регенераторные функции различных микроРНК, так и спектры микроРНК, секретируемые разными типами Т-лимфоцитов, и есть все основания полагать, что в недалеком будущем будут расшифрованы РНК-механизмы передачи регенерационной лимфоцитарной информации. Первый шаг на этом пути уже сделан. В 2011 году в Т-лимфоцитах было обнаружено семейство микроРНК-223 [15], в 2020 году было доказано, что микроРНК-223-3р активируется на ранней стадии регенерации скелетных мышц после повреждения, а нокаут гена, кодирующего синтез этой микроРНК, приводит к усилению воспаления, торможению регенерации и развитию интерстициального фиброза в поперечнополосатой мышечной ткани [16]. Установлено также, что интенсивно экспрессирующаяся в Т-лимфоцитах микроРНК-27 [17] подавляет синтез миостатина – белка, угнетающего пролиферацию миосателлитов [18], следовательно, повышенная экспрессия микроРНК-27 в Т-клетках при повреждении мышечной ткани может являться одним из механизмов, посредством которого Т-лимфоциты стимулируют миогенез.

Эффективность именно ксеногенной лимфоцитарной РНК позволяет нам утверждать, что Т-лимфоцитарный контроль эффекторного звена двигательной системы – это универсальный механизм регуляции функционального состояния мышечной ткани у всех млекопитающих, поскольку способность к перемещению в пространстве является жизненно важной функцией, необходимой для реализации мотивации поиска пищи или полового партнера. Дальнейшее изучение лимфоцитарной регуляции миогенеза является чрезвычайно актуальной задачей для медицины, так как создание пригодных для использования в регенеративной медицине препаратов ксеногенной

РНК может стать одним из передовых методов субклеточной терапии мышечных дистрофий, а также других заболеваний, связанных с патологией скелетных мышц.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Тишевская НВ, Геворкян НМ, Козлова НИ*. Роль Т-лимфоцитов в гормональной регуляции морфогенетических процессов. *Успехи современной биологии*. 2015; 135 (2): 189–202. *Tishevskaya NV, Gevorkyan NM, Kozlova NI*. The role of T-lymphocytes in the hormonal regulation of morphogenetic processes. *Uspekhi sovremennoj biologii*. 2015; 135 (2): 189–202.
2. *D'Alessio FR, Kurzhagen JT, Rabb H*. Reparative T lymphocytes in organ injury. *J Clin Invest*. 2019; 129: 2608–2618. doi: 10.1172/JCI124614.
3. *Fu X, Xiao J, Wei Y, Li S, Liu Y, Yin J et al*. Combination of inflammation-related cytokines promotes long-term muscle stem cell expansion. *Cell research*. 2015; 25 (6): 655. doi: 10.1038/cr.2015.58.
4. *Kwee BJ, Budina E, Najibi AJ, Mooney DJ*. CD4 T-cells regulate angiogenesis and myogenesis. *Biomaterials*. 2018; 178: 109–121. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.06.003.
5. *Тишевская НВ, Бабаева АГ, Геворкян НМ*. Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2016; 102 (11): 1280–1301. *Tishevskaya NV, Babaeva AG, Gevorkyan NM*. The role of lymphocytic RNA in intercellular information exchange and regulation of regenerative processes. Rossiyskiy fiziologicheskiy *Zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2016; 102 (11): 1280–1301.
6. *Гоникова ЗЗ, Никольская АО, Кирсанова ЛА, Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Севастьянов ВИ*. Сравнительный анализ эффективности стимуляции процессов регенерации печени клетками костного мозга и общей РНК этих клеток. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21 (1): 113–121. *Gonikova ZZ, Nikolskaya AO, Kirsanova LA, Shagidulin MYu, Onishchenko NA, Sevastyanov VI*. The comparative analysis of the effectiveness of stimulation of liver regeneration by bone marrow cells and total RNA of these cells. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2019; 21 (1): 113–121. doi: 10.15825/1995-1191-2019-1-113-121.
7. *Галлямутдинов РВ, Астахова ЛВ, Головнева ЕС, Серышева ОЮ*. Влияние лазерного инфракрасного излучения на некоторые морфофункциональные показатели регенерирующей скелетной мышцы в возрастном аспекте. *Лазерная медицина*. 2020; 24 (2–3): 90–94. *Gallyamutdinov RV, Astahova LV, Golovneva ES, Serysheva OYu*. Vliyanie lazernogo infrakrasnogo izlucheniya na nekotorye morfofunkcional'nye pokazateli regeneriruyushchej skeletnoj myshcy v vozrastnom aspekte. *Lazernaya medicina*. 2020; 24 (2–3): 90–94. doi: 10.37895/2071-8004-2020-24-2-3-90-94.
8. *Хабибулин РМ, Бакирова АУ, Хабибулин ГМ, Ахмадуллина ЕТ*. Биохимические показатели крови и морфологические изменения мышечной ткани у мышей после физических нагрузок на фоне применения левзеи сафлоровидной. *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана*. 2019; 238 (2): 215–219. *Khabibulin RM, Bakirova AU, Khabibulin ГМ, Akhmadullina ET*. Blood biochemical parameters and morphological changes of muscle tissue in mice after exercise on the application of rhaponticum carthamoides. *Uchenyye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N.E. Baumana*. 2019; 238 (2): 215–219. doi: 10.31588/2413-4201-1883-238-2-215-220.
9. *Тишевская НВ, Геворкян НМ, Козлова НИ*. Современный взгляд на роль Т-лимфоцитов в регуляции эритропоэза. *Успехи современной биологии*. 2016; 136 (1): 83–96. *Tishevskaya NV, Gevorkyan NM, Kozlova NI*. A modern view of the role of T-lymphocytes in regulation of erythropoiesis. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2016; 136 (1): 83–96.
10. *Блинов МН, Луганова ИС, Владимирова АД*. Включение экзогенной РНК в лейкоциты человека. *Проблемы гематологии и переливания крови*. 1981; 26 (1): 38–40. *Blinov MN, Luganova IS, Vladimirova AD*. Vklyucheniye ekzogennoy RNK v leykotsity cheloveka. *Problemy gematologii i perelivaniya krovi*. 1981; 26 (1): 38–40.
11. *Wang SR, Giacomoni D, Dray S*. Physical and chemical characterization of RNA incorporated by rabbit spleen cells. *Exp Cell Res*. 1973; 78 (1): 15–24. doi: 10.1016/0014-4827(73)90032-3.
12. *Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y et al*. A special population of regulatory T-cells potentiates muscle repair. *Cell*. 2013; 155 (6): 1282–1295. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.054.
13. *Li J, Tan J, Martino MM, Lui KO*. Regulatory T-Cells: Potential Regulator of Tissue Repair and Regeneration. *Front Immunol*. 2018; 9: 585. doi: 10.3389/fimmu.2018.00585.
14. *Tidball JG*. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017; 17 (3): 165–178. doi: 10.1038/nri.2016.150.
15. *Grigoryev YA, Kurian SM, Hart T, Nakorchevsky AA, Chen C, Campbell D et al*. MicroRNA regulation of molecular networks mapped by global microRNA, mRNA, and protein expression in activated T lymphocytes. *J Immunol*. 2011; 187 (5): 2233–2243. doi: 10.4049/jimmunol.1101233.
16. *Cheng N, Liu C, Li Y, Gao S, Han YC, Wang X et al*. MicroRNA-223-3p promotes skeletal muscle regeneration by regulating inflammation in mice. *J Biol Chem*. 2020; 295 (30): 10212–10223. doi: 10.1074/jbc.RA119.012263.
17. *Kuchen S, Resch W, Yamane A, Kuo N, Li Z, Chakraborty T et al*. Regulation of microRNA expression and abundance during lymphopoiesis. *Immunity*. 2010; 32 (6): 828–839. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.009.
18. *Wang XH*. MicroRNA in myogenesis and muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013; 16 (3): 258–266. doi: 10.1097/MCO.0b013e32835f81b9.

Статья поступила в редакцию 7.06.2021 г.
The article was submitted to the journal on 7.06.2021